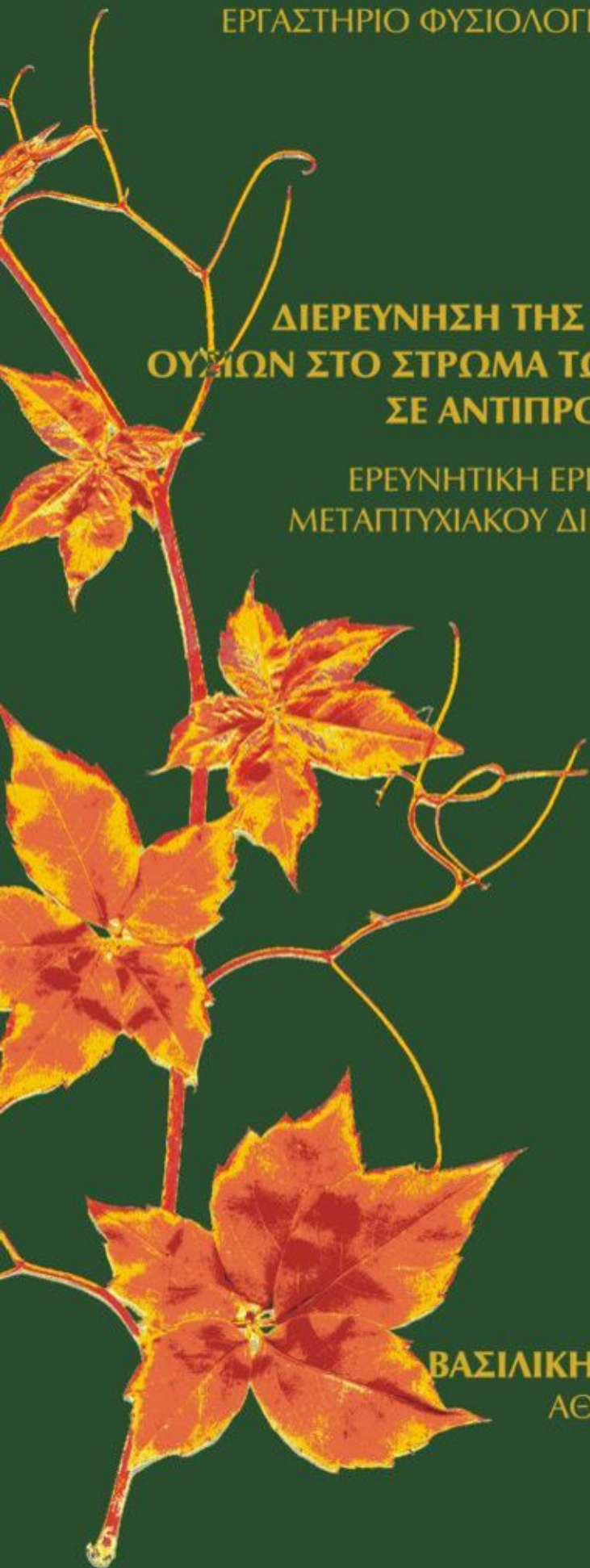


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ
ΟΥΧΙΩΝ ΣΤΟ ΣΤΡΩΜΑ ΤΩΝ ΕΠΙΕΦΥΜΕΝΙΔΙΚΩΝ ΚΗΡΩΝ
ΣΕ ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΤΙΚΑ ΕΙΔΗ**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑΚΗ
ΑΘΗΝΑ 2001



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ
ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΟ ΣΤΡΩΜΑ ΤΩΝ ΕΠΙΕΦΥΜΕΝΙΑΔΙΚΩΝ ΚΗΡΩΝ
ΣΕ ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΤΙΚΑ ΕΙΔΗ**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων

ΚΑΡΑΜΠΟΥΡΝΙΩΤΗΣ Γ., Επικ.

Καθηγητής

Μέλη

ΔΡΟΣΟΠΟΥΛΟΣ Ι., Καθηγητής

ΦΑΣΣΕΑΣ Κ., Επικ. Καθηγητής

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑΚΗ

ΑΘΗΝΑ 2001

Η παρούσα μελέτη ανατέθηκε από τη
Γενική Συνέλευση Ειδικής Σύγκλησης
(20/11/2000) του Τμήματος Γεωπονικής
Βιοτεχνολογίας.

Στην οικογένειά μου
και στο Γιώργο Λ.

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Ανέκαθεν θεωρούσα ότι τα φυτά πίσω από τη σιωπή και την ακινησία κρύβουν το μυστήριο της θαυμαστής τους ύπαρξης. Έτσι δεν αντιμετώπισα ποτέ τα φυτά ως υλικά με οικονομική μόνο σημασία. Κατά τη διάρκεια των σπουδών μου τα παρατηρούσα και εντυπωσιαζόμουν κάθε φορά που ανακάλυπτα τους ποικίλους μηχανισμούς που αναπτύσσουν προκειμένου να επιβιώνουν και να αναπαράγονται σε αντίξοα περιβάλλοντα. Αυτό το ενδιαφέρον δεν με εγκατέλειψε ποτέ και με οδήγησε να ασχοληθώ ήδη από την πτυχιακή μου εργασία με τη Φυσιολογία Φυτών. Ήταν λοιπόν συναρπαστικό για μένα, στα πλαίσια της Μεταπτυχιακής Μελέτης μου, να ασχοληθώ με κάτι που φαίνεται τόσο μικρό και ασήμαντο όπως η εφυμενίδα και οι επεφυμενιδικοί κηροί των φυτών και να κατανοήσω τη χρησιμότητά τους και τη μεγάλη σημασία τους.

Σε αυτό το σημείο λοιπόν θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γεώργιο Καραμπουρνιώτη για τον σχεδιασμό, την ανάθεση και άμεση επίβλεψη αυτού του θέματος, όπως επίσης για την ακούραστη βοήθεια του καθ'όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μελέτης. Σε κάθε στιγμή στεκόταν ως πολύτιμος σύμβουλος σε οποιοδήποτε πρόβλημα τυχόν με απασχολούσε. Περισσότερο από όλα ίσως θα πρέπει να τον ευχαριστήσω γιατί με τη συμπεριφορά του πάντα καταδείκνυε το ήθος και τη σεμνότητα ως κύριες αρετές του επιστήμονα.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω το Διευθυντή του Εργαστηρίου Καθηγητή κ. Ι. Δροσόπουλο τόσο για την αποδοχή του να δουλέψω στο Εργαστήριο όσο και για τη συμμετοχή του στη Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή. Τόσο σε εργασιακό όσο και σε προσωπικό επίπεδο συμβάλλει στη δημιουργία των συνθηκών που καθιστούν δυνατή την απρόσκοπτη ερευνητική εργασία.

Στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Φασσέα θα ήθελα να εκφράσω την εκτίμηση και τις ευχαριστίες μου για τη συμμετοχή του στη Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή και για τη βοήθεια που μου προσέφερε σε θέματα ανατομίας φυτών. Επιπλέον και αυτός με τη σειρά του μου έδειξε ότι η φιλική πλευρά ενός καθηγητή τελικά συνεισφέρει στην τέλεση μιας ποιοτικότερης και πιο ευχάριστης εργασίας.

Ξεχωριστά σε αυτό το σημείο θα πρέπει να ευχαριστήσω τον Υποψήφιο Διδάκτορα Γ. Λιακόπουλο γιατί με τη συνεργασία του με βοήθησε να αποκτήσω περισσότερη ερευνητική εμπειρία. Επιπλέον τον ευχαριστώ για τη συμπαράσταση και την ενθάρρυνσή του με τις οποίες αντιμετώπισα τις δυσκολίες που πάντα υπάρχουν σε ένα τέτοιο εγχείρημα.

Τους Διδάκτορες Βάλλυ Λιάκουρα, Δημοσθένη Νικολόπουλο και Στυλιανή Χωριανοπούλου καθώς και τον Γεωπόνο Κωνσταντίνο Δελή ευχαριστώ για το όμορφο κλίμα που δημιουργούν στο εργαστήριο και στο οποίο τόσο εύκολα με ενσωμάτωσαν. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Υποψήφιο Διδάκτορα Εμμανουήλ Φιλίππου για τη βοήθεια στην προετοιμασία και μικροσκοπική παρατήρηση μέρους των δειγμάτων αυτής της εργασίας αλλά περισσότερο για τη φιλική σχέση που καλλιέργησε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Υποψήφια Διδάκτορα Σωτηρία Σταυριανάκου αφενός για τη βοήθεια της και αφετέρου για την προσπάθεια που καταβάλει στα πλαίσια της εκπροσώπησης των μεταπτυχιακών φοιτητών. Εκτιμώ τη συνεχή προσπάθειά της παρά τις δυσκολίες που προκύπτουν και τις επιπτώσεις που αυτή έχει στον χρόνο εργασίας της.

Επιθυμώ να ευχαριστήσω το Βαρδινογιάννειο Ίδρυμα για τη χορήγηση υποτροφίας κατά το δεύτερο έτος των μεταπτυχιακών σπουδών.

Επειδή για τα περισσότερα πράγματα έχει σημασία το ξεκίνημα, θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αγάπη, την ηθική συμπαράσταση και τη συνδρομή της ώστε να ολοκληρωθεί με τις καλύτερες συνθήκες αυτή η προσπάθεια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ	iii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	v
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
I.1. Γενικά.....	9
I.2. Η ονοματολογία των επιμέρους τμημάτων της εφυμενίδας.....	9
I.3. Η χημική σύσταση της εφυμενίδας.....	10
I.4. Η χημική σύσταση των επεφυμενιδικών κηρών.....	11
I.5. Η οντογένεση της εφυμενίδας.....	12
I.5.1. Η προεφυμενίδα (procuticle)	12
I.5.2. Το εφυμενιδικό κλάσμα (cuticular proper, CP)	12
I.5.3. Η εφυμενιδική στοιβάδα (cuticular layer, CL)	13
I.5.4. Οι επεφυμενιδικοί κηροί.....	14
I.5.5. Διάταση της εφυμενίδας	14
I.6. Λειτουργικοί ρόλοι εφυμενίδας	15
I.6.1. Ρύθμιση απωλειών νερού.....	15
I.6.2. Συμβολή στη διαμόρφωση των οπτικών ιδιοτήτων των φύλλων ...	16
I.6.3. Προστασία από ακτινοβολίες	18
I.6.4. Προστασία έναντι παθογόνων	20
I.6.5. Προστασία έναντι εντόμων	23
I.6.6. Υδροφοβικότητα της εφυμενίδας και αυτοκαθαρισμός (self cleaning) της επιφάνειας του φύλλου	25
I.6.7. Η συμβολή της εφυμενίδας στη μορφογένεση των αναπτυσσόμενων φυτικών τμημάτων	27
I.7. Φαινολικά συστατικά των φυτών	27
I.7.1. Βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών	28
I.7.2. Τα ένζυμα–κλειδιά της βιοσύνθεσης των φαινυλοπροπανοειδών και φλαβονοειδών	32
I.7.3. Φαινολικές ενώσεις της εφυμενίδας και των επεφυμενιδικών κηρών	32
I.7.4. Φυσιολογικοί ρόλοι των φαινολικών συστατικών	34
I.7.5. Τα χαρακτηριστικά του φθορισμού των φαινολικών συστατικών	37
I.8. Δομή και λειτουργία των στοματίων	38
I.8.1. Γενικά	38
I.8.2. Ανατομικά χαρακτηριστικά των στοματίων και λειτουργία τους.	39
I.8.3. Φυσιολογική σημασία των στοματίων.....	40
I.8.4. Οντογένεση στοματίων.....	42
I.9. Φυτικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματικό υλικό.....	46

I.9.1. <i>Jasminum grandiflorum</i> (κν. Γιασεμί χιώτικο).....	46
I.9.2. <i>Prunus persica</i> (κν. Ροδακινιά).....	46
I.9.3. <i>Parthenocissus quinquefolia</i> (L.) Planch (κν. Αμπέλοψις)	47
ΣΚΟΠΟΣ	48
II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	49
II.1. Φυτικό υλικό	50
II.2. Μικροσκοπικές παρατηρήσεις.....	50
II.3. Χημικές αναλύσεις των χλωροφορμικών εκπλυμάτων	50
II.4. Χρωματογραφικές αναλύσεις	51
II.5. Χημικά αντιδραστήρια.....	52
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	53
III.1. Μικροσκοπικές παρατηρήσεις των φύλλων σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια των φυτών	54
III.2. Ανάλυση των επεφυμενιδικών κηρών του φυτού <i>Prunus persica</i> L. σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια.....	58
III.3. Ανάλυση των επεφυμενιδικών κηρών του φυτού <i>Parthenocissus</i> <i>quinquefolia</i> σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια	65
IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	71
IV.1. Η διαμόρφωση του εκπεμπόμενου φθορισμού των στοματικών συμπλόκων των φύλλων σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια	72
IV.2. Ανάλυση των επεφυμενιδικών κηρών των φυτών <i>Prunus persica</i> και <i>Parthenocissus quinquefolia</i> σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια των φύλλων	73
IV.3. Σχέση μεταξύ της εκπομπής φθορισμού της εφυμενίδας και των χαρακτηριστικών φθορισμού των εκπλυμάτων των φύλλων	75
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	77

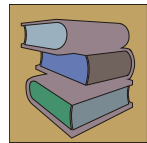
ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι μεταβολές στην εκπομπή φθορισμού, η πορεία εναπόθεσης και η χημική σύσταση σε φαινολικά του στρώματος των επιεφυμενιδικών των φύλλων των φυτικών ειδών *Parthenocissus quinquefolia*, *Prunus persica* και *Jasminum grandiflorum* στη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Μελετήθηκαν τα χαρακτηριστικά φθορισμού των επιδερμικών και καταφρακτικών κυττάρων, μέσω μικροσκοπίας φθορισμού, σε διάφορα στάδια ανάπτυξης των φύλλων. Επίσης παραλήφθηκαν χλωροφορμικά εκπλύματα των φύλλων και μετρήθηκε η ποσότητα, η απορρόφηση στο υπεριώδες και η εκπομπή φθορισμού των κηρών από δείγματα διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων. Τέλος αναλύθηκε μετά από αλκαλική υδρόλυση των δειγμάτων η σύσταση των κηρών σε φαινολικά συστατικά καθώς και σε φθορίζοντα συστατικά μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι η εμφάνιση του φθορισμού σχετίζεται με τη διαδικασία ωρίμανσης των στοματικών συμπλόκων και των επιδερμικών κυττάρων. Τα καταφρακτικά κύτταρα αποτελούν την πρώτη ομάδα κυττάρων της επιδερμίδας στην οποία διαπιστώνεται έντονη εκπομπή φθορισμού κατά την πορεία ανάπτυξης των φύλλων. Η εκπομπή φθορισμού από τα καταφρακτικά κύτταρα σχετίζεται με την εναπόθεση φαινολικών συστατικών στους επιεφυμενιδικούς κηρούς και έχει πιθανόν αμυντικό προορισμό. Η εναπόθεση φαινολικών συστατικών επιβεβαιώνεται και από χημικές αναλύσεις των εκπλυμάτων των επιφανειών των φύλλων.

Η εναπόθεση κηρών στην εφυμενίδα ως συγκέντρωση ανά μονάδα επιφάνειας παρουσιάζεται έντονη κατά τα αρχικά στάδια έκπτυξης των φύλλων και πιθανόν να σχετίζεται με τον έλεγχο των απωλειών νερού αλλά και με την άμυνα των νεαρών αναπτυσσόμενων φύλλων. Η παράλληλη εναπόθεση φαινολικών συστατικών στο στρώμα των επιεφυμενιδικών κηρών ακολουθεί εν πολλοίς το ίδιο πρότυπο, ενώ παρατηρούνται ορισμένες ποιοτικές μεταβολές κατά την πορεία ανάπτυξης των φύλλων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης των φύλλων δίδεται προτεραιότητα σε αμυντικούς μηχανισμούς οι οποίοι θωρακίζουν κατά το δυνατόν αποτελεσματικότερα τις εξωτερικές επιφάνειες των οργάνων έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων.



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I.1. Γενικά

Οι φυτικοί οργανισμοί κατά την εξέλιξη τους έχουν αναπτύξει ιδιαίτερα προσαρμοστικά πλεονεκτήματα μέσω κατάλληλων τροποποιήσεων τόσο των μεταβολικών λειτουργιών τους, όσο και του αμυντικού τους οπλοστασίου, το οποίο απαρτίζεται εκτός των άλλων και από πολυάριθμες χημικές ενώσεις. Μία κατηγορία ενώσεων είναι τα βιοπολυμερή υλικά τα οποία συμβάλλουν στην αμυντική θωράκιση των φυτικών οργάνων. Στα υπόγεια όργανα του φυτών, στην ενδοδερμίδα της ρίζας, στους δεσμικούς κολεούς των αγρωστωδών και στο προστατευτικό περίδερμα των εναέριων οργάνων απαντάται το αδιάλυτο πολυμερές της σουβερίνης. Αποτελείται από ένα πλέγμα αλειφατικών συστατικών τα οποία είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα με φαινολικά οξέα. Τα πιο διαδεδομένα αλειφατικά συστατικά της σουβερίνης είναι λιπαρά οξέα, λιπαρές αλκοόλες, ω -διυδροξυ λιπαρά οξέα και δικαρβοξυλικά οξέα με μεγάλο μήκος αλειφατικής αλυσίδας (C₂₀-C₃₀) (Kolattukudy, 1980).

Στα εναέρια φυτικά μέρη το ρόλο του προστατευτικού φράγματος έναντι δυσμενών βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων παίζει η εφυμενίδα η οποία ως κύριο δομικό συστατικό της έχει το βιοπολυμερές της κουτίνης. Η δομή της εφυμενίδας συμπληρώνεται από την παρουσία κηρών οι οποίοι αφενός εμποτίζουν το πλέγμα της κουτίνης και αφετέρου βρίσκονται ως εναποθέσεις στην επιφάνεια της εφυμενίδας.

I.2. Η ονοματολογία των επιμέρους τμημάτων της εφυμενίδας

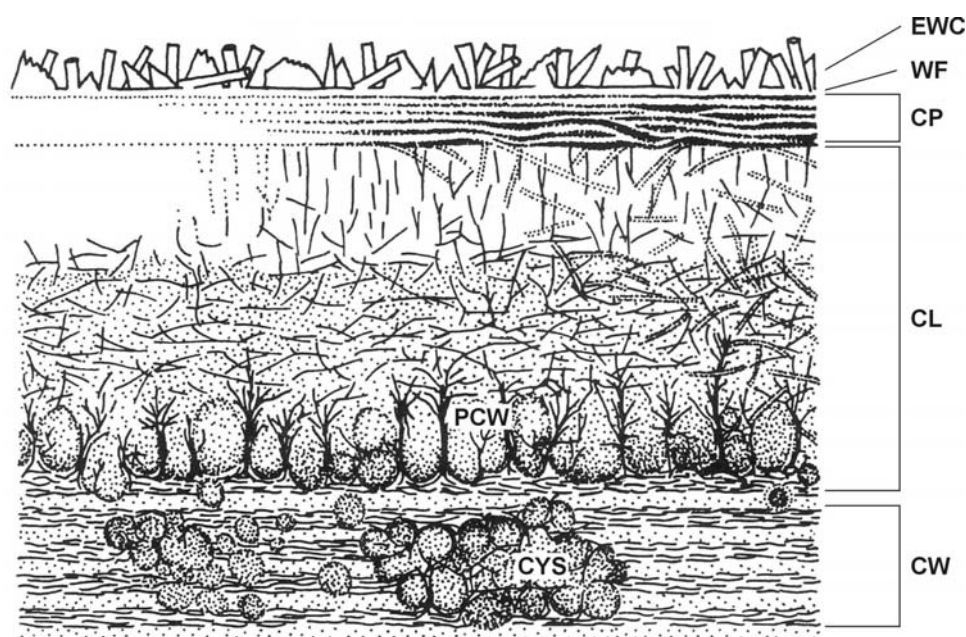
Η δομή της *εφυμενίδας* (*cuticular membrane, CM*) αποδίδεται συνήθως με το πρότυπο των δύο κύριων στοιβάδων οι οποίες διακρίνονται μεταξύ τους από διαφορετική οντογενετική προέλευση, λεπτή δομή και χημική σύσταση.

Η εσωτερική στοιβάδα της εφυμενίδας, η οποία ονομάζεται *εφυμενιδική στοιβάδα* (*cuticular layer, CL*) αποτελείται από ένα στρώμα κουτίνης το οποίο εμποτίζει τα κυτταρικά τοιχώματα των επιδερμικών κυττάρων. Η σύσταση της περιλαμβάνει επίσης λιπίδια και σημαντικές

εναποθέσεις πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων (**ΕΙΚΟΝΑ I.1**) (Jeffree, 1996).

Η εξωτερική στοιβάδα που είναι περισσότερο ευδιάκριτη ονομάζεται *εφυμενιδικό κλάσμα (cuticular proper, CP)*. Αποτελείται από στρώσεις διαλυτών λιπιδίων που εναλλάσσονται με στρώσεις κουτίνης με πολικό χαρακτήρα (**ΕΙΚΟΝΑ I.1**) (Jeffree, 1996).

Στην εξωτερική επιφάνεια του εφυμενιδικού κλάσματος δημιουργούνται εναποθέσεις κηρών (*επιεφυμενιδικοί κηροί*) οι οποίοι είτε είναι άμορφοι είτε, σχηματίζουν κρυσταλλικές προεκβολές (**ΕΙΚΟΝΑ I.1**). Κηροί βρίσκονται επίσης εμποτισμένοι στη στοιβάδα της κουτίνης (*ενδοεφυμενιδικοί κηροί*) (Jetter et al., 2000). Η μορφή των επιεφυμενιδικών κρυστάλλων είναι χαρακτηριστική για κάθε φυτικό είδος, γεγονός που επιτρέπει τη χρησιμοποίησή τους ως ταξινομικού κριτηρίου (Gülz, 1994; Barthlott et al., 1998).



Εικόνα I.1. Σχηματική αναπαράσταση εγκάρσιας τομής ώριμης εφυμενίδας (EWC: κρύσταλλοι επιεφυμενιδικών κηρών, WF: άμορφο στρώμα επιεφυμενιδικών κηρών CP: εφυμενιδικό κλάσμα, CL: εφυμενιδική στοιβάδα, PCW: πολυσακχαρίτες κυτταρικών τοιχωμάτων, CW: κυτταρικό τοίχωμα, CYS: κυστόλιθοι κουτίνης), (Jeffree, 1996).

I.3. Η χημική σύσταση της εφυμενίδας

Το κύριο δομικό συστατικό της εφυμενίδας των εναέριων φυτικών μερών και ορισμένων εσωτερικών ιστών όπως τα περιβλήματα των σπερμάτων και οι υποστοματικές κοιλότητες, είναι η κουτίνη. Πρόκειται

για ένα πολικό, διακλαδισμένο και υψηλού μοριακού βάρους πολυμερές, το οποίο δε διαλύεται σε οργανικούς διαλύτες. Επιπλέον η κουτίνη είναι άμορφη, χωρίς εμφανή κρυσταλλική διαμόρφωση. Από χημικής πλευράς είναι ένας πολυεστέρας που συνίσταται κυρίως από ύδροξυ και έποξυ λιπαρά οξέα με 16 και 18 άτομα C. Η κουτίνη των ταχέως αναπτυσσόμενων φυτών περιέχει κυρίως μονομερή των C₁₆ ενώ φυτά με αργούς σχετικά ρυθμούς ανάπτυξης συνήθως έχουν παχύτερη εφυμενίδα της οποίας η κουτίνη αποτελείται από μονομερή και των δύο ομάδων (C₁₆, C₁₈) (Kolattukudy, 1980).

Τέλος η χημική σύσταση της εφυμενίδας συμπληρώνεται από τους ενδοεφυμενιδικούς κηρούς (SCL ή διαλυτά λιπίδια της εφυμενίδας πλούσια σε τριτερπενικές ενώσεις) (Jetter et al., 2000) και τα διάσπαρτα μικροϊνίδια πολυσακχαριτών πιθανόν πηκτικής, κυτταρίνης και ημικυτταρίνης (Jeffree, 1996).

I.4. Η χημική σύσταση των επεφυμενιδικών κηρών

Εξ' ορισμού οι κηροί συνιστούν υδρόφοβα συστατικά της επιφάνειας των φύλλων τα οποία αφαιρούνται με σύντομη εμβάπτιση τους σε οργανικούς διαλύτες όπως είναι το n-εξάνιο και το χλωροφόρμιο. Πρόκειται για μίγματα πρωτοταγών λιπαρών οξέων μεγάλης αλειφατικής αλυσίδας (>C₁₈), αλκανίων (C₁₆- C₃₃), πρωτοταγών και δευτεροταγών αλκοολών, διολών, αλδεϋδών, κετονών, ύδροξυκετονών, βδικετονών, εστέρων (C₃₂-C₆₄), στερολών, τριτερπενικών ενώσεων και φλαβονοειδών (Post-Beittenmiller, 1996). Με βάση τον πρόσφατο διαχωρισμό των κηρών (Jetter et al., 2000) οι επεφυμενιδικοί κηροί χαρακτηρίζονται από υψηλότερο ποσοστό αλειφατικών συστατικών και χαμηλότερο τριτερπενικών ενώσεων, έναντι των ενδοεφυμενιδικών κηρών. Είναι ενδιαφέρον ότι το σχήμα και η όψη των κρυστάλλων που σχηματίζουν οι επεφυμενιδικοί κηροί καθορίζεται από τη μορφολογία του κρυστάλλου του κυρίαρχου χημικού συστατικού (Jetter and Riederer, 1994; Gültz, 1994; Meusel et al., 2000).

Οι αναλογίες των επιμέρους συστατικών ποικίλλουν σημαντικά ανάμεσα στα φυτικά είδη, αλλά και ανάμεσα σε όργανα και ιστούς του ίδιου

φυτού. Επίσης είναι δυνατό η χημική σύσταση των επεφυμενιδικών κηρών να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια ανάπτυξης ενός φυτικού οργάνου (Post-Beittenmiller, 1996). Ορισμένοι παράγοντες του περιβάλλοντος όπως η θερμοκρασία, η ένταση φωτισμού, η υπεριώδης ακτινοβολία και η θέση του οργάνου στο δένδρο έχει αναφερθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση και στη χημική σύσταση των κηρών (McDonald et al., 1993; El-Otmani and Coggins, 1985; Gordon et al., 1998; Rieley et al., 1995). Τέλος ο Gültz (1994) επισημαίνει ότι οι εξελικτικές πιέσεις έχουν ενδεχομένως επηρεάσει σημαντικά τη χημεία και τη μορφολογία των επεφυμενιδικών κηρών των διαφόρων φυτικών ειδών.

I.5. Η οντογένεση της εφυμενίδας

I.5.1. Η προεφυμενίδα (procuticle)

Στα πολύ πρώιμα στάδια της ανάπτυξης της επιδερμίδας τα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα στα ακραία μεριστώματα των βλαστών περιβάλλονται από μια ισχυρά υδρόφοβη και αδιαπέραστη από το νερό επίστρωση, η οποία στο ΗΜΔ εμφανίζεται ως μια πυκνή και άμορφη στοιβάδα πάχους περίπου 20 nm. Κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης του ακραίου μεριστώματος η προεφυμενίδα αυξάνει σε πάχος (30 nm) ενώ παράλληλα μειώνεται ελαφρώς η πυκνότητά της. Κατά το στάδιο αυτό σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο είδος εφυμενίδας που φαίνεται να συνίσταται από σφαιρικά συσσωματώματα. Στη συνέχεια ο παραπάνω σχηματισμός παίρνει τη γνωστή διαμόρφωση των διαδοχικών στρώσεων με πάχος 35-40 nm. Η δομή στο ΗΜΔ εμφανίζεται να αποτελείται από 2-3 ζεύγη από αλληπάλληλες στρώσεις έντονης ηλεκτρονιακής πυκνότητας που εναλλάσσονται με διαυγείς στρώσεις. Η μορφή αυτή της προεφυμενίδας αποτελεί τον πρόδρομο του εφυμενιδικού κλάσματος που πρόκειται να σχηματιστεί (Jeffree, 1996).

I.5.2. Το εφυμενιδικό κλάσμα (cuticular proper, CP)

Στη πλειοψηφία των φυτικών ειδών το εφυμενιδικό κλάσμα μιας ώριμης εφυμενίδας είναι κατασκευασμένο με τη μορφή αλληπάλληλων στρώσεων και έχει πάχος 50-150 nm. Περιλαμβάνει και αυτό, διαδοχικές στρώσεις από διαυγείς και έντονης ηλεκτρονιακής πυκνότητας περιοχές

(**ΕΙΚΟΝΑ I.1**). Η οντογένεση του εφυμενιδικού κλάσματος έχει μελετηθεί στο φυτό *Clivia miniata*. Στα αρχικά στάδια ανάπτυξης το εφυμενιδικό κλάσμα συνίσταται από δύο μόνο ζεύγη διαυγών και έντονης ηλεκτρονιακής πυκνότητας στρώσεων και από χημικής πλευράς δεν περιέχει εστέρες της κουτίνης. Κατά τη διάρκεια έκπτυξης του φύλλου το πάχος του CP αυξάνει και μπορεί να αποτελείται από 8-10 ζεύγη διαυγών και έντονης ηλεκτρονιακής πυκνότητας στρώσεων. Σε αυτή τη φάση ανάπτυξης στο CP περιέχονται και εστέρες της κουτίνης. Όταν το έλασμα του φύλλου έχει εκταθεί κατά εννέα φορές, σε απόσταση 5cm από τη βάση του, το CP έχει σχεδόν σταματήσει να εκτείνεται ενώ δεν παρατηρούνται νέα ζεύγη διαυγών και έντονης ηλεκτρονιακής πυκνότητας περιοχών (Riederer and Schönherr, 1988). Το πρότυπο αυτό ανάπτυξης δεν ακολουθείται από όλα τα φυτικά είδη. Για παράδειγμα το CP της ρώγας του σταφυλιού είναι άμορφο χωρίς να περιέχει κυτταρίνη ή άλλα υλικά προερχόμενα από τα κυτταρικά τοιχώματα και επιπλέον δεν εμφανίζει διαυγείς ή έντονης ηλεκτρονιακής πυκνότητας περιοχές (Casado and Heredia, 2001).

I.5.3. Η εφυμενιδική στοιβάδα (cuticular layer, CL)

Η εφυμενιδική στοιβάδα (CL) σχηματίζεται σε μια δεύτερη φάση έκκρισης αφού πλέον η έκπτυξη του φύλλου και η έκταση της επιδερμίδας έχει ολοκληρωθεί. Στα περισσότερα φυτικά είδη η ανάπτυξη του CP προηγείται από του CL. Η CL δημιουργείται κατά την ταχεία φάση έκπτυξης του φύλλου με την εναπόθεση κουτίνης μεταξύ των επιφανειακών στοιβάδων των πρωτογενών κυτταρικών τοιχωμάτων, ακριβώς κάτω από το CP (**ΕΙΚΟΝΑ I.1**). Η διαδικασία της δημιουργίας της CL γίνεται μέσω του σχηματισμού σφαιρικών κυστολίθων πλούσιων σε κουτίνη οι οποίοι πιθανόν προέρχονται από την κουτίνη η οποία έχει συσσωρευτεί σε πυρήνες στο κυτταρικό τοίχωμα (**ΕΙΚΟΝΑ I.1**) (Mérida et al.,1981). Στη συνέχεια τα σφαιρίδια συγχωνεύονται για να δημιουργήσουν ένα συνεχές πλέγμα το οποίο διατρέχεται από μικροϊνίδια πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων (**ΕΙΚΟΝΑ I.1**).

1.5.4. Οι επιεφυμενιδικοί κηροί

Κατά το παρελθόν υπήρχε η εντύπωση ότι οι επιεφυμενιδικοί κηροί εξωθούνται από τα βαθύτερα στρώματα στην επιφάνεια μέσω πόρων που διατρέχουν την εφυμενίδα (Machado and Barros, 1995). Ωστόσο σήμερα με τη χρήση του ΗΜΔ δεν έχει επιβεβαιωθεί κάτι ανάλογο και επιπλέον δεν έχουν παρατηρηθεί δομές που θα μπορούσαν να συσχετιστούν με τη σύνθεση των επιεφυμενιδικών κηρών. Η ανίχνευση πρωτεϊνών που μεταφέρουν ακύλια στους επιεφυμενιδικούς κηρούς (Pyee et al., 1994) πιθανόν να ενισχύει την υπόθεση ύπαρξης πρωτεϊνών μεταφορέων των λιπιδίων προς την εφυμενίδα. Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα λιπίδια των κηρών ουσιαστικά παρασύρονται από τα μόρια του νερού και συµμεταφέρονται με αυτά μέσω του διαπνευστικού ρεύματος από το εσωτερικό του φύλλου προς την επιφάνεια όπου συσσωρεύονται, σχηματίζοντας τους επιεφυμενιδικούς κηρούς. Οι υψηλές εναποθέσεις κηρών που παρατηρούνται στα νεαρά φύλλα ενδεχοµένως να οφείλονται στο γεγονός ότι η εφυμενίδα τους επιτρέπει σχετικά εύκολα την κίνηση των μορίων νερού διαμέσου αυτής και συνεπώς λόγω της μεγαλύτερης διαπνευστικής ταχύτητας προκαλείται εντονότερη εναπόθεση επιεφυμενιδικών κηρών (Neinhuis et al., 2001).

Ορισμένα φυτά έχουν την ικανότητα να αναγεννούν το στρώμα των επιεφυμενιδικών κηρών όταν αυτό έχει αλλοιωθεί από δυσμενείς παράγοντες του περιβάλλοντος. Έχει παρατηρηθεί ότι η κρυσταλλική δομή των αναγεννηµένων κηρών διαφέρει σηµαντικά από αυτή των προϋπαρχόντων κηρών. Επιπλέον κατά τη φάση έκπτυξης του φύλλου η εναπόθεση των κρυστάλλων των κηρών ακολουθεί ένα συγκεκριµένο χωροταξικό µοντέλο το οποίο διαφέρει σηµαντικά από το αντίστοιχο το οποίο παρατηρείται σε περίπτωση αναγέννησης (Neinhuis et al., 2001).

1.5.5. Διάταση της εφυμενίδας

Κατά την ανάπτυξη των οργάνων, όταν τα επιδερμικά κύτταρα εκτείνονται η εφυμενίδα υφίσταται σηµαντικές αλλαγές στην επιφάνεια της. Σε πολλές περιπτώσεις η εφυμενίδα που καλύπτει νεαρά αναπτυσσόµενα όργανα παρουσιάζει σχετικά χαλαρή δομή και ρυτιδωµένη διαµόρφωση ώστε

να μπορεί να καλύψει τις ανάγκες αύξησης της επιφάνειας της υποκείμενης επιδερμίδας (Rosenquist, et al., 1988). Στη διάρκεια λοιπόν αύξησης του οργάνου, η εφυμενίδα διατάσσεται και η ρυτίδωση εξαφανίζεται. Η ρυτίδωση παρατηρείται κυρίως κατά τα πρώτα στάδια αύξησης του οργάνου, φαίνεται δε ότι αποτρέπει το σχίσμο της εφυμενίδας κατά την ταχύτερη φάση ανάπτυξης.

I.6. Λειτουργικοί ρόλοι εφυμενίδας

I.6.1. Ρύθμιση απωλειών νερού

Ένας από τους σημαντικότερους φυσιολογικούς ρόλους της εφυμενίδας είναι η προστασία των φυτικών ιστών από την αφυδάτωση. Η ρύθμιση των απωλειών νερού από την εφυμενίδα πραγματοποιείται μέσω της ελεγχόμενης περατότητας της από τα μόρια του νερού. Η αντίσταση στη διάχυση των μορίων νερού προβάλλεται κυρίως από το κλάσμα των διαλυτών λιπιδίων (κηροί). Εάν αυτά αφαιρεθούν με χλωροφόρμιο, η περατότητα της εφυμενίδας στο νερό αυξάνει κατά 2-3 τάξεις μεγέθους (Schönherr, 1976). Επιπλέον οι κηροί εξαιτίας της καλά οργανωμένης διάταξης τους και της στερεής, κρυσταλλικής δομής που εμφανίζουν, αποτελούν ένα αποτελεσματικό εμπόδιο στη μεταφορά και στην κίνηση όχι μόνο μορίων νερού, αλλά και ιόντων και οργανικών ενώσεων διαμέσου της εφυμενίδας (Reynhardt and Riederer, 1994). Ωστόσο για την περατότητα της εφυμενίδας δεν ευθύνεται ούτε η ποσότητα (Larsson and Svenningsson, 1986), ούτε η χημική σύσταση των κηρών (Riederer and Schneider, 1990). Η αξιολόγηση της ικανότητας της εφυμενίδας να περιορίζει τις απώλειες νερού πειραματικά πραγματοποιείται με τον υπολογισμό των συντελεστών διάχυσης απομονωμένων εφυμενίδων (Schreiber and Riederer, 1996). Από ανατομική άποψη το κύριο φράγμα στη διάχυση των μορίων φαίνεται ότι αποτελεί μια στενή ζώνη της εφυμενίδας που είναι πλούσια σε κηρούς με υψηλή οργάνωση. Η περιοχή αυτή μπορεί να διακριθεί σε τρεις επιμέρους στοιβάδες οι οποίες διαφέρουν ως προς τη διαμόρφωση των μορίων των κηρών που περιέχουν (κρυσταλλική στοιβάδα, στερεή-άμορφη στοιβάδα, κινητή-άμορφη στοιβάδα). Η κρυσταλλική στοιβάδα θεωρείται σχεδόν

αδιαπέραστη για τα μόρια του νερού και η διάχυση συντελείται κυρίως μέσω των δύο άλλων στοιβάδων. Όσο μεγαλύτερα είναι τα αλειφατικά τμήματα των συστατικών των κηρών τόσο περισσότερο άμορφο είναι το υλικό και τόσο πιο αποτελεσματική είναι η διάχυση (Kerstiens, 1996a).

Ο διαφορετικός τρόπος μεταφοράς των μορίων από το φράγμα των κηρών, διαμορφώνει την ποικιλομορφία που εμφανίζει η εφυμενίδα στη διάχυση των μορίων (Schreiber et al., 1996). Η διάχυση των μορίων διαμέσου του φράγματος των κηρών δε φαίνεται να εξαρτάται από το μέγεθος και την πολικότητα τους (Bucholz et al., 1998), αλλά κυρίως από τη διαλυτότητα τους (Schreiber et al., 1996). Εκτός αυτού παρατηρείται ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του πάχους της εφυμενίδας και της αντίστασης που εμφανίζει στη διάχυση του νερού (Becker et al., 1986). Η θερμοκρασία ευνοεί τη διάχυση των μορίων γιατί αυξάνει τη ρευστότητα των άμορφων κηρών και επιπλέον μειώνει την εκλεκτικότητα τους ως προς τα διαχεόμενα μόρια (Baur et al., 1997).

Η περατότητα της εφυμενίδας από το νερό φαίνεται να είναι χαρακτηριστικό που προσαρμόζεται ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος στις οποίες διαβιεί το κάθε φυτό π.χ η εφυμενίδα των ξηροφυτικών ειδών εμφανίζει ισχυρή αντίσταση στη διάχυση των μορίων του νερού. Τα φυτά αυτά αναπτύσσονται σε συνθήκες οι οποίες ευνοούν τις απώλειες νερού από τα φυτικά όργανα, ενώ το νερό αποτελεί περιοριστικό παράγοντα.

1.6.2. Συμβολή στη διαμόρφωση των οπτικών ιδιοτήτων των φύλλων

Η εναπόθεση των κηρών στην επιφάνεια των φύλλων είναι δυνατόν να επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τις οπτικές ιδιότητες των φύλλων. Μάλιστα οι Grant et al. (1995) και Johnson et al. (1983) έδειξαν ότι υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ της ακτινοβολίας που ανακλάται από τα φύλλα με την ποσότητα ή/και τη λεπτή δομή των επεφυμενιδικών κηρών που υπάρχουν στα φύλλα. Κατά συνέπεια οι επεφυμενιδικοί κηροί επηρεάζουν τις αδρές οπτικές ιδιότητες των φύλλων.

I.6.2.α. Ανάκλαση

Οι επιφάνειες των φύλλων που φέρουν ένα επιφανειακό περίβλημα άμορφων κηρών ή μια επιφανειακή στρώση κρυσταλλικών κηρών, συμπεριφέρονται ως μία τυπική οπτικά αδρή επιφάνεια (δηλαδή μια επιφάνεια της οποίας οι ανομοιομορφίες παρουσιάζουν μέγεθος συγκρίσιμο με το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας) και ως εκ τούτου, ανακλούν το φως κατοπτρικά. Ο τύπος αυτός ανάκλασης είναι η αιτία που μερικές φορές ορισμένες καλλιέργειες είναι δυνατόν να εμφανίζονται λευκές όταν παρατηρηθούν υπό πλάγια, μη κανονική, γωνία. Το ποσοστό, η κατεύθυνση, και ο βαθμός της πόλωσης της ανακλώμενης ακτινοβολίας εξαρτώνται από τη γωνία πρόσπτωσης, την αδρότητα της επιφάνειας και τον δείκτη διάθλασης των κηρών της επιφάνειας. Όταν η ακτινοβολία προσπίπτει στο φύλλο υπό κανονική γωνία (90°), η συνεισφορά της κατοπτρικής ανάκλασης στην ολική ανάκλαση είναι περιορισμένη (Barnes and Cardoso-Vilhena, 1996).

I.6.2.β. Σκέδαση

Το μέγεθος, η κατανομή και ο προσανατολισμός των κρυσταλλικών εναποθέσεων των κηρών προσδιορίζει το ποσοστό σκέδασης και τον βαθμό της πόλωσης τον οποίο θα υποστεί η προσπίπτουσα ακτινοβολία. Όταν οι αποστάσεις των διογκώσεων της επιφάνειας είναι της ίδιας τάξης μεγέθους ή μεγαλύτερες του μήκους κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, η σκεδαζόμενη ακτινοβολία πολώνεται εν μέρει και διαχέεται προς όλες τις κατευθύνσεις. Όταν οι διογκώσεις της επιφάνειας έχουν διαστάσεις αρκετά μικρότερες από το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και εφόσον τα σωματίδια είναι διασκορπισμένα σε όλη την επιφάνεια, παρατηρείται το φαινόμενο του Rayleigh για τη σκέδαση του φωτός. Σε αυτή την περίπτωση η σκεδαζόμενη ακτινοβολία πολώνεται κατά 90° σε σχέση με την προσπίπτουσα, ενώ μερικώς πολώνεται και κατά άλλες γωνίες και τελικά εμπλουτίζεται με φωτόνια της μπλε περιοχής του φάσματος. Δεδομένου ότι οι ανωμαλίες και οι κρύσταλλοι των κηρών παρουσιάζουν κατά κανόνα τις παραπάνω διαστάσεις και επιπλέον σχηματίζουν ένα πυκνό και διακλαδισμένο δίκτυο κρυστάλλων, παρουσιάζουν σημαντικό σκεδασμό,

ο οποίος σε ορισμένες περιπτώσεις προσδίδει μια γαλάζια-ανοικτή απόχρωση σε φύλλα και καρπούς (Barnes and Cardoso-Vilhena, 1996).

I.6.3. Προστασία από ακτινοβολίες

I.6.3.α. UV (280-400nm)

Οι φυτικοί οργανισμοί εκτός της φωτοσυνθετικά ενεργούς ηλιακής ακτινοβολίας (PAR) είναι αναγκασμένοι να εκτίθενται σε εντάσεις υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) που πέρα από κάποιο όριο είναι ιδιαίτερα επιβλαβείς. Για τον σκοπό αυτό έχουν αναπτύξει ποικίλους μηχανισμούς άμυνας απέναντι στην υπεριώδη ακτινοβολία. Η εφυμενίδα και τα υπόλοιπα επιδερμικά εξαρτήματα δε φαίνεται να ανακλούν παρά μόνο το 10% της προσπίπτουσας υπεριώδους ακτινοβολίας (Robberecht et al., 1980, Gonzalez et al., 1996). Εξαιρέση αποτελούν ορισμένα φυτικά είδη στα οποία η δομή των επιεφυμενιδικών κηρών ευνοεί τη σκέδαση ή/ και την ανάκλαση ενός σημαντικού ποσοστού της προσπίπτουσας UV-B ακτινοβολίας (Robberecht et al., 1980; Gausman, 1975). Για παράδειγμα στο φυτό *Dudleya* παρουσία αυξημένων επιπέδων UV-B ακτινοβολίας παρατηρείται συσσώρευση κηρών, η οποία αυξάνει την ανακλαστικότητα κατά 25%, ποσοστό το οποίο υπερβαίνει το αντίστοιχο για την PAR (Mulroy, 1979).

Η μέτρηση με οπτικές ίνες της υπεριώδους ακτινοβολίας που εισχωρεί στο φύλλο έδειξε ότι η είσοδος της προς το μεσόφυλλο, ανακόπτεται σε πολύ μεγάλο βαθμό από εξωτερικούς ιστούς του φύλλου όπως είναι τα επιδερμικά κύτταρα και η εφυμενίδα (Alenius et al., 1995). Για αυτό τον λόγο η έρευνα έχει εστιαστεί στη μελέτη ουσιών που απορροφούν στο UV και εντοπίζονται κυρίως στην επιδερμίδα, στην εφυμενίδα και τους επιεφυμενιδικούς κηρούς. Φλαβονοειδή, απλά φαινολικά, αλειφατικοί εστέρες του *p*-κουμαρικού οξέος, ύδροξυκινναμικό οξύ και ορισμένες χρωστικές είναι ενώσεις που απορροφούν ισχυρά στο UV και βρίσκονται στην εφυμενίδα δεσμευμένες ή μη, στο πλέγμα της κουτίνης, στους ένδο και επιεφυμενιδικούς κηρούς (Riley and Kollatukudy, 1975, Wollenweber, 1982, Krauss et al., 1997, Liakopoulos et al., 2001).

Η παρουσία αυξημένων επιπέδων UV ακτινοβολίας σε ορισμένα φυτά είναι δυνατόν να διεγείρει την παραγωγή επιεφυμενιδικών κηρών κυρίως

στην προσαξονική επιφάνεια, να μεταβάλλει τη χημική τους σύσταση και να αυξήσει την υδροφοβικότητα της εφυμενίδας (Barnes et al., 1994, Barnes et al., 1996, Gonzalez et al., 1996). Οι μεταβολές στη χημική σύσταση των κηρών που επιφέρουν αύξηση της ανακλαστικότητας της επιφάνειας του φύλλου του καπνού, ενδεχομένως ενισχύουν την άμυνα έναντι της UV (Barnes et al., 1996; Gordon et al., 1998). Στο Μεσογειακό οικοσύστημα όπου οι υψηλές εντάσεις υπεριώδους ακτινοβολίας συνοδεύονται από υψηλές θερμοκρασίες και περιορισμένη διαθεσιμότητα νερού, αυξημένα επίπεδα υπεριώδους ακτινοβολίας είναι δυνατόν να προκαλέσουν αύξηση του πάχους της εφυμενίδας σε ορισμένα φυτικά είδη. Το γεγονός αυτό σχετίζεται με την προστασία των ιστών του μεσοφύλλου από την υπεριώδη ακτινοβολία αλλά και με τον περιορισμό των απωλειών νερού μέσω της εφυμενίδας (Drilias et al., 1997; Manetas et al., 1997).

Κατά κανόνα οι εφυμενίδες από ξυλώδη, πολυετή φυτά (φυλλοβόλα και αειθαλή) παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα συγκράτησης της υπεριώδους ακτινοβολίας έναντι αυτών των μονοετών ποωδών φυτών. Το γεγονός αυτό πιθανόν να σχετίζεται με τη διάρκεια ζωής και το κόστος κατασκευής των φύλλων, καθώς επίσης και τη χρονική περίοδο κατά την οποία αυτά αναπτύσσονται (Krauss et al., 1997).

I.6.3.β. Ορατή ακτινοβολία (400-700nm)

Στα περισσότερα φυτικά είδη η εφυμενίδα παρουσιάζει σημαντική ανακλαστικότητα στην ορατή περιοχή του φάσματος. Η ύπαρξη παχιάς εφυμενίδας στα φύλλα φυτών που διαβιούν σε ξηροθερμικές περιοχές (δηλαδή παρουσία υψηλών εντάσεων ακτινοβολίας) σχετίζεται πιθανόν και με την προστασία από την ακτινοβολία (Hoque and Renuis, 1996; Grant et al., 1995). Σε ορισμένες ακραίες περιπτώσεις η στοιβάδα των επεφυμενιδικών κηρών φαίνεται ότι προστατεύει τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό από φωτοαναστολή, όπως π.χ. στο φυτό CAM *Cotyledon orbiculata*. Το συγκεκριμένο φυτό παράγει πολύ μεγάλες ποσότητες κηρών οι οποίες όταν αφαιρεθούν, η απορρόφηση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας αυξάνει κατά 50% με αποτέλεσμα να προκαλείται άμεση μείωση του λόγου

Fv/Fm (ένδειξη δυσλειτουργίας του PSII), και ταυτόχρονα να σημειώνεται μια πτώση της συγκέντρωσης των χλωροφυλλών (Robinson et al., 1994).

I.6.3.γ. Υπέρυθρη ακτινοβολία (700-3000 nm)

Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές δεν απορροφούν στην υπέρυθρη περιοχή του φάσματος γι' αυτό η απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας εξαρτάται αποκλειστικά από τη δομή του φύλλου και το περιεχόμενο του σε νερό. Φυτά από τα οποία αφαιρέθηκε η στοιβάδα των επεφυμενιδικών κηρών έδειξαν αυξημένη απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας η οποία συνοδεύονταν και από αύξηση της θερμοκρασίας του φύλλου. Η αύξηση της θερμοκρασίας που παρουσιάστηκε συντέλεσε στην αύξηση της ταχύτητας διαπνοής του φυτικού ιστού (Johnson, 1983; Jefferson, 1989).

I.6.4. Προστασία έναντι παθογόνων

Η εφυμενίδα αποτελεί το πρώτο φυσικό εμπόδιο που συναντά το παθογόνο στην προσπάθεια του να προσβάλλει το φυτό-ξενιστή, και ως εκ τούτου παίζει σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων. Η συμβολή της εφυμενίδας στην άμυνα του φυτού είναι πολυδιάστατη και σχετίζεται με τη μορφολογία της, τη χημική της σύσταση, την περατότητα που εμφανίζει σε διάφορες ουσίες και τη διαβρεξιμότητα της.

Δεδομένου ότι η εφυμενίδα συνιστά μια υδρόφοβη επιφάνεια, διαμορφώνει ένα δυσμενές περιβάλλον για τη βλάστηση σπορίων μυκήτων που απαιτούν υψηλά ποσοστά υγρασίας. Επιπλέον ο υδρόφοβος χαρακτήρας της δυσχεραίνει τις προσπάθειες των μολυσματικών μορφών των μυκήτων να προσκολληθούν στην επιφάνεια των φυτών και να διεισδύσουν στον φυτικό ιστό. Πειραματικοί χειρισμοί με επάλειψη σταφυλιών με διαβρεκτικές ουσίες οδήγησαν σε αλλοίωση τη μορφολογία των επεφυμενιδικών κηρών και σε μείωση της υδροφοβικότητας της εφυμενίδας, με αποτέλεσμα πλέον οι καρποί να είναι επιρρεπείς σε μολύνσεις από *Botrytis cinerea* (Marois et al., 1985).

Το πάχος της εφυμενίδας, η εναπόθεση και η μορφολογία των επεφυμενιδικών κηρών, αποτελούν πρόσθετα εμπόδια για την εισχώρηση των υφών των μολυσματικών μορφών μυκήτων. Η αυξημένη ευαισθησία που δείχνουν οι ώριμοι καρποί της ποικιλίας αμπέλου Pinot, έναντι του

Botrytis cinerea πιθανόν να σχετίζεται με το μειωμένο πάχος της εφυμενίδας και την αλλαγή της μορφολογίας των κρυσταλλικών κηρών που συμβαίνουν κατά την ωρίμανση. Οι μεταβολές αυτές προκαλούν αλλοίωση της συνοχής της επιφάνειας και δημιουργία ρωγμών, από τις οποίες εισχωρούν οι υφές του μύκητα (Comménil et al., 1997). Ομοίως η αδυναμία του *Botrytis cinerea* να προσβάλλει τα πέταλα των ρόδων της ανθεκτικής ποικιλίας Royalty φαίνεται να οφείλεται στην παχύτερη εφυμενίδα που καλύπτει την επιφάνεια τους (Hammer and Evensen, 1994). Τέλος η ανθεκτικότητα του περικαρπίου του καλαμποκιού στον *Aspergillus flavus* οφείλεται στην εντονότερη εναπόθεση κηρών και την τραχεία όψη που εμφανίζουν, έναντι των φυτών του ευαίσθητου γονότυπου (Russin et al., 1997).

Οι μεταβολές στη χημική σύσταση της εφυμενίδας και των επεφυμενιδικών κηρών οι οποίες παρατηρούνται κατά την ανάπτυξη φυτικών οργάνων πιθανόν επηρεάζουν την ανθεκτικότητα τους έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων. Τα νεαρά και τα ώριμα περικάρπια μπαμπακιού παρουσιάζονται ευαίσθητα έναντι προσβολών του μύκητα *Penicillium spinulosum*, αντίθετα προς τα περικάρπια ενδιάμεσων ηλικιών. Η ανθεκτικότητα αυτή οφείλεται πιθανόν στην περιεκτικότητα της κουτίνης σε κηρούς και αλειφατικά οξέα στην εφυμενίδα των περικαρπίων ενδιάμεσης ηλικίας (Wang and Pinckard, 1973). Η εφυμενίδα σε ορισμένες περιπτώσεις περιέχει μυκοτοξικές ουσίες (όπως π.χ. οι ντουβατριενόλες στα καπνά), των οποίων η συγκέντρωση αυξάνεται κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των φύλλων (Gevens and Nicholson, 2000). Οι ουσίες αυτές παρεμπόδιζαν την ταχεία αύξηση του παθογόνου *Peronospora tabacina*, χωρίς ωστόσο να αποτρέπουν πλήρως την προσβολή του ξενιστή (Rao et al., 1989). Ορισμένα μονομερή της κουτίνης είναι δυνατόν να ασκούν παρεμποδιστική δράση έναντι παθογόνων όπως π.χ. το 9-εξανοδεκανοϊκό οξύ, το οποίο προέκυψε από την εισαγωγή του γονιδίου της Δ-9 αποκορεσμάσης στο γονιδίωμα της τομάτας (Wang et al., 2000). Τέλος οι φαινολικές ουσίες που υπάρχουν στην εφυμενίδα καθώς και ορισμένα αλειφατικά οξέα των επεφυμενιδικών κηρών μπορούν εν δυνάμει να δράσουν ως μυκοτοξικές ουσίες.

Ο περιορισμός της διάχυσης συστατικών από το εσωτερικό των κυττάρων προς την επιφάνεια αποτελεί έναν έμμεσο μηχανισμό προστασίας των φυτών από τα παθογόνα. Οι επιφυτικοί μύκητες *Peltaster fruticola* και *Leptodontidium elatius* αναπτύσσονται στη επιφάνεια καρπών μήλων, όπου βρίσκουν θρεπτικά στοιχεία (κυρίως υδατάνθρακες) και νερό, τα οποία διαχέονται μέσω της εφυμενίδας από το εσωτερικό των κυττάρων προς την επιφάνεια (Belding et al., 2000). Ορισμένα επίσης συστατικά τα οποία εξέρχονται από το εσωτερικό των οργάνων προς την επιφάνεια της εφυμενίδας, είναι δυνατόν να αποτελούν το ερέθισμα για τον μύκητα *Rhizoctonia solani* να προσβάλει τον ξενιστή. Συνεπώς εάν η εφυμενίδα προβάλλει ισχυρή αντίσταση στη διάχυση των ουσιών, εμμέσως παρεμποδίζεται και η εξάπλωση των παρασίτων (Stockwell and Hanchey, 1983).

Παρ' όλον ότι η εφυμενίδα αντιπροσωπεύει έναν ισχυρό μηχανισμό άμυνας έναντι των παθογόνων, ορισμένα τουλάχιστον παθογόνα έχουν αναπτύξει το δικό τους οπλοστάσιο ώστε να κάμψουν το εμπόδιο αυτό. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα μόλυσμα των μυκήτων είναι εφοδιασμένα με κατάλληλα ένζυμα όπως εστεράσες και κουτινάσες τα οποία υδρολύουν τους επιεφυμενιδικούς κηρούς και το πολυμερές της κουτινής (Kolattukudy et al., 1981). Η έκκριση στο περιβάλλον αλειφατικών συστατικών προερχόμενα είτε από τους κηρούς ή από την κουτίνη προκαλεί τη φωσφορυλίωση ορισμένων πρωτεϊνών που ενεργοποιούν τη μεταγραφή γονιδίων για τον σχηματισμό των απρεσοριών από τον μύκητα. Οι ουσίες που επάγουν τον σχηματισμό απρεσοριών είναι μοναδικές για κάθε μύκητα και καθορίζουν την εξειδικευμένη αλληλεπίδραση μεταξύ φυτού και παρασίτου (Polida et al., 1993). Οι εστεράσες και οι κουτινάσες αφενός προκαλούν υδρόλυση στα συστατικά της εφυμενίδας και εξασθένιση του μηχανικού φράγματος, αφ' ετέρου δημιουργούν πιο ευνοϊκό-υδρόφιλο περιβάλλον για την ανάπτυξη των μυκήτων (Deising et al., 1992). Ορισμένες πρωτεΐνες των κυτταρικών τοιχωμάτων των υφών ορισμένων μυκήτων (υδροφοβίνες) δημιουργούν μια αμφιπαθή στοιβάδα μεταξύ των τοιχωμάτων της βλαστικής υφής και του μύκητα (Mendgen et al., 1996).

I.6.5. Προστασία έναντι εντόμων

Κατά την πρώτη επαφή ενός εντόμου με την επιφάνεια ενός φύλλου το έντομο προχωρά σε αναγνώριση της φυλλικής επιφάνειας ούτως ώστε να διαπιστωθεί εάν οι συνθήκες ευνοούν την εκμετάλλευση του συγκεκριμένου φυτού ως ξενιστή. Ορισμένες ουσίες οι οποίες βρίσκονται στην επιφάνεια του φύλλου παίζουν το ρόλο του μηνύματος αποθαρρύνοντας ή ενθαρρύνοντας τον ξενιστή να τραφεί ή να εναποθέσει τα αυγά του στο φύλλο. Τελικά το φυτοφάγο έντομο επιλέγει ή απορρίπτει το συγκεκριμένο φύλλο με βάση τη λεπτή δομή της επιφάνειας του φύλλου, τα χημικά σήματα που λαμβάνει από αυτή και τέλος τις οπτικές ιδιότητες της.

Η ποσότητα των επεφυμενιδικών κηρών που φέρει ένα φύλλο στην επιφάνεια του και η λεπτή δομή των επεφυμενιδικών κρυστάλλων διαμορφώνουν τις συνθήκες για την προσκόλληση ενός εντόμου σε ένα συγκεκριμένο φύλλο. Κατά κανόνα τα φυτοφάγα έντομα προτιμούν στιλπνούς φαινοτύπους με περιορισμένη εναπόθεση κηρών και πυκνότητα κρυστάλλων. Οι συνθήκες πρόσφυσης στην επιφάνεια του φύλλου επηρεάζουν τη συμπεριφορά των εντόμων όσο αφορά στη νύξη των φύλλων και στην εναπόθεση των ωών τους π.χ. η δυσκολία στην κίνηση που προκαλεί ένας φυσικός φαινότυπος σε σχέση με τον στιλπνό, υποχρεώνει ορισμένα φυτοφάγα να περιορίζουν την αναζήτηση τροφής μόνο στα περιθώρια των φύλλων ενώ στον στιλπνό εξαπλώνονται σε όλη την επιφάνεια (Bodnaryk, 1992; Hopkins et al., 1997). Εκτός αυτού, εάν λειανθεί τεχνητά η επιφάνεια των φύλλων του φυτού *Brassica oleracea* και απομακρυνθούν οι κρύσταλλοι των επεφυμενιδικών κηρών, αυξάνει η τάση για ωσθέτηση από τα φυτοφάγα *Plutella xylostella* και *Delia radicum* (Eigenbrode and Espelie, 1995).

Συστατικά τα οποία περιέχονται στο κλάσμα των επεφυμενιδικών κηρών είναι δυνατόν να έλκουν ή να απωθούν ένα φυτοφάγο έντομο τόσο κατά την εναπόθεση των ωών του, όσο και κατά την κατανάλωση του φύλλου. Τέτοιου είδους ρόλους παίζουν συνήθως αλειφατικές και τριτερπενοειδείς ενώσεις καθώς και πολικά συστατικά της εφυμενίδας (Sephherd et al., 1999). Για παράδειγμα υψηλά επίπεδα μιας αλειφατικής

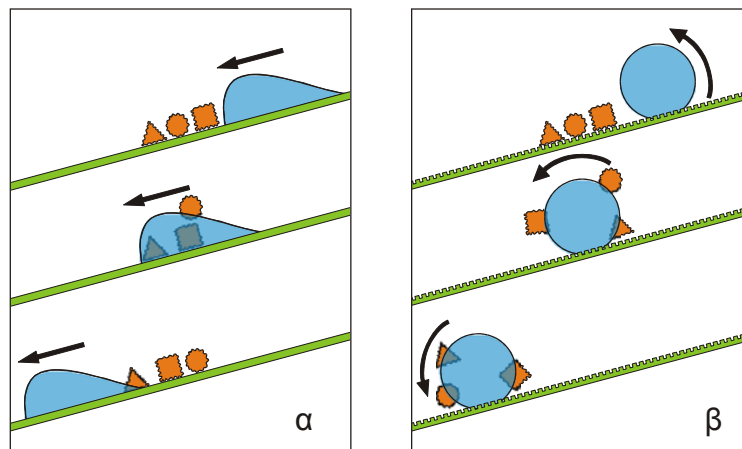
αλκοόλης (C₃₀) προκαλούν μείωση της μύζησης της μηδικής από την αφίδα *Therioaphis maculata* (Bergman et al., 1991), ενώ αντίθετα η αφίδα *Acyrtosiphon pisum* έλκεται από ορισμένα *n*-αλκάνια (C₂₇, C₂₉, C₃₁ και C₃₃) των επεφυμενιδικών κηρών του πίσσου. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η ανθεκτικότητα που εμφανίζουν ορισμένα φυτά έναντι εντόμων, σχετίζεται με την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων των τριτερπενοειδών της α και β αμυρίνης στο κλάσμα των επεφυμενιδικών κηρών (Eigenbrode and Espelie, 1995).

Τροποποίηση της λεπτής δομής των επεφυμενιδικών κηρών μπορεί να επιφέρει αλλοίωση των οπτικών σημάτων που αντιλαμβάνονται τα έντομα από τις επιφάνειες των φύλλων. Το φάσμα ανάκλασης των φύλλων εμφανίζεται εμπλουτισμένο στην κίτρινη-πράσινη περιοχή του φάσματος. Επομένως η φασματική αυτή περιοχή είναι ιδιαίτερα ελκυστική για τα έντομα, σε αντίθεση με το λευκό φως που ανακλά η επιφάνεια των φύλλων της ελαιοκράμβης όταν είναι πλούσια σε εναποθέσεις επεφυμενιδικών κηρών (Procory et al., 1983).

Είναι ευνόητο ότι διαφορές στη χημική σύσταση και τη λεπτή δομή των επεφυμενιδικών συστατικών των φύλλων μπορούν να επηρεάσουν και τη συμπεριφορά των αρπακτικών και των παρασιτοειδών των εντόμων. Τα αρπακτικά π.χ. παρουσιάζουν όμοια συμπεριφορά με τα φυτοφάγα, αφού προτιμούν επιφάνειες που διευκολύνουν την ωθέτηση και τη θήρευση παρέχοντας ευκολία στη μετακίνηση τους πάνω στο φύλλο. Κατά συνέπεια τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της επιφάνειας των φύλλων μπορούν να διαμορφώσουν τη σχετική αναλογία των αρπακτικών και των θηραμάτων τους και τελικά να καθορίσουν την ευαισθησία του φυτού προς ορισμένα φυτοφάγα έντομα (White and Eigenbrode, 2000). Το γεγονός ότι σε ορισμένες περιπτώσεις ο εξωσκελετός φυτοφάγων εντόμων παρουσιάζει όμοια σύσταση λιπιδίων με αυτήν των επεφυμενιδικών κηρών, σχετίζεται ενδεχομένως με την άμυνα προς τα αρπακτικά είδη (Eigenbrode and Espelie, 1995).

1.6.6. Υδροφοβικότητα της εφυμενίδας και αυτοκαθαρισμός (self cleaning) της επιφάνειας του φύλλου

Η υδροφοβικότητα της εφυμενίδας αποτελεί ένα σημαντικό φυσικοχημικό χαρακτήρα ο οποίος καθορίζει σε μεγάλο ποσοστό την επιβίωση του φυτού στο περιβάλλον του. Ο τρόπος με τον οποίο ένας δεδομένος όγκος νερού εξαπλώνεται στην επιφάνεια των φύλλων περιγράφεται από τη γωνία επαφής που σχηματίζεται από την εφαιπτομένη στην επιφάνεια της σταγόνας με την εφαιπτομένη στην επιφάνεια του φύλλου στο σημείο επαφής (Butler, 1996). Σε ισχυρά υδρόφοβες επιφάνειες το νερό έχει την τάση να συγκροτεί σφαιρικές σταγόνες που απομακρύνονται από το φύλλο με μια κλίση μόλις 5°. Σε λιγότερο υδρόφοβες επιφάνειες οι γωνίες επαφής των σταγόνων νερού είναι μικρότερες των 70° και αποκτούν ημισφαιρικό σχήμα ενώ αποχωρίζονται από την επιφάνεια του φύλλου εάν η κλίση πάρει τιμές 10°-30° ή/και μεγαλύτερες (ΕΙΚΟΝΑ 1.2) (Barthlott and Neinhuis, 1997).



Εικόνα 1.2. Σχηματική εικόνα που περιγράφει τη σύνδεση μεταξύ της τραχύτητας της επιφάνειας του φύλλου και του φαινομένου του αυτοκαθαρισμού. Όταν η επιφάνεια είναι σχετικά λεία (α) τα σωματίδια κυρίως ανακατανέμονται από το νερό ενώ όταν η επιφάνεια είναι αδρή (β) τα σωματίδια προσκολλώνται στην επιφάνεια της σταγόνας και αφαιρούνται από το φύλλο καθώς η σταγόνα κυλάει (Barthlott and Neinhuis, 1997).

Η υδροφοβικότητα της φυλλικής επιφάνειας διαμορφώνεται κυρίως από τη στοιβάδα των επεφυμενιδικών κηρών και τις προεκβολές των κρυστάλλων που σχηματίζονται. Εκτός αυτού, η ύπαρξη στρώματος τριχών, οι τυχόν αναδιπλώσεις της εφυμενίδας, η μορφολογία των επιδερμικών κυττάρων και χαρακτηριστικά τα οποία επηρεάζουν την τραχύτητα ή τη

στιλπνότητα της επιφάνειας αποτελούν σημαντικούς παράγοντες οι οποίοι επιδρούν στο βαθμό υδροφοβικότητας (Barthlott and Neinhuis, 1997). Η παρουσία επιφυτικών μικροοργανισμών στη φυλλική επιφάνεια την καθιστά περισσότερο υδρόφιλη, ενώ το pH αποτελεί πρόσθετο παράγοντα ρύθμισης του χαρακτηριστικού αυτού (Knoll and Schreiber, 1998). Η ύπαρξη υδροφοβικότητας της επιφάνειας των φύλλων ακολουθεί δύο κυρίως αναπτυξιακά πρότυπα: σε ορισμένα φυτικά είδη παρουσιάζεται ισχυρή υδροφοβικότητα μόνο κατά τα αρχικά στάδια έκπτυξης των φύλλων ενώ στα άλλα τα φύλλα παρουσιάζουν μόνιμη υδροφοβικότητα. Στην τελευταία περίπτωση τα φύλλα διαθέτουν την ικανότητα να ανανεώνουν τους κηρούς όταν καταστρέφονται από βροχοπτώσεις και άλλες αιτίες που προκαλούν απολεπίσεις της επιφάνειας (Neinhuis and Barthlott 1997).

Η ικανότητα απομάκρυνσης αιωρούμενων σωματιδίων (σκόνη, κονίδια-σπόρια μυκήτων) από την επιφάνεια των φύλλων ονομάζεται αυτοκαθαρισμός (self-cleaning) της εφυμενίδας και έχει πολύ μεγάλη βιολογική σημασία. Ο αυτοκαθαρισμός συντελείται μέσω της απομάκρυνσης των αιωρούμενων σωματιδίων από τις σταγόνες του νερού της βροχής, ενώ σημαντικό ρόλο παίζει στη διαδικασία αυτή η ύπαρξη ισχυρής υδροφοβικότητας (ΕΙΚΟΝΑ I.2). Για παράδειγμα φύλλα τα οποία μολύνθηκαν τεχνητά με κονίδια του *Botrytis cinerea* και σπόρια του *Cibotium schiedei* και στη συνέχεια ψεκάστηκαν με τεχνητή βροχή υπό κλίση 15°, οι λείες επιφάνειες διατήρησαν 40-80% των μολυσματικών τεμαχιδίων ενώ οι τραχείες καθαρίστηκαν πλήρως (Barthlott and Neinhuis, 1997).

Ο αυτοκαθαρισμός προστατεύει τα φύλλα από τη συσσώρευση αιωρούμενων σωματιδίων σκόνης η οποία σε περιόδους ηλιοφάνειας μπορεί να συντελέσει σε υπερβολική αύξηση της θερμοκρασίας του φύλλου. Επιπλέον αποτρέπει την έμφραξη των στοματιών και κατ' επέκταση την ελάττωση της αγωγιμότητας τους στη διάχυση των αερίων. Η υδροφοβικότητα της εφυμενίδας και η δυνατότητα αυτοκαθαρισμού της, είναι ιδιαίτερα σημαντικά χαρακτηριστικά για υδρόβια και υδροχαρή φυτά που αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με υψηλή υγρασία και είναι επιρρεπή

σε μολύνσεις από παθογόνα. Τέλος αποτελεί λειτουργία ζωτικής σημασίας για τα αλόφυτα, διότι μέσω αυτής απομακρύνονται οι κρυστάλλοι αλατιού που εναποτίθενται στην επιφάνεια τους (Neinhuis and Barthlott 1997).

I.6.7. Η συμβολή της εφυμενίδας στη μορφογένεση των αναπτυσσόμενων φυτικών τμημάτων

Η διαδικασία της οντογένεσης προϋποθέτει την αυστηρή οριοθέτηση των διαχωριστικών ορίων των επιφανειακών ιστών, γεγονός που επιτρέπει την απρόσκοπτη μορφογένεση των επιμέρους φυτικών ιστών. Η εφυμενίδα αποτρέπει τη σύμφυση των επιφανειακών φυτικών ιστών μέσω των πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων και συνεπώς τη συγκόλληση των αναπτυσσόμενων φυτικών ιστών κατά την οντογένεση. Ο ρόλος αυτός της εφυμενίδας επιβεβαιώθηκε μέσω πειραμάτων που αφορούσαν στην εισαγωγή του γονιδίου της κουτινάσης από το παθογόνο *Fusarium solani* στο φυτό *Arabidopsis thaliana* (Sieber et al., 2000). Η δομή της εφυμενίδας των μετασχηματισμένων φυτών ήταν τελείως ακανόνιστη με ασαφή όρια μεταξύ αυτής και των πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων. Επιπλέον τα αναπτυσσόμενα όργανα των μετασχηματισμένων φυτών εμφανίστηκαν επιρρεπή σε συμφύσεις και συγχωνεύσεις ενώ τα κύτταρα τους συνέχισαν να εκτείνονται. Οι συγχωνεύσεις μπορούν να συμβούν όταν οι στοιβάδες γειτονικών επιδερμικών κυττάρων με κατεστραμμένες ή ελλιπείς εφυμενίδες έρθουν σε στενή επαφή, με συνέπεια να συνδεθούν πολυμερή συστατικά (κυρίως πηκτίνη) στα σημεία επαφής και τελικά να δημιουργηθεί μεσοτοιχίο. Είναι επίσης πιθανό ότι στα αγρίου τύπου φυτά η ύπαρξη εφυμενίδας παρεμποδίζει την ανταλλαγή μηνυμάτων τα οποία διεγείρουν τη σύντηξη μεταξύ κυττάρων, επομένως κάθε αλλοίωση της να επιτρέπει την ανταλλαγή αυτή και κατ' επέκταση τη συγχώνευση των φυτικών ιστών/οργάνων (Sieber et al., 2000).

I.7. Φαινολικά συστατικά των φυτών

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μια πολυπληθή ομάδα δευτερογενών φυτικών μεταβολιτών με κοινό χαρακτηριστικό την ύπαρξη ενός τουλάχιστον αρωματικού δακτυλίου που φέρει ένα ή περισσότερα

υδροξύλια. Οι φαινολικές ενώσεις συνιστούν μια ευρεία και ετερόκλητη όσον αφορά στις φυσικοχημικές ιδιότητές της ομάδα. Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται ενώσεις διαλυτές στο νερό (απλά φαινολικά και γλυκοζυλιωμένα παράγωγα) αλλά και σχετικά άπολα μόρια (π.χ. άγλυκα φλαβονοειδή). Περιλαμβάνει επίσης απλές ενώσεις, αλλά και πολυμερή πολύπλοκης δομής στη διαμόρφωση της οποίας συμμετέχουν σάκχαρα ή άλλα μόρια. Από άποψη δομής οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να διακριθούν στις εξής υποομάδες: απλά φαινολικά, φαινυλοπροπανοειδή, φλαβονοειδή, λιγνίνες και ταννίνες (**ΕΙΚΟΝΑ I.3**).

I.7.1. Βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών

Η σύνθεση των φαινολικών ενώσεων πραγματοποιείται μέσω δυο βιοσυνθετικών οδών, του σικιμικού και του μηλονικού. Η οδός του μηλονικού αν και είναι σημαντική για την παραγωγή δευτερογενών συστατικών σε βακτήρια και μύκητες, δεν παρουσιάζει ευρεία διάδοση στα ανώτερα φυτά.

Η βιοσυνθετική οδός του σικιμικού ξεκινά με δύο αντιδράσεις συμπύκνωσης οι οποίες οδηγούν στη δημιουργία του βασικού σκελετού του κυκλοεξανίου, ενώ τα τελικά προϊόντα είναι τρία αρωματικά αμινοξέα, η L-φαινυλαλανίνη, η L-τυροσίνη και η L-τρυπτοφάνη. Τα αρχικά αντιδρώντα μόρια στην οδό του σικιμικού είναι η 4-φωσφορική ερυθρόζη και το φωσφο ένολοπυροσταφυλικό οξύ (**ΕΙΚΟΝΑ I.4**).

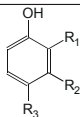
Το επόμενο βήμα κατά τη βιοσύνθεση των φαινολικών ουσιών περιλαμβάνει την οδό της φαινυλαλανίνης/ύδροξυκινναμικού οξέος. Μέσω της οδού αυτής η L-φαινυλαλανίνη μετατρέπεται σε υδροξυκινναμικά παράγωγα και τις ενεργοποιημένες τους μορφές, τους θειοεστέρες του συνέζυμου A (*CoA*) και τα 1-O-ακυλογλυκοζίδια. Η μετατροπή της L-φαινυλαλανίνης σε E-κινναμικό οξύ για την παραγωγή του βασικού σκελετού των φαινυλοπροπανοειδών, καταλύεται από το ένζυμο-κλειδί αμμώνιο-λυάση της L-φαινυλαλανίνης (PAL) μέσω μιας μη-οξειδωτικής απαμίνωσης (**ΕΙΚΟΝΑ I.4**). Στη συνέχεια ακολουθεί μια σειρά από

Εικόνα I.3. Κύριες ομάδες φαινολικών ενώσεων των ανωτέρων φυτών.

I. Εισαγωγή

A. ΑΠΛΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ

1. Φαινόλες

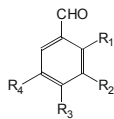


$R_1=OH, R_2=R_3=H$: κατεχόλη

$R_1=OCH_3, R_2=R_3=H$: γουαϊακόλη

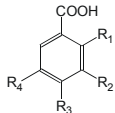
$R_1=R_2=OH, R_3=H$: πυρογαλλόλη

2. Φαινολικές αλδεΐδες



$R_1=H, R_2=R_4=OCH_3, R_3=OH$: συρινγκαλδεΐδη

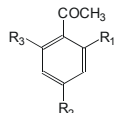
3. Φαινολικά οξέα



$R_1=OH, R_2=R_3=R_4=H$: σαλικυλικό οξύ

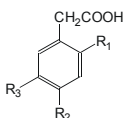
$R_1=R_4=H, R_2=OCH_3, R_3=OH$: βανιλικό οξύ

4. Ακέτυλοφαινόλες



$R_1=OH, R_2=R_3=OCH_3$: ξανθοξυλίλη

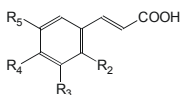
5. Παράγωγα φαινυλοξεϊκού οξέος



$R_1=R_3=H, R_2=OH$: p-υδροξυφαινυλοξικό οξύ

B. ΦΑΙΝΥΛΟΠΡΟΠΑΝΟΕΙΔΗ

1. Παράγωγα υδροξυκινναμικού οξέος

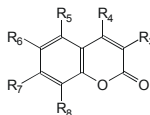


$R_4=OH, R_2=R_3=R_5=H$: καφεϊκό οξύ

$R_3=OMe, R_4=OH, R_2=R_5=H$: φερουλικό οξύ

$R_4=OH, R_3=R_5=OMe, R_2=H$: συναπτικό οξύ

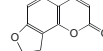
2. Κουμαρίνες



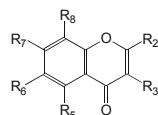
$R_7=OH$: συμπελφερόνη

$R_6=R_7=OH$: ασκουλετίνη

Φουρανοκουμαρίνες



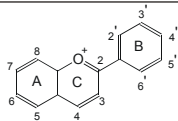
3. Χρωμόνες



$R_2=Me, R_5=OH, R_7=OMe$: ευγενίνη

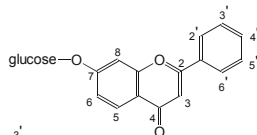
Γ. ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

1. Ανθοκυανιδίνες +σάκχαρο = ανθοκυανίνες



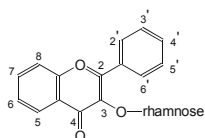
$R_3=R_5=R_7=R_8=OH, R_6=H$: δελφινιδίνη

2. Φλαβόνες



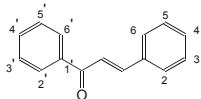
$R_4=R_5=OH$: 7-O-γλυκοζίτης απιγενίνης

3. Φλαβονόλες



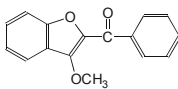
$R_3=R_4=R_5=R_6=R_7=OH$: 3-O-ραμνοζίτης μυρικετίνης

4. Χαλκόνες

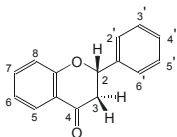


$R_2=R_4=R_3=R_4=OH$: βουτεΐνη

5. Αουρόνες

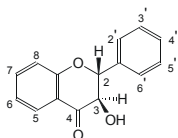


6. Φλαβανόνες



$R_5=R_7=OH$: ναρινγκενίνη

7. Διϋδροφλαβονοειδή



Δ. TANNINESΣ

Ε. ΛΙΓΝΙΝΕΣ

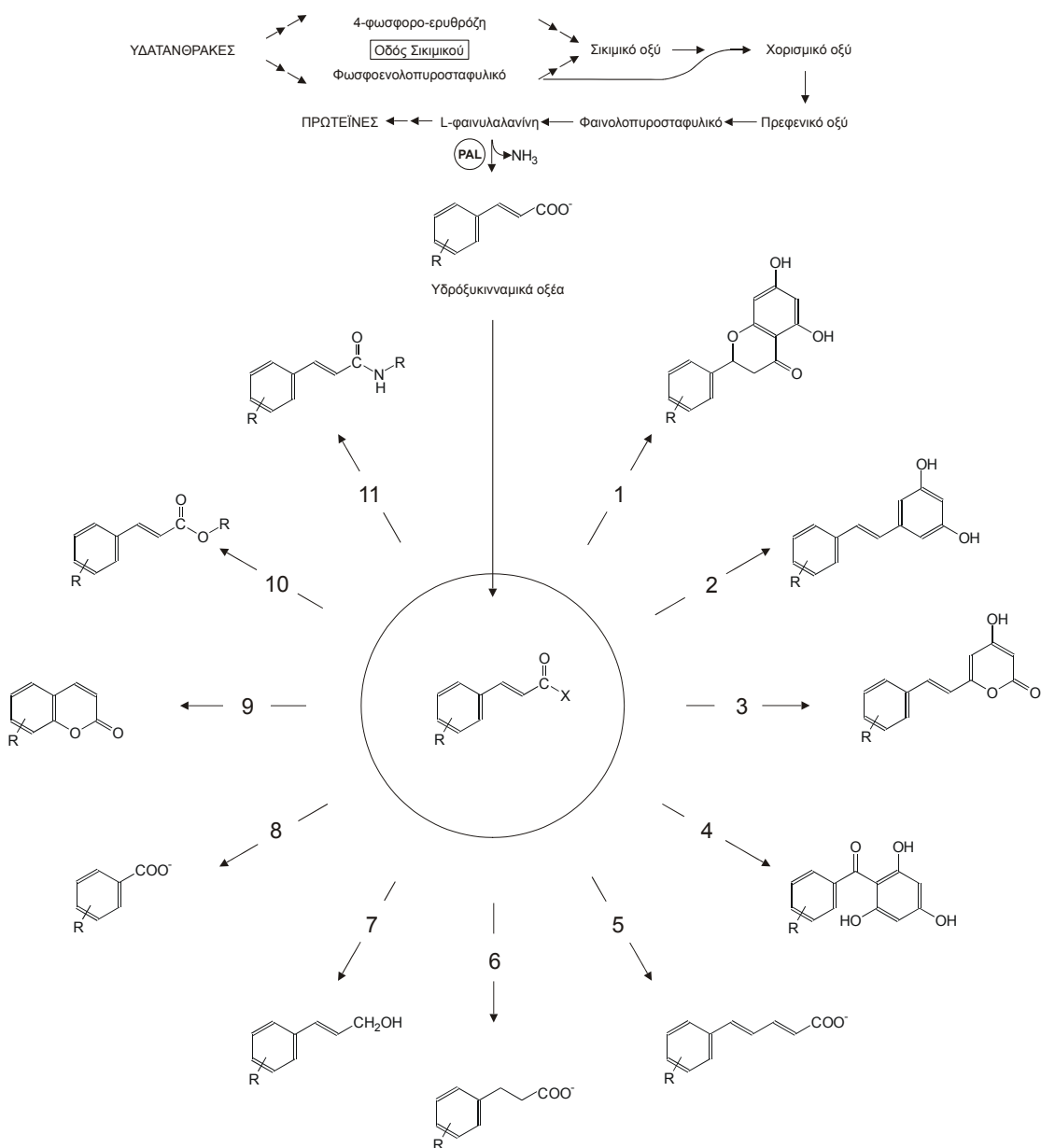
υδροξυλιώσεις και μεθυλιώσεις και παράγονται οι βασικοί εκπρόσωποι των υδροξυκινηματικών παραγώγων όπως είναι το 4-κουμαρικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το φερουλικό και το σινναπικό οξύ. Τα υδροξυκινηματικά παράγωγα χρησιμοποιούνται περαιτέρω ως πρόδρομες ενώσεις σε τέσσερις κύριους τύπους αντιδράσεων από τις οποίες παράγεται ένας σημαντικός αριθμός φαινυλοπροπανοειδών (**ΕΙΚΟΝΑ I.4**). Συγκεκριμένα α) αντιδράσεις συμπύκνωσης με το μηλονύλο-*CoA* που έχουν ως αποτέλεσμα την επιμήκυνση της πλευρικής αλυσίδας και οδηγούν στη σύνθεση του βασικού σκελετού των φλαβονοειδών β) αντιδράσεις αποδόμησης που προκαλούν μείωση της πλευρικής αλυσίδας με αφαίρεση μίας μονάδας οξικού και οδηγούν στα υδροξυβενζοϊκά παράγωγα, γ) αντιδράσεις αναγωγής οι οποίες εξαρτώνται από το NADPH και οδηγούν στους πρόδρομους της λιγνίνης δ) αντιδράσεις σύζευξης από τις οποίες προκύπτουν εστέρες ή αμίδια (**ΕΙΚΟΝΑ I.4**) (Strack, 1997).

Η συνθάση της χαλκόνης αποτελεί το ένζυμο-κλειδί στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών και καταλύει την αντίδραση σχηματισμού του βασικού ανθρακικού σκελετού των φλαβονοειδών. Μέσω μιας μη αντιστρεπτής αντίδρασης γίνεται συμπύκνωση του 4-κουμαρόυλο-*CoA* με τρία μόρια του μηλονύλο-*CoA* που οδηγεί στον σχηματισμό της 2',4,4',6'-τετραϋδροξυχαλκόνης. Το μόριο αυτό αποτελεί τον πρόδρομο μεταβολίτη από τον οποίο προκύπτουν όλα τα 5-υδροξυφλαβονοειδή. Η κυκλοποίηση του δακτυλίου C της χαλκόνης προς φλαβόνη καταλύεται από την ισομεράση της χαλκόνης. Οι υδρολυόμενες ταννίνες προκύπτουν από μόρια πολυόλης τα οποία είναι δεμένα με εστερικούς δεσμούς σε μία ή περισσότερες μονάδες γαλλικού οξέος. Οι δομικές μονάδες συνδέονται μεταξύ τους ομοιοπολικά με δεσμούς C-C και C-O. Οι δομικές μονάδες των συμπυκνωμένων ταννινών είναι μόρια φλαβονοειδών.

Το φαινολικό πολυμερές της λιγνίνης δημιουργείται από ομοιοπολικά δεμένα φαινυλοπροπανοειδή (C_6-C_3), την *p*-κουμάρυλοαλκοόλη, την κονίφερυλοαλκοόλη και τη συρίγγκυλοαλκοόλη. Η αναλογία μεταξύ των τριών αυτών βασικών μονάδων ποικίλει μεταξύ των

I. Εισαγωγή

ιστών και των φυσιολογικών συνθηκών κάτω από τις οποίες αναπτύσσονται τα φυτά.



Εικόνα I.4. Κύρια στάδια της βιοσύνθεσης των φαινολικών ενώσεων των φυτών. Η μετατροπή της L-φαινυλαλανίνης σε κινναμικό οξύ δημιουργεί τον βασικό σκελετό των υδροξικινναμικών παραγώγων (1: φλαβονοειδή, 2: στιλβένια, 3: στυρυλπυρόνες, 4: βενζοφαινόνες, 5: υδροξικινναμικά παράγωγα με επιμήκυνση της ανθρακικής αλυσίδας, 6: διυδροκινναμικά παράγωγα, 7: υδροξικινναμοϋλ-αλκοόλες, 8: υδροξυβενζοϊκά παράγωγα, 9: υδροξυκουμαρίνες, 10: εστέρες του υδροξικινναμικού οξέος, 11: αμίδια του υδροξικινναμικού οξέος), (Strack, 1997).

I.7.2. Τα ένζυμα-κλειδιά της βιοσύνθεσης των φαινυλοπροπανοειδών και φλαβονοειδών

I.7.2.α. Αμμώνιο-λυάση της L-φαινυλαλανίνης

Η αμμώνιο-λυάση της L-φαινυλαλανίνης (PAL) ανήκει στην τάξη των λυασών των δεσμών άνθρακα-αζώτου. Συγκροτείται από τέσσερις υπομονάδες κάθε μία από τις οποίες έχει μοριακό βάρος 77-83 kDa. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου σχηματίζει σύμπλοκο με το υπόστρωμα μέσω μια μονάδας δεϋδροαλανίνης η οποία ενώνεται με την αμινομάδα της φαινυλαλανίνης. Κατά την αντίδραση ελευθερώνεται το προϊόν κινναμικό οξύ και το ένζυμο αναγεννάται μέσω ελευθέρωσης της αμινομάδας. Το βέλτιστο pH για τη δραστηριότητα της PAL βρίσκεται μεταξύ 8 και 9 (Strack, 1997). Το ένζυμο παρεμποδίζεται από το προϊόν της το trans-κινναμικό οξύ (Heldt, 1997). Η δραστηριότητα της PAL ρυθμίζεται μέσω αλλοστερικών επιδράσεων από πολλούς ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες όπως ορμόνες, επίπεδα θρεπτικών στοιχείων, φως, προσβολή από μύκητες, και τραυματισμούς (Taiz and Zeiger, 1998; Ebel and Hahlbrock, 1982).

I.7.2.β. Συνθετάση της χαλκόνης (CHS)

Η συνθετάση της χαλκόνης (CHS) είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 78-88 kDa και πιθανόν αποτελείται από δύο ίδιες υπομονάδες. Το βέλτιστο pH της αντίδρασης βρίσκεται μεταξύ 7,5 και 8,5 (Strack, 1997). Η συνθετάση της χαλκόνης είναι φωτοεπαγώμενο ένζυμο (όπως και η PAL), γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη κοινών ρυθμιστικών μηχανισμών των βιοσυνθετικών οδών των φαινυλοπροπανοειδών και των φλαβονοειδών (Weaver and Herrmann, 1997).

I.7.3. Φαινολικές ενώσεις της εφυμενίδας και των επεφυμενιδικών κηρών

Η παρουσία φαινολικών ενώσεων στη εφυμενίδα είχε διαπιστωθεί αρκετά νωρίς, ωστόσο οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση τους ήταν ως ένα βαθμό αναξιόπιστες γιατί δεν μπορούσαν να αποκλείσουν τυχόν προσμίξεις από τα φαινολικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των επιδερμικών κυττάρων (Ju and Bramlage, 1999).

Στην εφυμενίδα απαντώνται τόσο ελεύθερες φαινολικές ενώσεις όσο και δεσμευμένες στα πολυμερή της κουτίνης. Το κλάσμα των ελεύθερων φαινολικών ουσιών της εφυμενίδας, το οποίο περιλαμβάνει κυρίως φλαβονοειδή, θεωρείται σχετικά υδρόφιλο διότι σε διφασικό σύστημα εκχύλισης μπορεί να παραληφθεί με πολικούς διαλύτες, όπως για παράδειγμα διάλυμα μεθανόλης (Ju and Bramlage, 1999; Hunt and Baker, 1980). Ως ομοιοπολικά συνδεδεμένα με το πλέγμα της κουτίνης έχουν αναφερθεί απλά φαινολικά συστατικά όπως το *p*-κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ (Riley and Kolattukudy, 1975) και ορισμένα φλαβονοειδή όπως για παράδειγμα η ναρινγκενίνη (Hunt and Baker, 1980). Η απελευθέρωση των δεσμευμένων φαινολικών γίνεται με αλκαλική υδρόλυση της κουτίνης (Ju and Bramlage, 1999; Riley and Kolattukudy, 1975). Στους επεφυμενιδικούς κηρούς απαντώνται ως ελεύθερα φαινολικά συστατικά κυρίως μεθυλιωμένα φλαβονοειδή (Wollenweber et al., 2000a; Wollenweber et al., 2000b), καθώς και σαπωνοποιημένα *p*-κουμαρικό και φερουλικό οξύ που απελευθερώνονται με αλκαλική υδρόλυση (Liakopoulos et al., 2001).

Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών της εφυμενίδας και των επεφυμενιδικών κηρών μεταβάλλεται κατά την ανάπτυξη των φυτικών οργάνων. Έχει βρεθεί ότι η συγκέντρωση ανά επιφάνεια των μεθυλιωμένων φλαβονοειδών των επεφυμενιδικών κηρών του *Viscum album* είναι υψηλή στα νεαρά φύλλα και μειώνεται προοδευτικά κατά τη διάρκεια έκπτυξης του φύλλου η οποία ολοκληρώνεται κατά το καλοκαίρι. Το φθινόπωρο σημειώνεται σημαντική αύξηση η οποία πιθανόν να υποδηλώνει νέα έκκριση των συστατικών αυτών (Wollenweber et al., 2000a). Τα ελεύθερα φαινολικά συστατικά της εφυμενίδας των μήλων αυξάνονται με την ωρίμανση του καρπού ενώ τα δεσμευμένα φαινολικά διατηρούνται σταθερά (Ju and Bramlage, 2000). Στην τομάτα οι φαινολικές ενώσεις των επεφυμενιδικών κηρών απαντώνται σε ίχνη στους άγουρους καρπούς ενώ αυξάνονται κατά την ωρίμανση η οποία και κορυφώνεται στην κλιμακτήριο. Στην εφυμενίδα της τομάτας η συγκέντρωση των ελευθέρων φαινολικών συστατικών διατηρείται σχετικά σταθερή κατά την ανάπτυξη του καρπού, ωστόσο κατά την ωρίμανση εμφανίζονται ποιοτικές αλλαγές στη χημική

τους σύσταση με την επικράτηση της ναρινγκενίνης. Στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του καρπού της τομάτας οι μόνες φαινολικές ενώσεις που ανιχνεύονται είναι ορισμένα φαινολοξέα των οποίων η συγκέντρωση παραμένει σταθερή κατά την ανάπτυξη του οργάνου και εμφανίζει αύξηση κατά την κλιμακτήριο. Στις άγουρες τομάτες η συγκέντρωση των δεσμευμένων φλαβονοειδών της εφυμενίδας είναι αμελητέα. Η συγκέντρωση των συστατικών αυξάνει σημαντικά κατά την κλιμακτήριο και συνοδεύεται από αλλαγή στη χημική σύσταση (Hunt and Baker, 1980).

Η παρουσία των φαινολικών συστατικών στην εφυμενίδα και τους επεφυμενδικούς κηρούς πιθανόν να σχετίζεται με την προστασία των φυτικών οργάνων ιδιαίτερα αυτών νεαρής ηλικίας από τα παθογόνα και την UV-ακτινοβολία (Wollenweber et al., 2000a; Bornman, 1999; Liakopoulos, 2001). Στην εφυμενίδα του φυτού *Lupinus albus* έχουν βρεθεί δύο ισοένζυμα όξινων υπεροξειδασών τα οποία οξειδώνουν μία ισοφλαβόνη τη γενιστεΐνη (genistein). Πιθανόν τα παράγωγα που προκύπτουν από αυτή την οξείδωση να δρουν ως φυτοαλεξίνες σε ενδεχόμενη προσβολή από μύκητες (Ferrer et al., 1991). Η συσσώρευση φαινολικών συστατικών στην εφυμενίδα των μήλων φαίνεται να προστατεύει τους καρπούς από βλάβες που προκαλούνται από την αύξηση της συγκέντρωσης του α -φαινεσινίου και της συνακόλουθης οξείδωσης του (Ju and Bramlage, 1999; Ju and Bramlage, 2000).

1.7.4. Φυσιολογικοί ρόλοι των φαινολικών συστατικών

Οι φαινολικές ενώσεις των φυτικών οργανισμών διαδραματίζουν πρωτεύοντα ρόλο σε οικολογικό και φυσιολογικό επίπεδο και σε ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών όπως η άμυνα των φυτών έναντι παθογόνων, η προστασία των φυτικών οργάνων από την υπεριώδη ακτινοβολία, η επικονίαση, η μηχανική στήριξη και η αλληλοπάθεια.

Καταρχήν η συμβολή των φαινολικών ουσιών στον αμυντικό μηχανισμό των φυτών είναι καθοριστική σε επίπεδο θεμελιώδους προϋπάρχουσας άμυνας. Οι ταννίνες δρουν απωθητικά για τα φυτοφάγα ζώα γιατί μειώνουν την τροφική αξία των γευμάτων και παρεμποδίζουν την πέψη καθώς αναστέλλουν τη δράση των πεπτικών ενζύμων με τα οποία

δημιουργούν σύμπλοκα (Seigler, 1995). Τοξική δράση κατά την κατανάλωση τροφής επιφέρουν και οι φουρανοκουμαρίνες οι οποίες έχουν την ιδιαιτερότητα να ενεργοποιούνται παρουσία ηλιακού φωτός και συγκεκριμένα της υπεριώδους περιοχής του φάσματος. Η ανθεκτικότητα ορισμένων ποικιλιών σε μύκητες και νηματώδεις σχετίζεται συνήθως με την ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων φαινολικών συστατικών και των οξειδωτικών τους ενζύμων στους φυτικούς ιστούς. Η οξείδωση των φαινολικών στο σημείο της προσβολής και η παραγωγή ελευθέρων ριζών O_2 δημιουργεί ένα αντίξοο περιβάλλον για τα παθογόνα (Appel, 1993).

Σε επίπεδο επαγόμενης άμυνας τα φυτά αντιδρούν στην προσβολή από παθογόνα με τη σύνθεση φυτοαλεξινών. Ως φυτοαλεξίνες χαρακτηρίζονται αμυντικοί δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι συντίθεται *de novo* κατά την προσβολή και παίρνουν ενεργό μέρος στην αντιμετώπιση του παθογόνου. Ορισμένες φαινολικές ουσίες όπως τα ισοφλαβονοειδή και ανθοκυανίνες παίζουν το ρόλο φυτοαλεξινών σε έναν αριθμό φυτικών ειδών (Bennett and Wallsgrove, 1994).

Ορισμένες επίσης φαινολικές ουσίες παίζουν το ρόλο ενδογενών μηνυμάτων όπως το σαλικυλικό οξύ (*σ*-υδροξυβενζοϊκό οξύ) το οποίο εμπλέκεται σε αμυντικούς μηχανισμούς έναντι των παθογόνων όπως στη τοπική και διασυστηματική επίκτητη ανθεκτικότητα, στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου και στον περιορισμό εξάπλωσης των παθογόνων. Ο τρόπος με τον οποίο δρα ποικίλει κατά περίπτωση και γίνεται τόσο σε μεταγραφικό επίπεδο με την *de novo* σύνθεση πρωτεϊνών, όσο και με τη ρύθμιση της δραστηριότητας υπάρχοντων ενζυμικών μορίων σε μεταμεταγραφικό επίπεδο. Επιπλέον μπορεί να προκαλέσει και την παραγωγή ελευθέρων ριζών O_2 (Raskin, 1992; Murphy et al., 1999).

Οι φαινολικές ενώσεις δεν παίρνουν μέρος μόνο σε αμυντικούς μηχανισμούς αντιμετώπισης παθογόνων ή εχθρών. Οι ανθοκυανίνες αποτελούν μια σημαντική ομάδα χρωστικών, στην ύπαρξη των οποίων οφείλεται ο χρωματισμός των ανθέων. Οι ενώσεις επομένως αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στην προσέλκυση των επικονιαστών και κατά συνέπεια στην αναπαραγωγή. Ορισμένες φλαβόνες και φλαβονόλες σχηματίζουν τους

οδηγούς νέκταρος, δηλαδή σχηματισμούς εν είδει στόχου οι οποίοι είναι ορατοί μόνο στο υπεριώδες (φασματική περιοχή στην οποία η όραση των εντόμων είναι ευαίσθητη) και οδηγούν τα έντομα στον εντοπισμό της γύρης και του νέκταρος (Shirley, 1996; Harborne and Williams, 2000).

Ορισμένες φαινολικές υδατοδιαλυτές ενώσεις (για παράδειγμα ορισμένες υδροκινόνες) φαίνεται να παίρνουν μέρος σε φαινόμενα αλληλοπάθειας μεταξύ των φυτικών οργανισμών. Ο όρος αλληλοπάθεια αναφέρεται κυρίως στην παρεμποδιστική δράση ορισμένων ουσιών οι οποίες παράγονται από τα φυτά και επιδρούν στη βλάστηση των σπερμάτων άλλων φυτών (Blum et al., 1999; Gonzalez et al., 1997). Η γιουγκλόνη της καρυδιάς και άλλων μελών της οικογένειας Juglandaceae είναι φαινολική ουσία που στους φυτικούς ιστούς απαντώνται ως μη τοξικό γλυκοζίδιο. Κατά την παραμονή της ουσίας αυτής στο έδαφος, μετά από έκπλυση ή αποσύνθεση των φύλλων παρατηρείται οξείδωση και απομάκρυνση του σακχάρου, με αποτέλεσμα να καθίσταται ιδιαίτερα τοξική για τα γειτονικά φυτά (Strack, 1997).

Ορισμένα φλαβονοειδή συνεισφέρουν στην εγκαθίδρυση συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων *Bradyrhizobium* και *Rhizobium* και των ψυχανθών. Αφενός λειτουργούν ως εξειδικευμένα σήματα για τα βακτήρια καθώς εκκρίνονται από τις ρίζες και τα σπέρματα των φυτών και αφετέρου διεγείρουν την μεταγραφή των (*nod*) γονιδίων ενεργοποιώντας ορισμένες ρυθμιστικές πρωτεΐνες (Fisher and Long, 1992). Ανάλογο ρόλο παίζουν και ορισμένα φλαβονοειδή στη συμβιωτική σχέση φυτών μυκήτων για τη δημιουργία μυκκοριζών.

Ένας άλλος σημαντικός ρόλος των φλαβονοειδών και των φαινολοπροπανοειδών είναι η προστασία των φυτών από τις καταστροφικές επιδράσεις της φυσικής υπεριώδους ακτινοβολίας (Bornman, 1999; Tegini, 1994). Οι ενώσεις αυτές εντοπίζονται κυρίως σε προστατευτικούς ιστούς όπως η επιδερμίδα και τα εξαρτήματα της (Karabourniotis et al., 1992; Karabourniotis et al., 1993; Karabourniotis et al., 1998; Skaltsa et al., 1994; Liakoura et al., 1997). Ο προστατευτικός τους ρόλος έγκειται στο ότι παρουσιάζουν ισχυρή απορρόφηση στη υπεριώδη περιοχή του

ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Παράλληλα τα μόρια αυτά δεν απορροφούν στο ορατό, επομένως επιτρέπουν τη διέλευση της φωτόςυνοθετικά ενεργούς ακτινοβολίας. Μετασχηματισμένα φυτά *Arabidopsis* τα οποία είχαν χάσει την ικανότητα να συσσωρεύουν φλαβονοειδή στην επιδερμίδα, παρουσίασαν υψηλή ευαισθησία έναντι της υπεριώδους ακτινοβολίας. Το ίδιο αποτέλεσμα παρουσιάζεται και σε φυτά στα οποία παρεμποδίστηκε η βιοσυνθετική οδός των φαινυλοπροπαινοειδών (Harborne and Williams, 2000).

Τέλος πρέπει να αναφερθεί η σημαντική συμβολή της λιγνίνης στη μηχανική στήριξη των φυτικών οργάνων και στη προστασία από παθογόνα που επιτυγχάνεται με την ισχυροποίηση αλλά και την αδιαβροχοποίηση των κυτταρικών τοιχωμάτων. Επίσης διμερή του φερουλικού οξέος τα οποία συνδέουν τις αλυσίδες των πολυσακχαριτών προσδίδουν επιπλέον αντοχή στα κυτταρικά τοιχώματα και προστασία από τα ένζυμα των μυκήτων (Wallace and Fry 1994).

1.7.5. Τα χαρακτηριστικά του φθορισμού των φαινολικών συστατικών

Φθορισμός είναι το φαινόμενο κατά το οποίο ένα μόριο εκπέμπει μέρος της ακτινοβολίας που έχει απορροφήσει (ακτινοβολία διέγερσης). Η ακτινοβολία που εκπέμπεται είναι πάντα μεγαλύτερου μήκους κύματος από την ακτινοβολία διέγερσης, διότι μέρος της απορροφούμενης ενέργειας μετατρέπεται σε θερμότητα. Αυτοφθορισμός είναι ο πρωτογενής φθορισμός μιας ουσίας όταν διεγερθεί από ακτινοβολία ορισμένου μήκους κύματος. Ο φθορισμός ενός μορίου εξαρτάται από τη δομή του και το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται. Στην πλειοψηφία τους τα φθορίζοντα συστατικά είναι αρωματικές ή ετεροκυκλικές ενώσεις ο φθορισμός των οποίων επηρεάζεται από το pH, τη θερμοκρασία και το ιξώδες του περιβάλλοντος (Rost, 1992; Rost, 1995).

Στους φυτικούς οργανισμούς απαντάται ένα πλήθος αυτοφθορίζοντων συστατικών με γνωστότερη τη χλωροφύλλη που εκπέμπει κόκκινο φθορισμό. Από τις φαινολικές ενώσεις των φυτών οι απλές φαινόλες, τα παράγωγα του υδροξυκιναμικού οξέος και οι κουμαρίνες εκπέμπουν μπλε φθορισμό, ή πράσινο, οι ανθοκυανίνες και οι φλαβόνες πράσινο, οι κινόνες κίτρινο ή πράσινο και τέλος η λιγνίνη πράσινο-μπλε φθορισμό.

Η παρουσία χαρακτηριστικού φθορισμού στις επιφάνειες των φύλλων έχει διαπιστωθεί σε ένα μεγάλο αριθμό δικότυλων, μονοκότυλων και γυμνοσπέρμων φυτικών ειδών (Karabourniotis et al., 2001). Έχει διαπιστωθεί ότι τα χαρακτηριστικά φθορισμού των επιφανειών των φύλλων διαμορφώνονται από την παρουσία φαινολικών συστατικών στο στρώμα των επεφυμενιδικών κηρών (Liakopoulos et al., 2001). Τα χαρακτηριστικά φθορισμού των επιφανειών διαφέρουν αρκετά από είδος σε είδος (Karabourniotis et al., 2001) καθώς επίσης και μεταξύ προσαξονικής και αποαξονικής επιφάνειας των φύλλων και σχετίζονται με το πάχος του στρώματος των επεφυμενιδικών κηρών, την ποιοτική σύσταση και τον βαθμό εναπόθεσης των φαινολικών συστατικών σε αυτό (Johnson et al., 2000; Karabourniotis et al., 2001; Liakopoulos et al., 2001).

Τα χαρακτηριστικά φθορισμού διαφοροποιούνται επίσης ανάλογα με το είδος των κυττάρων της επιφάνειας. Η διαφοροποίηση εντοπίζεται στα καταφρακτικά κύτταρα και ενδεχομένως οφείλεται σε αλλαγές στην ποιοτική σύσταση ή στον βαθμό εναπόθεσης των φαινολικών συστατικών στους επεφυμενιδικούς κηρούς που βρίσκονται πάνω από τα επιδερμικά ή καταφρακτικά κύτταρα (Liakopoulos et al., 2001). Το φαινόμενο αυτό προσφέρει μια ταχεία και απλή μέθοδο για την παρατήρηση και τη μέτρηση ορισμένων ανατομικών χαρακτηριστικών των στοματικών συμπλόκων μέσω μικροσκοπίας φθορισμού σε ένα μεγάλο αριθμό φυτικών ειδών (Karabourniotis et al., 2001).

I.8. Δομή και λειτουργία των στοματίων

I.8.1. Γενικά

Η επιδερμίδα των υπέργειων οργάνων των φυτών και κυρίως των φύλλων, διαθέτει μικρούς πόρους οι οποίοι περικλείονται από εξειδικευμένα επιδερμικά κύτταρα τα επονομαζόμενα καταφρακτικά. Ο πόρος και τα καταφρακτικά κύτταρα τα οποία το περιβάλλουν συνιστούν το στομάτιο. Η φυσιολογική σημασία των στοματίων είναι ξεχωριστή γιατί ελέγχουν την ανταλλαγή των αερίων CO₂ και O₂ μεταξύ του φυτού και του εναέριου περιβάλλοντος και συνεπώς επηρεάζουν καθοριστικά τις

λειτουργίες της φωτοσύνθεσης και της αναπνοής. Επιπλέον η έξοδος των υδρατμών από τα στομάτια συνεισφέρει στον έλεγχο της θερμοκρασίας του ελάσματος του φύλλου, στη διατήρηση του διαπνευστικού ρεύματος και στη ρύθμιση της υδατικής κατάστασης του φυτού.

1.8.2. Ανατομικά χαρακτηριστικά των στοματίων και λειτουργία τους

Στοματικό σύμπλοκο θεωρείται το ζεύγος των καταφρακτικών κυττάρων που περιβάλλουν τον στοματικό πόρο και τα γειτονικά παρακαταφρακτικά κύτταρα.

Τα παρακαταφρακτικά κύτταρα είναι εξειδικευμένα επιδερμικά κύτταρα διαφορετικά σε μέγεθος και σχήμα από τα γειτονικά τους τα οποία συνήθως βρίσκονται σε επαφή με τα καταφρακτικά κύτταρα. Κατά κανόνα διαθέτουν μικρότερο μέγεθος από τα γειτονικά επιδερμικά, πυκνότερο περιεχόμενο κυτταροπλάσματος και μεγαλύτερο αριθμό κυτταρικών οργανιδίων. Συνήθως δεν περιέχουν χλωροπλάστες, ανθοκυάνες ή κρυσταλλικά έγκλειστα (Wilmer, 1983).

Ο στοματικός πόρος, το άνοιγμα μεταξύ των καταφρακτικών κυττάρων, φέρει σε επικοινωνία τους μεσοκυττάριους χώρους του μεσοφύλλου με το εξωτερικό περιβάλλον μέσω του υποστοματίου θαλάμου, του εκτεταμένου μεσοκυττάριου χώρου που αναπτύσσεται κάτω από το στομάτιο (Δροσόπουλος, 1992).

Τα καταφρακτικά αποτελούν υψηλής εξειδίκευσης κύτταρα με πολύπλοκη ανατομία και βιοχημικό σχεδιασμό ο οποίος τους επιτρέπει να μεταβάλλουν ταχέως το οσμωτικό δυναμικό τους με βάση τα ερεθίσματα του εσωτερικού και εξωτερικού περιβάλλοντος. Χαρακτηρίζονται από έντονη μεταβολική δραστηριότητα και περιέχουν άφθονα μιτοχόνδρια, ριβοσώματα και πλαστίδια τα οποία είναι διαφοροποιημένα σε χλωροπλάστες. Γενικό χαρακτηριστικό των ώριμων καταφρακτικών κυττάρων είναι η απουσία πλασμοδεσμών, γεγονός που πιθανώς υποδηλώνει την έλλειψη συμπλαστικής επικοινωνίας μεταξύ των καταφρακτικών, παρακαταφρακτικών και επιδερμικών κυττάρων. Τα κυτταρικά τους τοιχώματα είναι πλούσια σε πηκτίνη η οποία διαποτίζει τα μικροϊνίδια της κυτταρίνης, ενώ σε ορισμένα φυτικά είδη είναι ισχυρώς λιγνινοποιημένα.

Οι μεταβολές της μορφής των καταφρακτικών κυττάρων που επηρεάζουν το μηχανισμό ανοίγματος των στοματίων οφείλονται στη κατάλληλη διεύθυνση των μικροϊνιδίων της κυτταρίνης στα τοιχώματα των κυτταρικών τοιχωμάτων (Δροσόπουλος, 1992; Fahn, 1990).

Από ανατομικής πλευράς τα στομάτια διακρίνονται σε δύο τύπους: α) τον νεφροειδή, του οποίου τα καταφρακτικά κύτταρα παρουσιάζουν σε κάτοψη ημισεληνοειδές σχήμα με σφαιροειδή άκρα, ο οποίος απαντάται στα περισσότερα φυτικά είδη β) τον αληθοειδή τύπο του οποίου τα καταφρακτικά κύτταρα παρουσιάζονται επιμήκη με μορφή αλτήρων και απαντώνται στις οικογένειες Graminae και Cyperaceae.

Τα καταφρακτικά κύτταρα αποτελούν μια από τις ελάχιστες περιπτώσεις κυττάρων τα οποία έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν αντιστρεπτά τη μορφή τους. Η μεταβολή αυτή είναι παθητική και οφείλεται στην αλληλεπίδραση των δυνάμεων που ασκούνται μεταξύ του πρωτοπλάσματος και του κυτταρικού τοιχώματος μέσω αυστηρά ελεγχόμενων μεταβολών της πίεσης σπαργής. Η αύξηση της πίεσης σπαργής των καταφρακτικών κυττάρων η οποία ευθύνεται για το άνοιγμα των στοματίων, προκαλείται από την είσοδο νερού από τα γειτονικά κύτταρα λόγω της μείωσης του οσμωτικού δυναμικού των καταφρακτικών κυττάρων. Η μείωση αυτή αποδίδεται στη συσσώρευση ιόντων K^+ στα χυμοτόπια τους. Τα ιόντα μεταφέρονται από τα γειτονικά κύτταρα λόγω ενεργοποίησης αντλιών K^+ και H^+ που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη των καταφρακτικών κυττάρων. Στην ωμορύθμιση των καταφρακτικών κυττάρων παίζουν ρόλο και οργανικά μόρια όπως σάκχαρα και το άμυλο των χλωροπλαστών (Taiz and Zeiger, 1998; Salisbury and Ross, 1992).

1.8.3. Φυσιολογική σημασία των στοματίων

Η εφυμενίδα η οποία καλύπτει την επιφάνεια των εναέριων οργάνων των φυτών, παρουσιάζει ισχυρή αντίσταση στη διάχυση τόσο των μορίων νερού όσο και των μορίων CO_2 . Ως εκ τούτου η ανταλλαγή των αερίων διαμέσου της επιδερμίδας επιτυγχάνεται σχεδόν αποκλειστικά μέσω των στοματικών πόρων. Ωστόσο η ανάγκη πρόσληψης CO_2 για τη λειτουργία της φωτοσύνθεσης απαιτεί το άνοιγμα των στοματίων γεγονός που αναπόφευκτα

επιφέρει απώλεια νερού με τη μορφή υδρατμών εξαιτίας του φαινομένου της διαπνοής. Προκειμένου το CO₂ να εισέλθει στο εσωτερικό του φύλλου συναντά αντίσταση τόσο από το οριακό στρώμα του αέρα που περιβάλλει το φύλλο όσο και από τα στομάτια. Στις συνήθεις συνθήκες της ατμόσφαιρας, όπου η ταχύτητα του αέρα δεν είναι μηδενική, το πάχος του οριακού στρώματος είναι πολύ μικρό και η αντίσταση που προβάλλει στη διάχυση του CO₂ σε σχέση με αυτή των στοματιών θεωρείται αμελητέα. Το φυτό προκειμένου να μειώσει τις απώλειες νερού χωρίς παράλληλα να περιορίσει τη φωτοσύνθεση, ρυθμίζει την ανταλλαγή των αερίων με το άνοιγμα και κλείσιμο των στοματιών σύμφωνα με τα ερεθίσματα που παίρνει από το περιβάλλον (όπως θερμοκρασία, συγκέντρωση CO₂ και ακτινοβολία). Πιο συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της νύχτας, δεδομένου ότι δεν υφίσταται ανάγκη απομάκρυνσης CO₂, το άνοιγμα των στοματικών πόρων είναι μικρό ώστε να αποφεύγονται οι απώλειες νερού. Αντίστοιχα σε συνθήκες πλήρους ηλιοφάνειας και με δεδομένη επάρκεια νερού, τα στομάτια παραμένουν ανοιχτά γιατί οι απώλειες του νερού αντισταθμίζονται από το κέρδος του φυτού σε φωτοσυνθετικά προϊόντα. Σε περίπτωση κατά την οποία δεν υπάρχει επαρκής τροφοδοσία του φυτού με νερό, τα στομάτια κλείνουν, διότι η τροφοδοσία σε νερό δεν επαρκεί να καλύψει τις διαπνευστικές απώλειες (Taiz and Zeiger, 1998; Salisbury and Ross, 1992).

Εφόσον τα στομάτια παραμένουν ερμητικά κλειστά, τα φυτά είναι ικανά να αντεπεξέρχονται συνθήκες έντονης ξηρασίας. Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις φυτών όπως τα *Vigna unguiculata* και *Manihot esculent*, τα οποία αντιδρούν άμεσα σε συνθήκες περιορισμένης διαθεσιμότητας νερού κλείνοντας τα στομάτια και μειώνοντας τη διαπνοή, τόσο που το υδατικό δυναμικό του φύλλου να παραμένει σταθερό. Σε περιόδους ξηρασίας είναι δυνατόν το κλείσιμο των στοματιών να προκληθεί με δύο τρόπους, είτε παθητικά είτε ενεργητικά. Η πρώτη περίπτωση σχετίζεται με εξάτμιση του νερού κατευθείαν από τα καταφρακτικά κύτταρα καθώς αυτά είναι άμεσα εκτεθειμένα στο περιβάλλον. Συνήθως το συγκεκριμένο φαινόμενο εμφανίζεται σε συνθήκες χαμηλής ατμοσφαιρικής υγρασίας όπου η άμεση εξάτμιση μορίων νερού από τα καταφρακτικά κύτταρα δεν μπορεί να

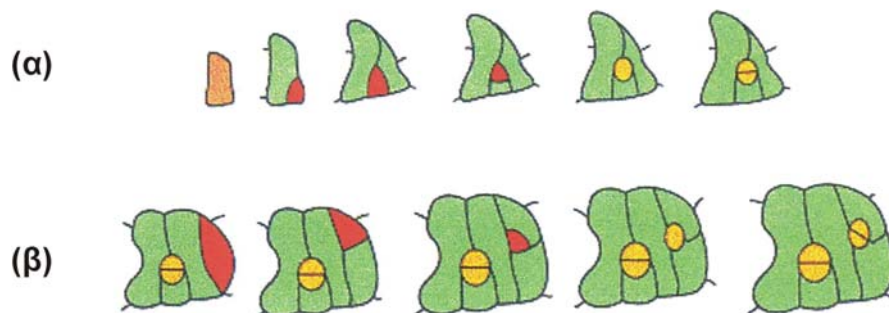
αναπληρωθεί με την είσοδο του νερού από τα γειτονικά επιδερμικά. Το ενεργητικό κλείσιμο των στοματιών, είναι αποτέλεσμα μεταβολικών διαδικασιών και πραγματοποιείται με αλλαγή στη συγκέντρωση καλίου στο χυμοτόπιο των καταφρακτικών κυττάρων (Taiz and Zeiger, 1998; Salisbury and Ross, 1992).

Η ρύθμιση του κλεισίματος των στοματιών μπορεί να προέλθει από ενδογενή σήματα προερχόμενα είτε από τα φύλλα είτε από το ριζικό σύστημα. Υπό συνθήκες ήπιας αφυδάτωση των κυττάρων του μεσόφυλλου, το αμποισικό οξύ το οποίο είναι αποθηκευμένο στο χυμοτόπιο μεταφέρεται στον αποπλάστη και στη συνέχεια μέσω του διαπνευστικού ρεύματος στα καταφρακτικά κύτταρα όπου και δίνει το ερέθισμα για κλείσιμο των στοματιών. Παράλληλα προκαλείται και εκ νέου σύνθεση αμποισικού που ενισχύει ή παρατείνει το κλείσιμο των στοματιών που έχει προέλθει με την αρχική μετακίνηση της ορμόνης. Ανάλογα σήματα προέρχονται και από το ριζικό σύστημα του φυτού. Έτσι όταν ένα μέρος του ριζικού συστήματος καταπονείται λόγω έλλειψης νερού ενώ το υπόλοιπο ενυδατώνεται επαρκώς, τα στομάτια κλείνουν ως απόκριση στο αμποισικό οξύ που εκλύεται από τις αφυδατωμένες ρίζες και μεταφέρεται με τον ανιόντα χυμό (Taiz and Zeiger, 1998; Salisbury and Ross, 1992).

1.8.4. Οντογένεση στοματιών

Η κατανομή των στοματιών στην επιφάνεια των φύλλων δεν είναι τυχαία όπως φαίνεται με μία πρώτη προσέγγιση. Κατ' αρχήν τα ζεύγη των καταφρακτικών κυττάρων δεν έρχονται σε επαφή μεταξύ τους διότι μεσολαβεί τουλάχιστον ένα επιδερμικό κύτταρο. Η παρατήρηση αυτή μειώνει σε πολύ μεγάλο βαθμό τον παράγοντα του τυχαίου στη διάταξη των στοματιών (Sachs, 1991). Η διαφοροποίηση των στοματιών διαρκεί έως ότου το φύλλο να φτάσει το 10-50% του τελικού μεγέθους του. Ο αριθμός και η συχνότητα των στοματιών για ένα δεδομένο φύλλο αυξάνει κατά τη διάρκεια της περιόδου αυτής, ενώ στη συνέχεια προοδευτικά μειώνεται ανεξάρτητα με το γεγονός ότι τα επιδερμικά κύτταρα συνεχίζουν να εκτείνονται (Tichá, 1982).

Η οντογένεση των στοματίων πραγματοποιείται με τη διαδοχική συμμετοχή τριών πρόδρομων κυττάρων. Ένα κύτταρο πρωτοδέρματος διαιρείται μη συμμετρικά και προκύπτει ένα παρακαταφρακτικό κύτταρο και το πρώτο πρόδρομο κύτταρο του στοματίου το οποίο ονομάζεται *μεριστωμοειδές μητρικό κύτταρο (meristemoid mother cell, MMC)*. Στη συνέχεια το MMC διαιρείται εκ νέου μη συμμετρικά και προκύπτει ένα νέο παρακαταφρακτικό κύτταρο και το δεύτερο πρόδρομο κύτταρο, το *μεριστωμοειδές (meristemoid, M)*. Το M είναι συνήθως μικρού μεγέθους κύτταρο με τριγωνικό σχήμα. Στη συνέχεια το M υφίσταται και πάλι μια ανισοκυτταρική διαίρεση μέσω της οποίας προκύπτει ένα νέο M το οποίο πλέον είναι το τρίτο πρόδρομο-κύτταρο του στοματίου, το *μητρικό καταφρακτικό κύτταρο (guard mother cell, GMC)*. Το GMC έχει ελλειψοειδές σχήμα και με μία συμμετρική διαίρεση παράγει τα δύο καταφρακτικά κύτταρα του στοματικού συμπλόκου (**ΕΙΚΟΝΑ I.5**) (Zhao and Sack, 1999). Κάτω από ορισμένες προϋποθέσεις (π.χ. ύπαρξη ορμονικού ελέγχου) είναι δυνατόν το παρακαταφρακτικό κύτταρο της τρίτης ανισοκυτταρικής διαίρεσης να εισέλθει εκ νέου στην οντογενετική διαδικασία, με αποτέλεσμα να προκύψει ένα δεύτερο στοματικό σύμπλοκο (δεύτερης τάξης) μετά από 1-2 μη συμμετρικές διαιρέσεις (**ΕΙΚΟΝΑ I.5**). Ομοίως μπορεί να προκύψει και ένα στοματικό σύμπλοκο τρίτης τάξης (Serna and Fenoll, 2000a; Berger and Altmann, 2000). Είναι φανερό ότι τα



Εικόνα I.5. Ανάπτυξη στοματίων στο φυτό *Arabidopsis*. Οντογένεση στοματικού συμπλόκου πρώτης τάξης (α), οντογένεση στοματικού συμπλόκου δεύτερης τάξης (β). (Κύτταρο πρωτοδέρματος: πορτοκαλί; μεριστωμοειδές μητρικό κύτταρο, μεριστωμοειδές: κόκκινο; μητρικό καταφρακτικό κύτταρο, καταφρακτικά κύτταρα: κίτρινο; παρακαταφρακτικά κύτταρα: πράσινο), (Serna and Fenoll, 2000a).

κύτταρα των στοματικών συμπλόκων προέρχονται από το ίδιο πρόδρομο κύτταρο, συνεπώς αποτελούν μία κυτταρική σειρά. Στο σημείο αυτό, πρέπει να επισημανθεί ότι τα νέα ζεύγη καταφρακτικών κυττάρων που δημιουργούνται είναι απολύτως προσανατολισμένα ως προς τα ωριμότερα ώστε πάντα να μεσολαβεί μεταξύ τους ένα τουλάχιστον παρακαταφρακτικό κύτταρο (**ΕΙΚΟΝΑ I.5**) (Serna and Fenoll, 2000a). Κύτταρα τα οποία δε διαθέτουν τον σωστό προσανατολισμό και συμμετέχουν στην οντογένεση των στοματίων θα σταματήσουν να αναπτύσσονται σε πολύ πρώιμα στάδια όταν ακόμα δεν έχουν διαφοροποιηθεί σε κύτταρα-προδρόμους (Sachs et al., 1993; Chin et al., 1995; Kagan and Sachs, 1991). Όσον αφορά στη χωροταξική τους κατανομή τα μεριστωμοειδή, αλλά και τα ώριμα στομάτια δημιουργούνται σε θέσεις οι οποίες βρίσκονται πάνω από τα σημεία επαφής των κυττάρων του μεσοφύλλου, γεγονός που υποδηλώνει ότι η θέση που θα καταλάβουν τα στομάτια στην επιδερμίδα είναι σε άμεση σχέση με τη διάταξη των κυττάρων του μεσόφυλλου ήδη από τα πολύ πρώιμα στάδια της οντογένεσης (Serna and Fenoll, 2000b).

Η ανάπτυξη και η κατανομή των στοματίων στην επιφάνεια του φύλλου επηρεάζεται από ενδογενείς παράγοντες των φυτών δηλαδή πραγματοποιείται υπό την αλληλεπίδραση ορισμένων γονιδίων. Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* έχουν δημιουργηθεί πολλές μεταλλάξεις οι οποίες φαίνεται να επηρεάζουν τον σχηματισμό και την κατανομή των στοματίων στην επιφάνεια του φύλλου. Ανάμεσα στις μεταλλάξεις αυτές, συγκαταλέγονται των γονιδίων *COP10*, *ERH3*, *TMM*, *FLP*, *GLABRA2* οι οποίες φαίνεται να μην επιτρέπουν τη δημιουργία συσσωματωμάτων στοματίων χωρίς την απαιτούμενη απόσταση μεταξύ τους (Wei et al., 1994; Yang and Sack, 1995; Geisler et al., 1998; Hung et al., 1998). Ωστόσο ορισμένων εξ αυτών, είτε δεν έχουν καθολική διάδοση σε όλα τα εναέρια μέρη του φυτού είτε δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος ο ρόλος τους.

Πρόσφατα δεδομένα που αφορούν στο γονίδιο *SDD1* (*stomatal density and distribution*) και την πρωτεΐνη που κωδικοποιεί έδειξαν ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της πυκνότητας των στοματίων και στην κατανομή τους στην επιφάνεια του φύλλου του φυτού *Arabidopsis*. Πιο συγκεκριμένα

το *SDD1* μαζί και με άλλους παράγοντες οι οποίοι παραμένουν άγνωστοι, καθορίζει τον αριθμό των κυττάρων του πρωτοδέρματος τα οποία θα εμπλακούν στη διαδικασία οντογένεσης των στοματίων και ελέγχει τον αριθμό των κυτταρικών διαιρέσεων που θα υποστεί μια κυτταρική σειρά έως ότου παραχθούν τα στοματικά σύμπλοκα. Ελέγχει επίσης τον προσανατολισμό των κυτταρικών διαιρέσεων ώστε να αποτρέπεται η δημιουργία γειτονικών ζευγών καταφρακτικών κυττάρων. Εκτός αυτών το *SDD1* καθορίζει τον αριθμό των στοματίων δεύτερης ή μεγαλύτερης τάξης που είναι δυνατό να προκύψουν χωρίς να διαταράσσεται η σωστή τοποθέτηση των υπολοίπων συμπλόκων στην επιφάνεια του φύλλου (Berger and Altmann, 2000).

Η πρωτεΐνη την οποία κωδικοποιεί το γονίδιο *SDD1* είναι μια πρωτεάση της ομάδας των σαμπτυλινών. Έχει αποδειχθεί ότι το προϊόν του γονιδίου είναι απαραίτητο για τη μεταγωγή ορισμένων σημάτων κατά την έναρξη της οντογένεσης των στοματίων, είτε μέσω ενεργοποίησης του πρωτεϊνικού μορίου-σήματος είτε μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα του μορίου αυτού. Η αντίληψη του σήματος από τα κύτταρα του πρωτοδέρματος ή τα αναπτυσσόμενα παρακαταφρακτικά κύτταρα πιθανόν να οδηγεί στη διαφοροποίηση τους σε μεριστωμοειδή κύτταρα (Berger and Altmann, 2000). Η σχετική αναλογία των πεπτιδίων που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *TMM*, *FLP* (*too many mouths* και *four lips* αντίστοιχα) φαίνεται ότι καθορίζει την κυτταρική μοίρα των κυττάρων του πρωτοδέρματος καθορίζοντας τελικά την παραγωγή τριχών ή στοματίων (Larkin et al., 1997).

Ορισμένοι παράγοντες του περιβάλλοντος επηρεάζουν την οντογένεση των στοματίων. Σε πολλά φυτά ο αριθμός των στοματίων ανά μονάδα επιφάνειας, η κατανομή τους και το μέγεθος τους επηρεάζεται όχι μόνο από το αναπτυξιακό στάδιο του φύλλου αλλά και από την ακτινοβολία, την υγρασία, τη θερμοκρασία, τη διαθεσιμότητα του νερού και των θρεπτικών στοιχείων καθώς και τη συγκέντρωση του CO₂ (Tichá, 1982; Berger and Altmann, 2001; Beerling et al., 1998). Για παράδειγμα φυτά τα οποία αναπτύσσονται σε ξηρά εδάφη και χαμηλή ατμοσφαιρική υγρασία

παρουσιάζουν μικρότερο αριθμό στοματίων σε σχέση με φυτά που αναπτύσσονται σε υγρά εδάφη και υψηλή σχετική υγρασία. Τα φυτά επίσης που αναπτύσσονται σε πλήρες ηλιακό φως διαθέτουν περισσότερα στομάτια ανά επιφάνεια σε σχέση με αυτά που αναπτύσσονται σε σκιά ή στο σκοτάδι (Willmer, 1983). Οι υψηλές συγκεντρώσεις CO₂ στην ατμόσφαιρα επιφέρουν μείωση του αριθμού των στοματίων των νεαρών φύλλων. Είναι ενδιαφέρον ότι η μετάδοση του σήματος για τη μείωση του αριθμού των στοματίων στα νεώτερα φύλλα προέρχεται από τα ώριμα γιατί έχει φανεί ότι τα πολύ νεαρά φύλλα δεν μπορούν να αντιληφθούν άμεσα την αλλαγή της συγκέντρωσης του CO₂ στην ατμόσφαιρα (Lake et al., 2001).

I.9. Φυτικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματικό υλικό

I.9.1. *Jasminum grandiflorum* (κν. Γιασεμί χιώτικο)



Θάμνος με γωνιώδεις κλάδους σχεδόν λείους. Τα φύλλα είναι πτερωτά, περιττόληκτα με 5-7 φυλλάρια, ελλειψοειδή-στρογγυλά ή ωοειδή με το επάκριο φυλλάριο μεγαλύτερο ωοειδές και οξύληκτο. Φύονται αντίθετα με ράχη πεπλατυσμένη πτερυγοειδώς. Άνθη εξαιρετικά εύοσμα με τους λοβούς της στεφάνης διατεταγμένους αστεροειδώς. Ανθίζει στις αρχές καλοκαιριού και μέχρι τέλος φθινοπώρου. Στα θερμά μέρη ανθίζει καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Ανθεκτικό φυτό τόσο σε υψηλές εντάσεις ηλιακής ακτινοβολίας όσο και σε χαμηλές θερμοκρασίες. Πολλαπλασιάζεται κυρίως με καταβολάδες και με εμβολιασμό στο *J. officinalis*. Κατάγεται από τις Ινδίες και την Μαλαισία. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή γιασμονέλαιου.

I.9.2. *Prunus persica* (κν. Ροδακινιά)



Δένδρο της οικογένειας Rosaceae (υπ. Prunoideae). Έχει ύψος 3-5m και φέρει κλάδους λείους, στενούς, πρασινωπούς ή κοκκινωπούς. Τα φύλλα είναι λογχοειδή, οδοντωτά-πριονωτά και λεία, προμήκη, διπλωτά κατά μήκος σε νεαρή ηλικία ενώ διαθέτουν βραχύ μίσχο ενίοτε αδενοφόρο. Τα άνθη είναι ρόδινα, μονήρη, σχεδόν

επιφυή, εκπυσοσόμενα πριν από τα φύλλα, με κωδωνοειδή 5λοβο κάλυκα. Φέρει 5 πέταλα και 15 -30 στήμονες. Επιφυής, μονόστηλη ωοθήκη. Καρπός σφαιρική δρύπη με βελούδινο χνούδι, σαρκώδης, χυμώδης και αρραγής. Πυρήνας υποσφαιρικός, με κέλυφος κοκκινωπό με ρωγμές, ο οποίος φέρει 1-2 σπέρματα.

I.9.3. *Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch (κν. Αμπέλοψις)



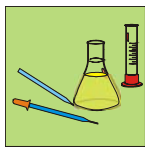
Αναρριχώμενο φυτό της οικογένειας Vitaceae. Η αναρρίχηση πραγματοποιείται με τη βοήθεια ελίκων οι οποίες στην άκρη τους φέρουν δικοειδή εξαρτήματα. Διαθέτει σύνθετα φύλλα παλαμοειδούς σχήματος, συνήθως με 5 φυλλάρια, οξύληκτα, ελλειπτικού έως αντιστρόφως ωοειδούς σχήματος. Τα φυλλάρια συνήθως έχουν 15 cm μήκος και 8 cm πλάτος. Τα άνθη είναι μικρά και πολυάριθμα, πρασινοκίτρινου χρώματος και φέρονται σε κυματοειδή βότρυ. Η αμπέλοψις ανθοφορεί την άνοιξη ή νωρίς το καλοκαίρι. Ο καρπός είναι σφαιρική δρύπη, με διάμετρο 2-9 mm, μαύρου ή σκούρου μπλε χρώματος και φέρει 1-3 σπέρματα τα οποία ωριμάζουν τον Σεπτέμβριο. Η αμπέλοψις ενδημεί στις ανατολικές περιοχές των Η.Π.Α., στο νότιο ανατολικό τμήμα του Καναδά και στις βόρειες περιοχές του Μεξικού.

ΣΚΟΠΟΣ

Προηγούμενες εργασίες της ερευνητικής μας ομάδας έδειξαν ότι τα επιδερμικά κύτταρα καθώς και τα καταφρακτικά κύτταρα των στοματιών αρκετών φυτικών ειδών όταν διεγερθούν από υπεριώδη ακτινοβολία εκπέμπουν μπλε φθορισμό. Η ελάττωση του εκπεμπόμενου φθορισμού μετά την εμβάπτιση των φύλλων σε χλωροφόρμιο έδειξε ότι ο φθορισμός προέρχεται κυρίως από το στρώμα των επεφυμενιδικών κηρών. Οι χρωματογραφικές αναλύσεις που έγιναν σε δείγματα κηρών των φυτών *Olea europaea* και *Prunus persica* έδειξαν ότι οι κύριοι φθορίζοντες παράγοντες ήταν φαινολικά συστατικά εστεροποιημένα στο πλέγμα των κηρών.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της διαδικασίας δημιουργίας του στρώματος των επεφυμενιδικών κηρών και της εναπόθεσης των φαινολικών συστατικών σε αυτούς, κατά την πορεία ανάπτυξης των φύλλων ορισμένων φυτικών ειδών. Κρίθηκε σκόπιμο να γίνει συνδυασμός παρατηρήσεων σε μικροσκόπιο φθορισμού, φασματομετρικών μετρήσεων και χρωματογραφικών αναλύσεων των επεφυμενιδικών κηρών αντιπροσωπευτικών ειδών κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των φύλλων.

Μέσω των μικροσκοπικών παρατηρήσεων διαπιστώθηκε η πορεία της οντογένεσης των στοματικών συμπλόκων, καθώς και η διαδικασία εναπόθεσης των φαινολικών συστατικών στο στρώμα των επεφυμενιδικών κηρών, ενώ μέσω των χημικών αναλύσεων έγινε προσπάθεια να επιβεβαιωθούν οι παραπάνω παρατηρήσεις και να συνδυαστούν τα αποτελέσματα ώστε να προκύψει μια αποδεκτή ερμηνεία.



ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

II.1. Φυτικό υλικό

Τα δείγματα του φυτού *Prunus persica* συλλέχθηκαν από το δενδροκομείο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών ενώ αυτά των φυτών *Jasminum grandiflorum* και *Parthenocissus quinquefolia* από κήπους της Αττικής. Οι κλαδίσκοι οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για τη δειγματοληψία είχαν νότια έκθεση και ήταν εκτεθειμένοι σε πλήρες ηλιακό φως. Το πειραματικό υλικό αποτελείτο από φύλλα 1^{ου}, 2^{ου}, 4^{ου} και 8^{ου} κόμβου (*P. persica*), φύλλα 1^{ου}, 2^{ου}, 3^{ου}, 4^{ου}, 5^{ου}, 6^{ου}, 7^{ου} κόμβου καθώς και ώριμα (*P. quinquefolia*) και φύλλα 1^{ου}, 2^{ου}, 3^{ου}, 4^{ου} κόμβου καθώς και ώριμα (*J. grandiflorum*). Μετά τη συλλογή τους τα φύλλα μεταφέρθηκαν με φορητό ψυγείο στο εργαστήριο. Τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν αμέσως ή φυλάχθηκαν στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

II.2. Μικροσκοπικές παρατηρήσεις

Για τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις χρησιμοποιήθηκαν νωπά δείγματα από τα παραπάνω φυτά. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν άθικτα ή σε εγκάρσιες τομές με το χέρι αφού εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα ΚΟΗ 25% (Karabourniotis et al., 2001). Τα άθικτα δείγματα ξεπλύθηκαν με νερό πριν την παρατήρηση ενώ οι εγκάρσιες τομές παρατηρήθηκαν σε διάλυμα ΚΟΗ. Το μικροσκόπιο (Zeiss AxioLab) ήταν εξοπλισμένο με φίλτρο διέγερσης G-365 (μέγιστη ενέργεια διέγερσης στα 365 nm) και φίλτρο φραγμού FT-395. Οι εικόνες αποθηκεύτηκαν σε ψηφιακή μορφή μέσω κάμερας (CCD color camera SSC-DC 38P/45, SONY Corporation).

II.3. Χημικές αναλύσεις των χλωροφορμικών εκπλυμάτων

Τα φύλλα εμβαπτίστηκαν (*P. quinquefolia*) ή ξεπλύθηκαν χωριστά για κάθε επιφάνεια (*P. persica*) με χλωροφόρμιο για 30 s σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Riederer and Schneider, 1989). Επιπλέον, για τα φύλλα του 4^{ου} κόμβου του φυτού *P. quinquefolia*, έγινε χειρισμός ώστε να ληφθούν εκπλύματα χωριστά για το βασικό και κορυφαίο τμήμα του ελάσματος. Η επιφάνεια των φύλλων μετρήθηκε με σαρωτή. Τα φάσματα απορρόφησης στην περιοχή 200-500 nm ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-

160A ενώ τα φάσματα εκπομπής φθορισμού ελήφθησαν με μήκος κύματος διέγερσης 366 nm σε φασματοφθορισμόμετρο Jasco FP-920. Για τις φασματοσκοπικές μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν χλωροφορμικά εκπλύματα αφού καθαρίστηκαν με διήθηση μέσω ηθμού (Whatman No3). Στη συνέχεια τα χλωροφορμικά εκπλύματα συμπυκνώθηκαν σε περιστροφικό συμπυκνωτή κενού κάτω από ρεύμα αζώτου στους 30°C. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγίστηκε ώστε να υπολογιστεί το βάρος των παραληφθέντων κηρών. Ακολούθως το δείγμα επαναδιαλύθηκε σε 5 ml μίγματος CHCl₃:MeOH 1:4 (v/v). Το δείγμα επεξεργάστηκε με 5 ml NaOH 8N στους 60°C για 1 h ώστε να υδρολυθούν οι εστερικοί δεσμοί των φαινολικών συστατικών με τα πολυμερή των κηρών. Μετά το πέρας της υδρόλυσης, το δείγμα ψύχθηκε σε παγόλουτρο και το NaOH εξουδετερώθηκε με HCl (pH 7). Το δείγμα εκχυλίστηκε με 15 ml οξικού αιθυλεστέρα και η οργανική φάση συμπυκνώθηκε έως ξηρού όπως παραπάνω. Το ξηρό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 1 ή 2 ml MeOH 50% και φυλάχτηκε στους -20°C.

II.4. Χρωματογραφικές αναλύσεις

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελούμενο από τριαδικό gradient LG-980-2, αντλία PU-980, θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας αναλυτικής στήλης Jones Chromatography 7971 και ανιχνευτές απορρόφησης υπεριώδους UV-970 και εκπομπής φθορισμού FP-920 (Jasco Corporation). Το δείγμα εισήχθη μέσω βαλβίδας Rheodyne 7725i με κυκλική διαδρομή όγκου 20 μl στην αναλυτική στήλη (APEX ODS 5 μm, 250 × 4,6 mm, Jones Chromatography) εξοπλισμένη με στήλη προστασίας (APEX ODS 5μm, 10 × 4,6 mm). Οι συνθήκες της ανάλυσης ήταν 30 °C, ροή 1,2 ml min⁻¹ με διαλύτες A: 5% HCOOH σε H₂O και B: 5% HCOOH σε MeCN και αλληλουχία σύστασης της κινητής φάσης ως εξής: 95:5 (A:B) ισοκρατικό για 5 min; gradient προς 85:15 σε 15 min; ισοκρατικό για 5 min; gradient προς 77,5:22,5 σε 10 min; gradient προς 72,5:27,5 σε 10 min; gradient προς 67,5:32,5 σε 5 min; gradient προς 55:45 σε 5 min; gradient προς 50:50 σε 5 min; gradient προς 30:70 σε 5 min και gradient προς 0:100 σε 5 min. Μεταξύ των αναλύσεων η στήλη ξεπλενόταν

με 100% MeCN για 5 min και η μετάβαση στις αρχικές συνθήκες γινόταν σε 10 min. Η ανίχνευση γινόταν για την απορρόφηση υπεριώδους στα 280 nm και για την εκπομπή φθορισμού στα 430 nm με διέγερση στα 365 nm.

II.5. Χημικά αντιδραστήρια

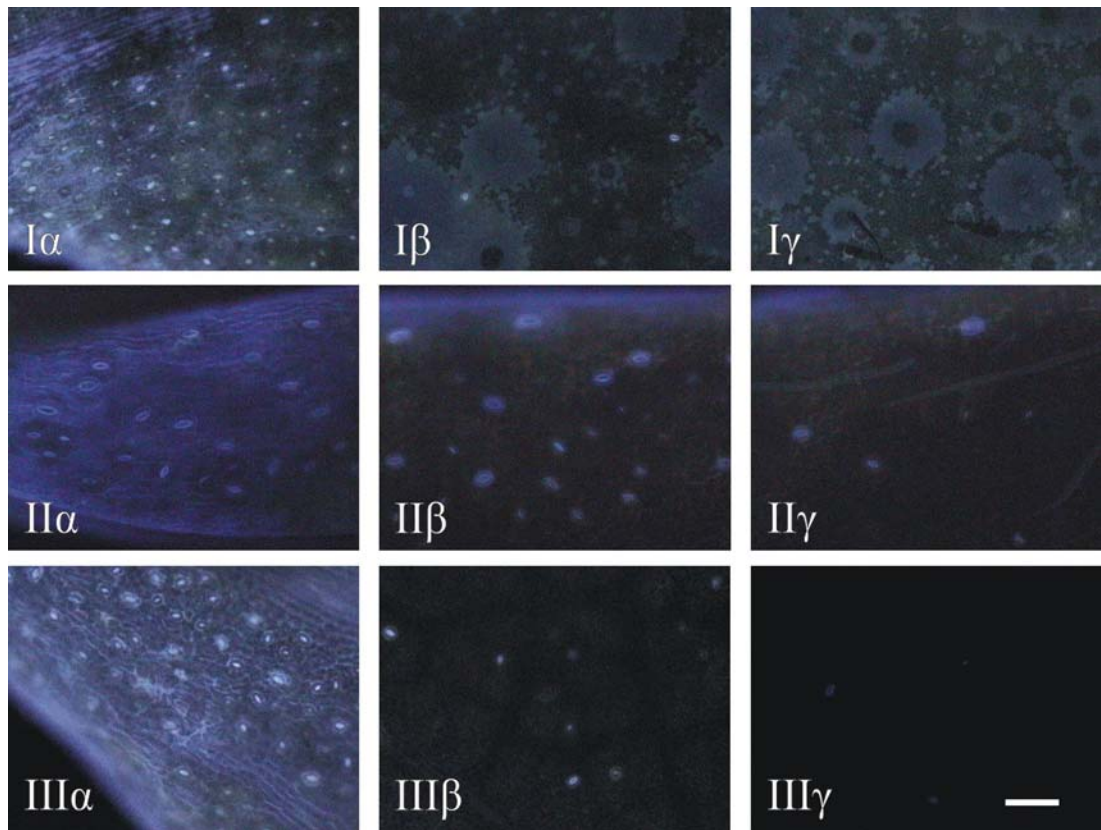
Όλα τα αντιδραστήρια ήταν αναλυτικής ποιότητας (Merck KGaA). Οι διαλύτες των χρωματογραφικών αναλύσεων ήταν ποιότητας HPLC (LabScan Ltd.).



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

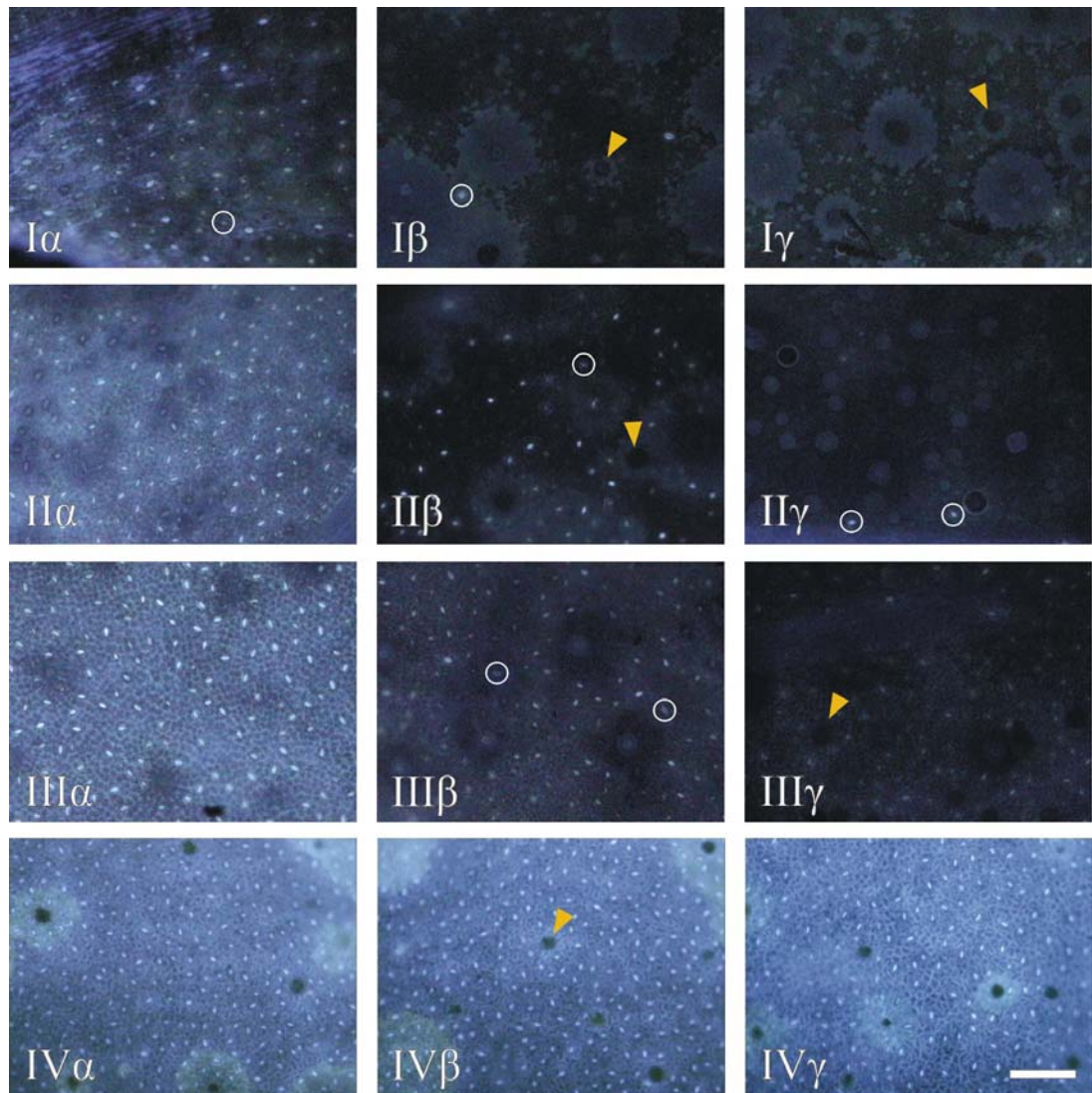
III.1. Μικροσκοπικές παρατηρήσεις των φύλλων σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια των φυτών

Οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν τόσο σε άθικτα φύλλα διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων όσο και σε εγκάρσιες τομές. Σε όλα τα παρασκευάσματα φάνηκε ο χαρακτηριστικός επαγόμενος μπλε φθορισμός των στοματιών και των επιδερμικών κυττάρων. Οι παρατηρήσεις στα άθικτα φύλλα έγιναν σε τρεις περιοχές, κορυφή, βάση και μέσο του φύλλου (ΕΙΚΟΝΕΣ III.1 και III.2). Στα παρασκευάσματα των άθικτων φύλλων διαπιστώθηκε αύξηση τόσο στην πυκνότητα των στοματιών όσο και στην



Εικόνα III.1. Φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού της αποαζονικής επιφάνειας φύλλων 1^{ου} κόμβου των φυτών *Jasminum grandiflorum* (I), *Prunus persica* (II), *Parthenocissus quinquefolia* (III) στα οποία διακρίνεται ο χαρακτηριστικός μπλε φθορισμός που οφείλεται σε εφυμενιδικές εναποθέσεις φθοριζόντων συστατικών πάνω από τα επιδερμικά και καταφρακτικά κύτταρα. Οι εικόνες προέρχονται από περιοχές που βρίσκονται στην κορυφή (α), στο μέσο (β) και στη βάση (γ) του φύλλου. Η ένταση του φθορισμού και πυκνότητα των στοματιών μειώνονται από την κορυφή προς τη βάση του φύλλου. Τα φύλλα εμβαπτίστηκαν για 15 sec σε διάλυμα KOH 25%. (Κλίμακα 100 μm).

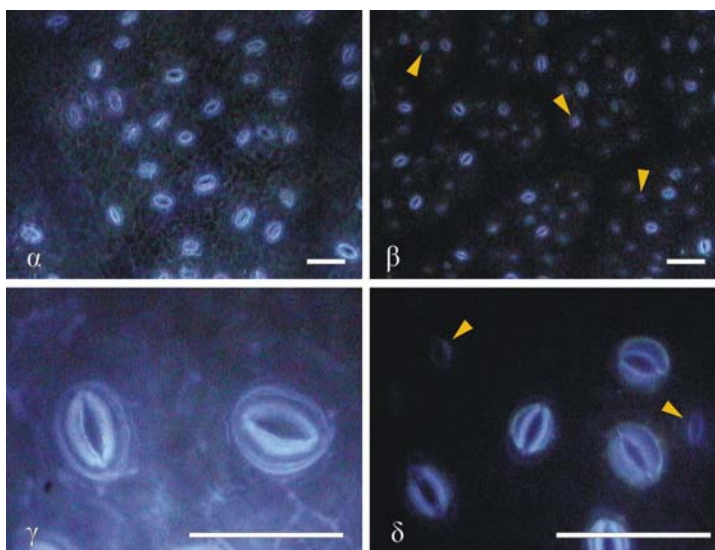
ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού με κατεύθυνση από τη βάση προς τη κορυφή του φύλλου (ΕΙΚΟΝΕΣ III.1 και III.2). Η διαβάθμιση αυτή ήταν χαρακτηριστική για τα αναπτυσσόμενα φύλλα ενώ δεν παρατηρήθηκε σε ώριμα φύλλα σε κανένα από τα φυτικά είδη που εξετάστηκαν. Στην ΕΙΚΟΝΑ III.2 παρουσιάζονται άθικτα αναπτυσσόμενα φύλλα γιασεμιού 1^{ου}, 2^{ου}, 3^{ου} κόμβου στα οποία διακρίνεται η χαρακτηριστική διαβάθμιση στην ένταση του φθορισμού και στην πυκνότητα των στοματιών καθώς και η αύξηση της



Εικόνα III.2. Φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού της αποαζονικής επιφάνειας φύλλων 1^{ου} (I), 2^{ου} (II) και 3^{ου} (III) κόμβου καθώς και ώριμων φύλλων (IV) του φυτού *Jasminum grandiflorum*. Οι εικόνες προέρχονται από περιοχές που βρίσκονται στην κορυφή (α), στο μέσο (β) και στη βάση (γ) του φύλλου. Οι κύκλοι περικλείουν στοματία στα οποία η εναπόθεση των φθοριζόντων συστατικών δεν έχει ολοκληρωθεί. Με τα βέλη παρουσιάζονται οι αδένες των φύλλων. (Κλίμακα 100 μm).

πυκνότητας των στοματίων αυξανόμενη της ηλικίας του φύλλου. Ανάλογη εικόνα εμφανίζουν και τα υπόλοιπα φυτικά είδη.

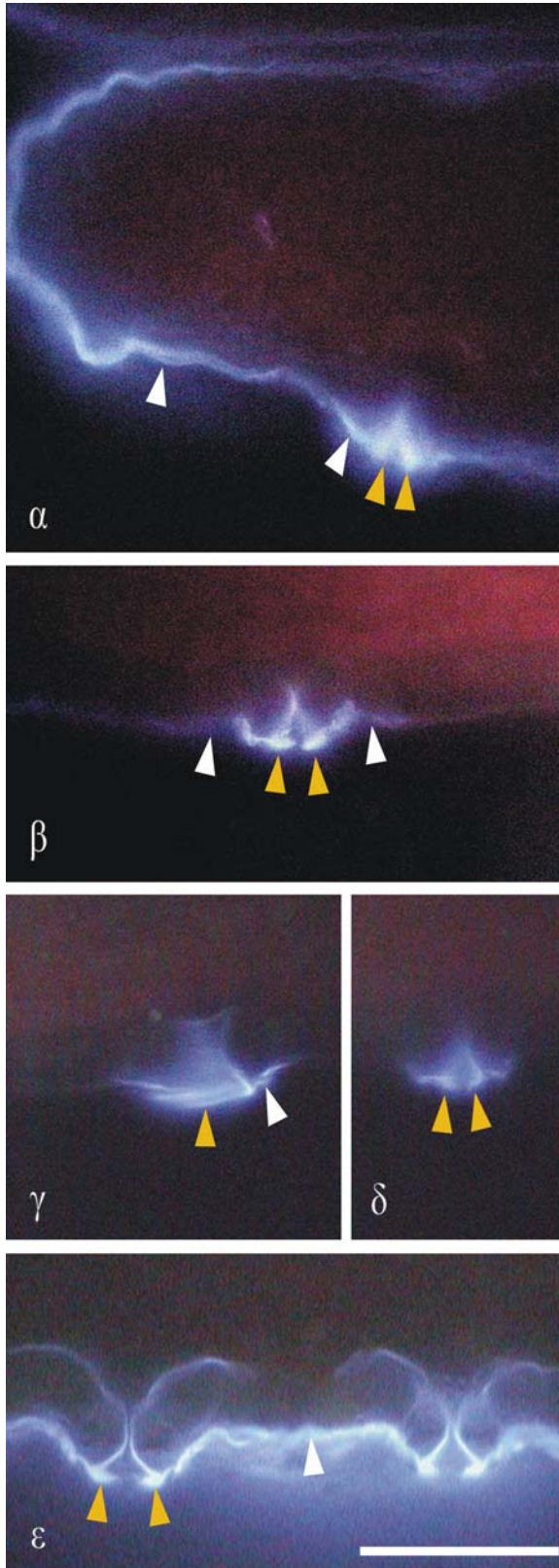
Οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις σε μεμονωμένα στομάτια άθικτων φύλλων διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων προερχόμενα από όλα τα φυτικά είδη έδειξαν ότι στομάτια διαφορετικών οντογενετικών σταδίων εμφανίζουν και διαφορετική ένταση στον εκπεμπόμενο φθορισμό (ΕΙΚΟΝΑ III.3).



Εικόνα III.3. Φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού στοματίων ώριμου φύλλου (α, γ) και φύλλου 5^{ου} κόμβου (β,δ) του φυτού *Prunus persica*. Η οντογένεση των στοματίων στο φύλλο του 5^{ου} κόμβου είναι σε εξέλιξη ενώ έχει ολοκληρωθεί στο ώριμο φύλλο. Τα βέλη δείχνουν στομάτια σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. (Κλίμακα 100 μm).



Εικόνα III.4. Φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού εγκάρσιων τομών φύλλων 1^{ου} κόμβου του φυτού *Prunus persica*. Οι τομές προέρχονται από περιοχές της κορυφής (α), του μέσου (β) και της βάσης του φύλλου (γ). Η εναπόθεση των φθοριζόντων συστατικών στην κορυφή του φύλλου είναι σε προχωρημένο στάδιο (α) ενώ στη βάση του δε φαίνεται να έχει αρχίσει (γ). Η εναπόθεση των φθοριζόντων συστατικών ξεκινά από την κεντρική νεύρωση του φύλλου και τα σημεία πάνω από τα καταφρακτικά κύτταρα (β) (κίτρινα βέλη). Με το λευκό βέλος σημειώνεται στομάτιο σε εγκάρσια τομή. (Κλίμακα 50 μm).



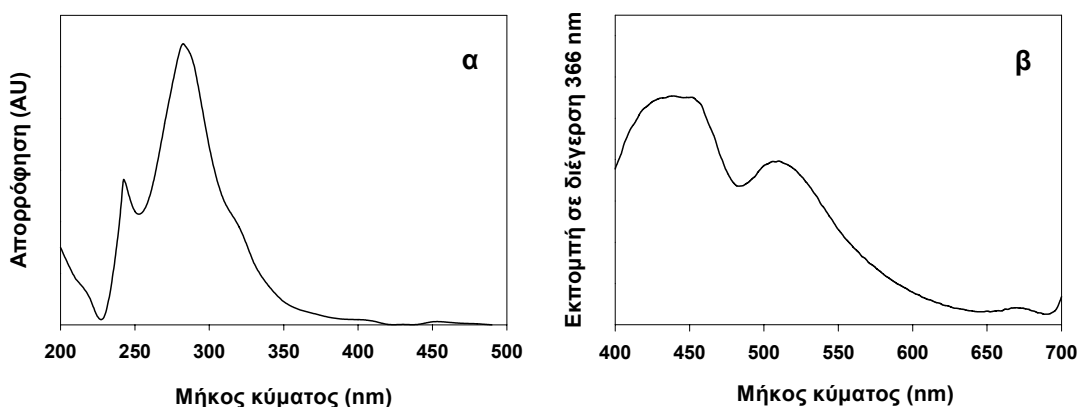
Εικόνα++ ΠΙ.5. Φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού εγκάρσιων τομών φύλλων 1^{ου} κόμβου (α-δ) και ώριμων φύλλων (ε) του φυτού *Prunus persica*. Οι εικόνες προέρχονται από διαδοχικές τομές από την κορυφή προς τη βάση του φύλλου (α-δ). Στην εικόνα (γ) η τομή του στοματίου είναι παράλληλη με τον μεγάλο άξονα. Η συσσώρευση των φθοριζόντων συστατικών αρχίζει από τα επάρματα των καταφρακτικών κυττάρων (κίτρινα βέλη) και εκτείνεται περιφερειακά του στοματίου (λευκά βέλη). (Κλίμακα 50 μm).

Στις εγκάρσιες τομές αναπτυσσόμενων φύλλων ροδακινιάς 1^{ου} και 2^{ου} κόμβου παρατηρήθηκε η διαδοχή με την οποία εναποτίθενται τα φθορίζοντα συστατικά στους επιεφυμενιδικούς κηρούς των επιδερμικών κυττάρων

(ΕΙΚΟΝΑ III.4). Αρχικά επιβεβαιώθηκαν οι παρατηρήσεις οι οποίες έγιναν στα άθικτα φύλλα και έδειξαν ότι οι εναποθέσεις των φθοριζόντων συστατικών στην επιφάνεια τους αρχίζουν να κάνουν την εμφάνιση τους από την κορυφή (ΕΙΚΟΝΑ III.4). Επίσης τα φθοριζόντα φαινολικά συστατικά αρχίζουν να εναποτίθενται στην εφυμενίδα στις περιοχές που βρίσκονται πάνω από τις νευρώσεις των φύλλων και στους κηρούς που καλύπτουν τα καταφρακτικά κύτταρα των στοματιών (ΕΙΚΟΝΑ III.4). Οι εγκάρσιες τομές στοματιών των φύλλων του 1^{ου} και 2^{ου} κόμβου της ροδακινιάς έδειξαν ότι η εναπόθεση των φθοριζόντων συστατικών αρχίζει από τα καταφρακτικά κύτταρα των στοματιών και επεκτείνεται στα αμέσως γειτονικά επιδερμικά κύτταρα μέχρι να καλύψει και τα υπόλοιπα επιδερμικά κύτταρα (ΕΙΚΟΝΑ III.5).

III.2. Ανάλυση των επεφυμενιδικών κηρών του φυτού *Prunus persica* L. σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια

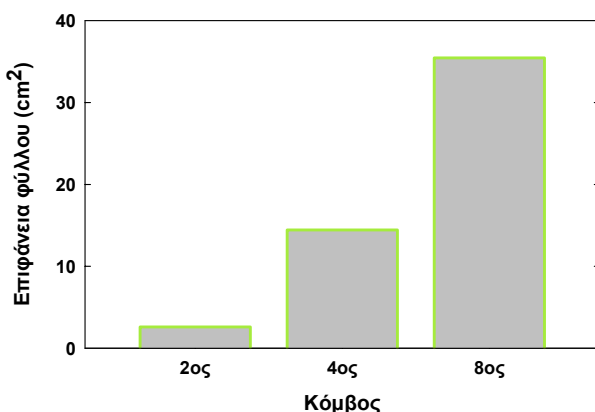
Για τη μελέτη των επεφυμενιδικών κηρών των φύλλων του φυτού *Prunus persica* και των φαινολικών συστατικών τα οποία έχουν εναποτεθεί σε αυτούς, αναλύθηκαν χλωροφορμικά εκπλύματα από την αποαξονική επιφάνεια φύλλων 2^{ου}, 4^{ου} και 8^{ου} κόμβου και από την προσαξονική επιφάνεια φύλλων 4^{ου} και 8^{ου} κόμβου εκπυσοόμενης βλάστησης. Τα φυτικά είδη επιλέχθηκαν ώστε να μη φέρουν τρίχες ή αδένες των οποίων τα φαινολικά συστατικά θα παραλαμβάνονταν και αυτά με τις χλωροφορμικές



Εικόνα III.6.α. Φάσμα απορρόφησης και β. φάσμα εκπομπής φθορισμού χλωροφορμικού εκπλύματος της αποαξονικής επιφάνειας φύλλων 4^{ου} κόμβου του φυτού *P. persica*.

εκπλύσεις. Μετρήθηκε η μέση επιφάνεια των φύλλων κάθε κόμβου και η ποσότητα των επεφυμενιδικών κηρών, ενώ για την εκτίμηση των εναποτιθέμενων φαινολικών συστατικών στους κηρούς, έγιναν φασματοσκοπικές μετρήσεις (απορρόφηση στο υπεριώδες και εκπομπή φθορισμού) των χλωροφορμικών εκπλυμάτων (**ΕΙΚΟΝΑ III.6**). Τέλος τα φαινολικά συστατικά των κηρών που παρελήφθησαν σε ελεύθερη μορφή με υδρόλυση, αναλύθηκαν με HPLC.

Η μέση επιφάνεια των φύλλων στα παραπάνω στάδια ανάπτυξης φαίνεται στην **ΕΙΚΟΝΑ III.7** όπου διακρίνεται η έντονη αύξηση της επιφάνειας του ελάσματος των φύλλων, ειδικά μετά το στάδιο του 2^{ου} κόμβου.

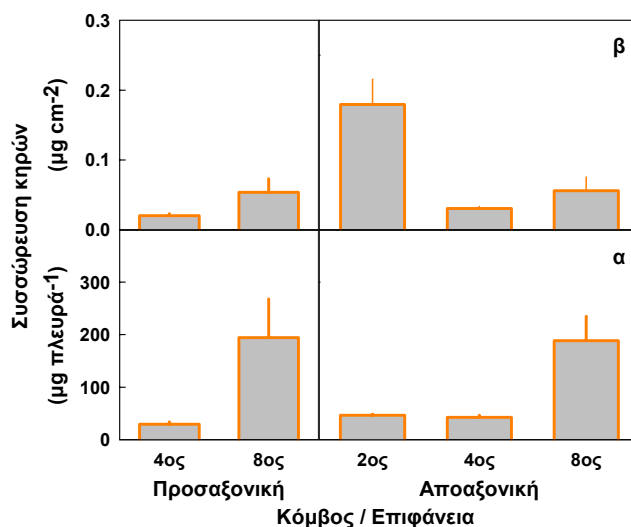


Εικόνα III.7. Η μέση επιφάνεια των φύλλων του φυτού *P. persica* στα διάφορα στάδια ανάπτυξης. Οι τιμές προέκυψαν από τον λόγο της συνολικής επιφάνειας προς τον αριθμό των φύλλων για κάθε δείγμα.

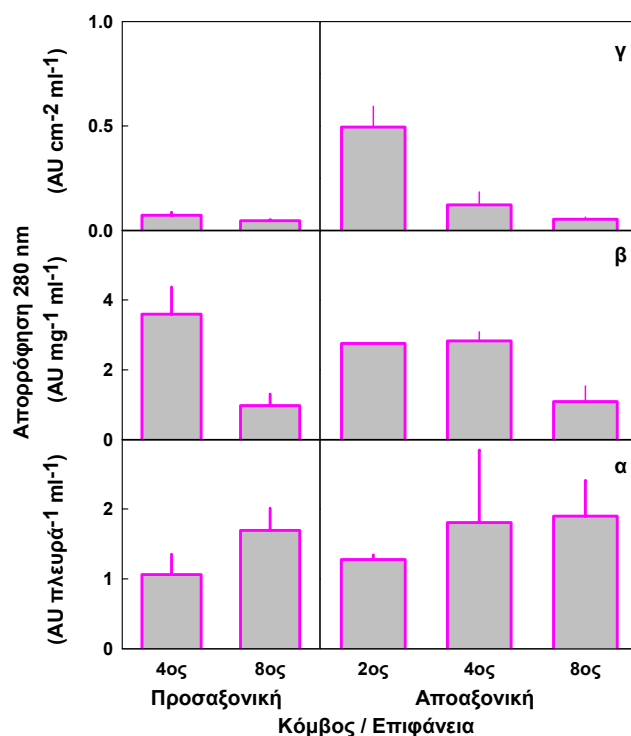
Στα αντίστοιχα στάδια ανάπτυξης, η εναπόθεση των επεφυμενιδικών κηρών ανά πλευρά φύλλου εμφανίστηκε να ξεκινά από μια αρχική τιμή και να αυξάνεται στο στάδιο του 8^{ου} κόμβου. Η εικόνα ήταν παρόμοια μεταξύ της προσαξονικής και αποαξονικής επιφάνειας αλλά η προσαξονική επιφάνεια εμφάνισε μικρότερη εναπόθεση κηρών (**ΕΙΚΟΝΑ III.8.α**). Η συγκέντρωση των επεφυμενιδικών κηρών ανά μονάδα επιφάνειας ακολούθησε πτωτική πορεία μεταξύ 2^{ου} και 4^{ου} κόμβου και σταθεροποιήθηκε με ελαφρά αυξητική τάση μεταξύ 4^{ου} και 8^{ου} κόμβου (**ΕΙΚΟΝΑ III.8.β**).

Η απορρόφηση στο υπεριώδες των χλωροφορμικών εκπλυμάτων εκφρασμένη ανά πλευρά φύλλου εμφάνισε μια ανοδική πορεία και σταθεροποιήθηκε στα φύλλα 8^{ου} κόμβου (**ΕΙΚΟΝΑ III.9.α**). Αντίστοιχα, η παράμετρος αυτή εκφρασμένη ανά ποσότητα κηρών των αντίστοιχων φύλλων

έδειξε να μειώνεται στα φύλλα 8^{ου} κόμβου σε σύγκριση με αυτά του 2^{ου} και 4^{ου} (ΕΙΚΟΝΑ III.9.β). Η απορρόφηση εκφρασμένη ανά μονάδα επιφάνειας

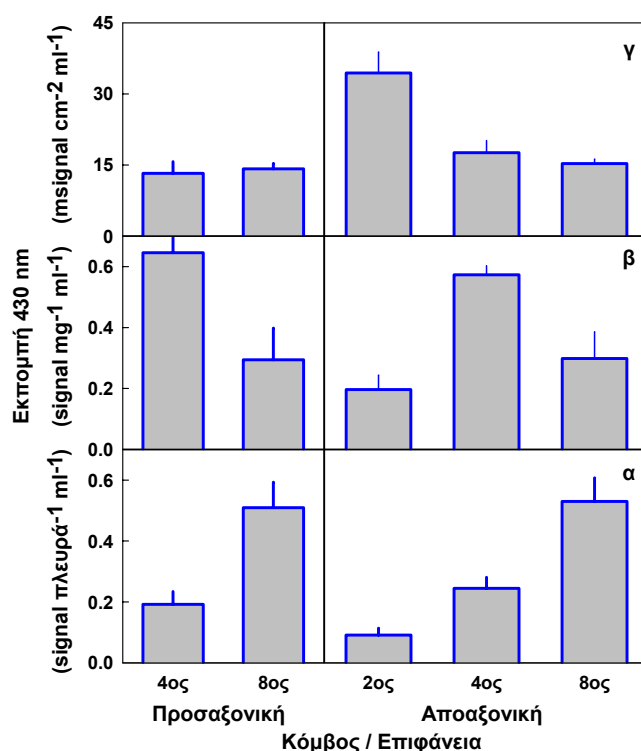


Εικόνα III.8.α. Η εναπόθεση ανά πλευρά φύλλου και **β.** η συγκέντρωση ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου των κηρών των χλωροφορμικών εκπλυμάτων των φύλλων του φυτού *P. persica* σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Οι τιμές είναι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (n 3-5).



Εικόνα III.9.α. Η συσσώρευση ανά πλευρά φύλλου, **β.** η συγκέντρωση ανά μονάδα βάρους κηρών και **γ.** η συγκέντρωση ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου των συστατικών που απορροφούν στα 280 nm στα χλωροφορμικά εκπλύματα των φύλλων του φυτού *P. persica* σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Οι τιμές είναι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (n 3-5).

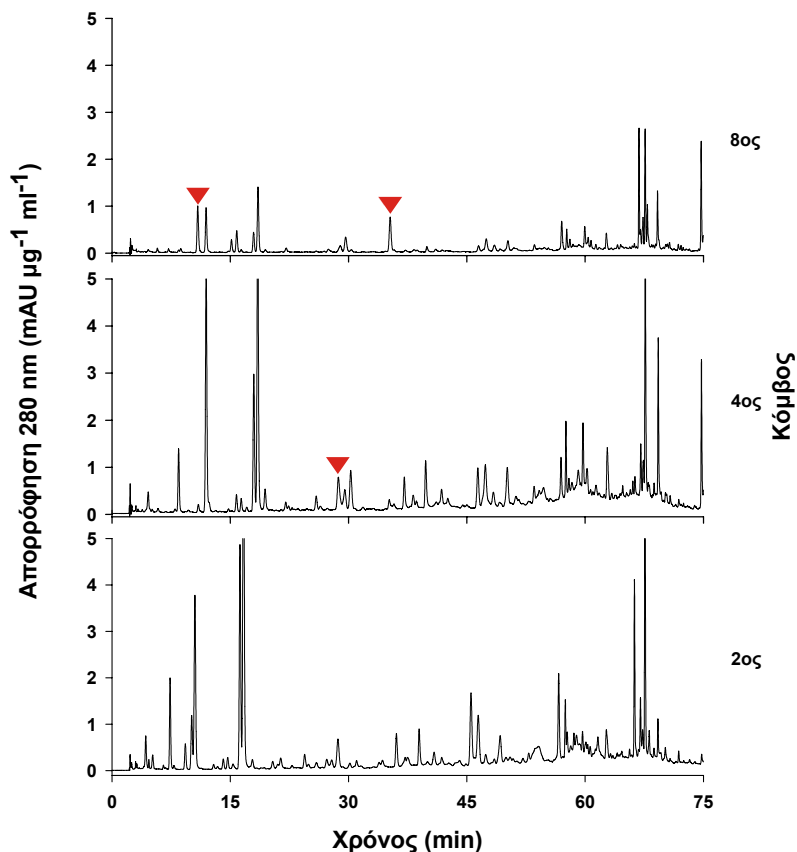
εμφανίστηκε να μειώνεται δραματικά από τον 2^ο προς τον 8^ο κόμβο (ΕΙΚΟΝΑ III.9.γ). Οι μεταβολές με το στάδιο ανάπτυξης των αντίστοιχων παραμέτρων της προσαξονικής επιφάνειας εμφανίστηκαν συγκρίσιμες με αυτές της αποαξονικής επιφάνειας αλλά οι απόλυτες τιμές απορρόφησης των εκπλυμάτων της προσαξονικής επιφάνειας ήταν μικρότερες τόσο ανά πλευρά οργάνου (ΕΙΚΟΝΑ III.9.α) όσο και ανά μονάδα επιφάνειας (ΕΙΚΟΝΑ III.9.γ) προφανώς λόγω μικρότερης ποσότητας κηρών της προσαξονικής επιφάνειας σε σχέση με την προσαξονική.



Εικόνα III.10.α. Η συσσώρευση ανά πλευρά φύλλου, **β.** η συγκέντρωση ανά μονάδα βάρους κηρών και **γ.** η συγκέντρωση ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου των συστατικών που εκπέμπουν φθορισμό στα 430 nm στα χλωροφορμικά εκπλύματα των φύλλων του φυτού *P. persica* σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Οι τιμές είναι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (n 3-5).

Σε αντίθεση με την απορρόφηση στο υπεριώδες, η εκπομπή φθορισμού από τα χλωροφορμικά εκπλύματα των φυλλικών επιφανειών εκφρασμένη ανά πλευρά φύλλου, εμφάνισε μεγάλη αύξηση μεταξύ 2^{ου}, 4^{ου} και 8^{ου} στην αποαξονική, καθώς και μεταξύ 4^{ου} και 8^{ου} στην προσαξονική επιφάνεια (ΕΙΚΟΝΑ III.10.α). Η εκπομπή φθορισμού εκφρασμένη ανά ποσότητα κηρών εμφάνισε αύξηση μεταξύ 2^{ου} και 4^{ου} κόμβου στην

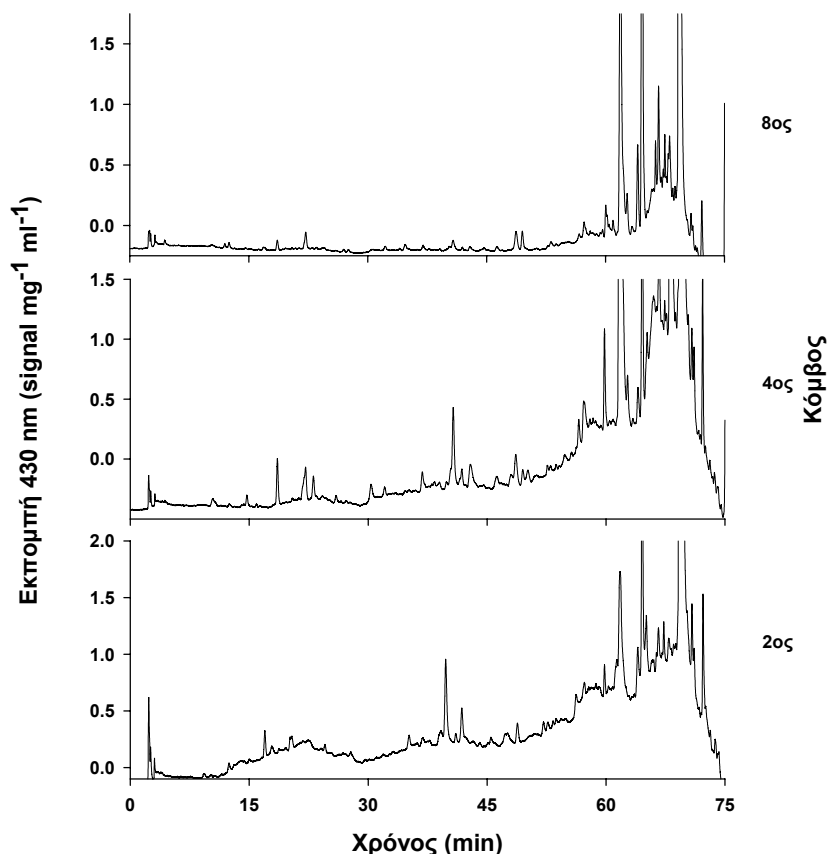
αποαξονική επιφάνεια και πτώση μεταξύ 4^{ου} και 8^{ου} κόμβου και στις δύο επιφάνειες (ΕΙΚΟΝΑ III.10.β). Δεν σημειώθηκε διαφορά μεταξύ προσαξονικής και αποαξονικής επιφάνειας των φύλλων. Η εκπομπή φθορισμού εκφρασμένη ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου εμφανίστηκε μειούμενη με την ανάπτυξη των φύλλων τόσο στην προσαξονική όσο και στην αποαξονική επιφάνεια (ΕΙΚΟΝΑ III.10.γ).



Εικόνα III.11. Χρωματογραφική ανάλυση των φαινολικών συστατικών των κηρών της αποαξονικής επιφάνειας των φύλλων του φυτού *P. persica* σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Η απόκριση του ανιχνευτή είναι εκφρασμένη ανά μονάδα βάρους κηρών. Τα βέλη υποδεικνύουν τις ποιοτικές αλλαγές κάθε δείγματος από τον 2^ο προς τον 8^ο κόμβο.

Η χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων μετά την υδρόλυση των εκπλυμάτων των επεφυμενιδικών κηρών της αποαξονικής επιφάνειας των φύλλων πιστοποίησε την παρουσία πολυάριθμων φαινολικών συστατικών (ΕΙΚΟΝΑ III.11). Επίσης η χρωματογραφική ανάλυση με τη χρήση ανιχνευτή φθορισμού απέκαλυψε την παρουσία και φθοριζόντων συστατικών. Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών ανά ποσότητα κηρών εμφανίστηκε σχετικά σταθερή μεταξύ των φύλλων των κόμβων 2^{ου}

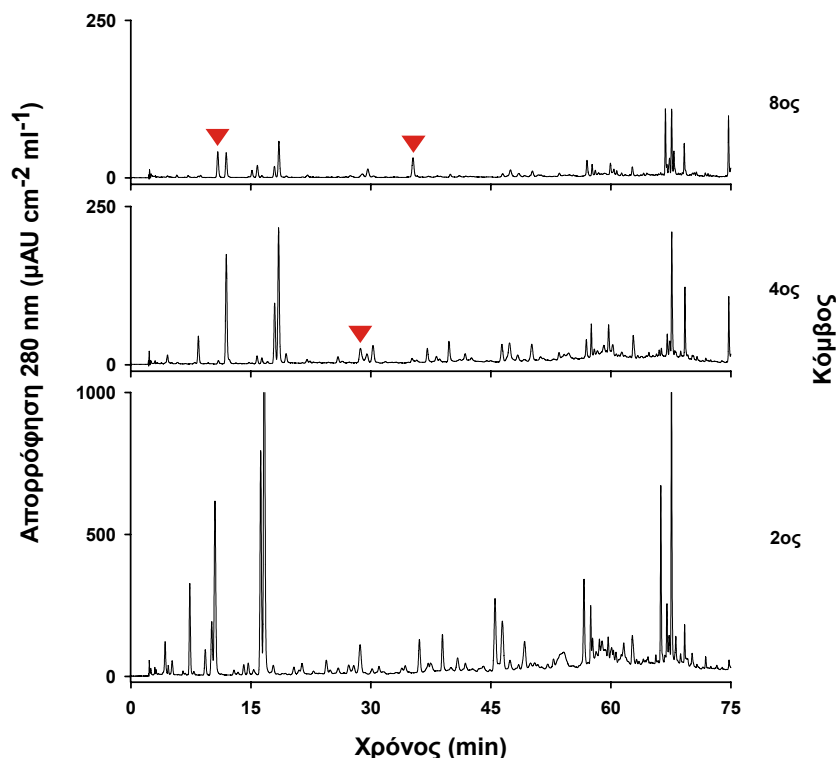
και 4^{ου} ενώ σημειώθηκε μείωση της συγκέντρωσης στο δείγμα του 8^{ου} κόμβου (ΕΙΚΟΝΑ III.11). Η παρατήρηση αυτή είναι σε συμφωνία με τις μετρήσεις της απορρόφησης στο υπεριώδες των αντίστοιχων δειγμάτων (ΕΙΚΟΝΑ III.9.β). Η ποσοτική αναλογία των φθοριζόντων ουσιών ανά βάρος κηρών εμφανίστηκε συγκρίσιμη μεταξύ 2^{ου} και 4^{ου} κόμβου και μεγαλύτερη σε σχέση με τον 8^ο κόμβο (ΕΙΚΟΝΑ III.12). Η σχέση μεταξύ 4^{ου} και 8^{ου}



Εικόνα III.12. Χρωματογραφική ανάλυση των φθοριζόντων συστατικών των κηρών της αποαξονικής επιφάνειας των φύλλων του φυτού *P. persica* σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Η απόκριση του ανιχνευτή είναι εκφρασμένη ανά μονάδα βάρους κηρών.

κόμβου όσον αφορά στην παρουσία των φθοριζόντων φαινολικών συστατικών συμπίπτει με τις μετρήσεις εκπομπής φθορισμού από τα απομονωμένα χλωροφορμικά εκπλύματα των κηρών των επιφανειών των φύλλων του *P. persica* (ΕΙΚΟΝΑ III.10.β). Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου (ΕΙΚΟΝΑ III.13), εμφανίστηκε μειούμενη από τον 2^ο προς τον 8^ο κόμβο. Η παρατήρηση αυτή έρχεται επίσης σε συμφωνία με τις μετρήσεις της απορρόφησης στο υπεριώδες των

αντίστοιχων χλωροφορμικών εκπλυμάτων (ΕΙΚΟΝΑ III.9.γ). Η ποιοτική σύσταση των δειγμάτων εμφάνισε αρκετές διαφορές μεταξύ του 2^{ου}, 4^{ου} και 8^{ου} κόμβου (ΕΙΚΟΝΕΣ III.11 και III.13).



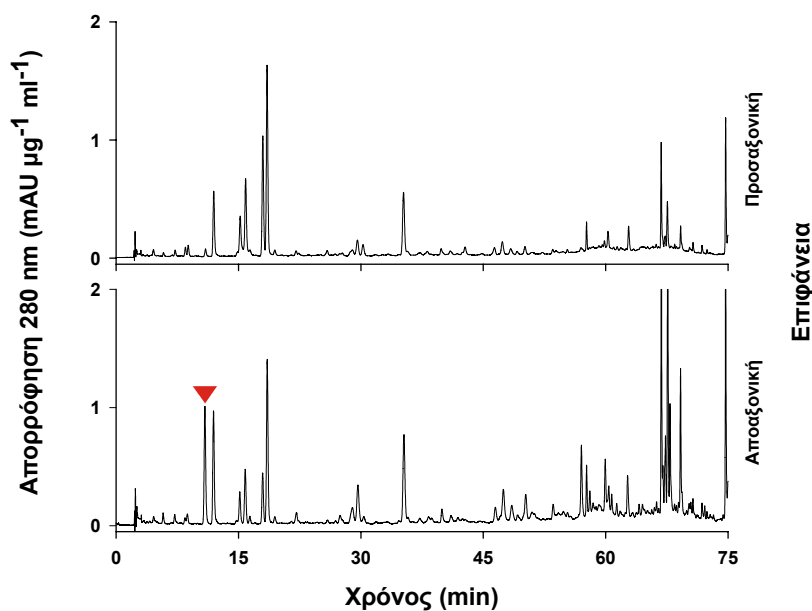
Εικόνα III.13. Χρωματογραφική ανάλυση των φαινολικών συστατικών των κηρών της αποαξονικής επιφάνειας των φύλλων του φυτού *P. persica* σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Η απόκριση του ανιχνευτή είναι εκφρασμένη ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου. Τα βέλη υποδεικνύουν τις ποιοτικές αλλαγές κάθε δείγματος από τον 2^ο προς τον 8^ο κόμβο.

Με σκοπό τη σύγκριση της σύστασης και της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών της προσαξονικής και αποαξονικής επιφάνειας, έγινε χρωματογραφική ανάλυση σε φύλλα 4^{ου} και 8^{ου} κόμβου (ΕΙΚΟΝΑ III.14). Τα αποτελέσματα των δειγμάτων του 8^{ου} κόμβου δείχνουν ότι δεν υπάρχουν αισθητές ποσοτικές διαφορές, κάτι που δικαιολογεί και την ομοιότητα μεταξύ των δύο επιφανειών στις φασματοσκοπικές μετρήσεις. Η ποιοτική σύσταση εμφάνισε μια αισθητή διαφορά που εντοπίζεται στην απουσία ενός συστατικού από το δείγμα της αποαξονικής επιφάνειας (ΕΙΚΟΝΑ III.14). Η σύσταση των δειγμάτων των δύο επιφανειών έδειξε ότι οι κηροί της αποαξονικής επιφάνειας περιέχουν περισσότερα φθορίζοντα συστατικά (δεν παρουσιάζεται). Ανάλογα αποτελέσματα βρέθηκαν και στις

συγκρίσεις μεταξύ των επιφανειών των φύλλων 4^{ου} κόμβου (δεν παρουσιάζονται).

III.3. Ανάλυση των επεφυμενιδικών κηρών του φυτού *Parthenocissus quinquefolia* σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια

Για τη μελέτη των επεφυμενιδικών κηρών των φύλλων του φυτού *Parthenocissus quinquefolia* και των φαινολικών συστατικών τα οποία



Εικόνα III.14. Χρωματογραφική ανάλυση των φαινολικών συστατικών των κηρών της αποαζονικής και προσαζονικής επιφάνειας των φύλλων του 8^{ου} κόμβου του φυτού *P. persica*. Η απόκριση του ανιχνευτή είναι εκφρασμένη ανά μονάδα βάρους κηρών. Το βέλος υποδεικνύει τις ποιοτικές αλλαγές μεταξύ των δύο δειγμάτων.

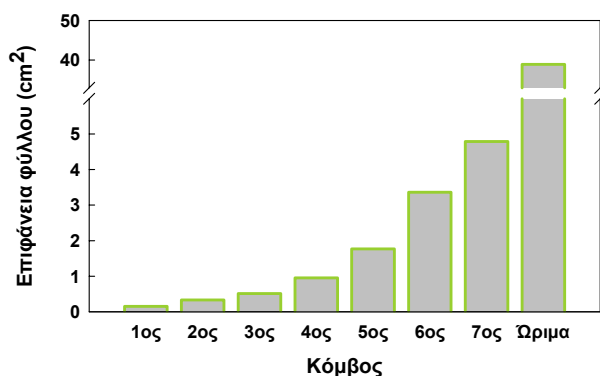
έχουν εναποτεθεί σε αυτούς, αναλύθηκαν χλωροφορμικά εκπλύματα που παρασκευάστηκαν με εμβάπτιση φύλλων 1^{ου}-7^{ου} κόμβου εκπυσομένης βλάστησης καθώς και ώριμων φύλλων. Μετρήθηκε η μέση επιφάνεια των φύλλων κάθε κόμβου και η ποσότητα των επεφυμενιδικών κηρών, ενώ για την εκτίμηση των εναποτιθέμενων φαινολικών συστατικών στους κηρούς, έγιναν φασματοσκοπικές μετρήσεις (απορρόφηση στο υπεριώδες και εκπομπή φθορισμού) των χλωροφορμικών εκπλυμάτων. Τέλος τα φαινολικά συστατικά των κηρών που παρελήφθησαν σε ελεύθερη μορφή με υδρόλυση, αναλύθηκαν με HPLC.

Η μέση επιφάνεια των φύλλων στα παραπάνω στάδια ανάπτυξης φαίνεται στην **ΕΙΚΟΝΑ III.15** όπου διακρίνεται η έντονη αύξηση της

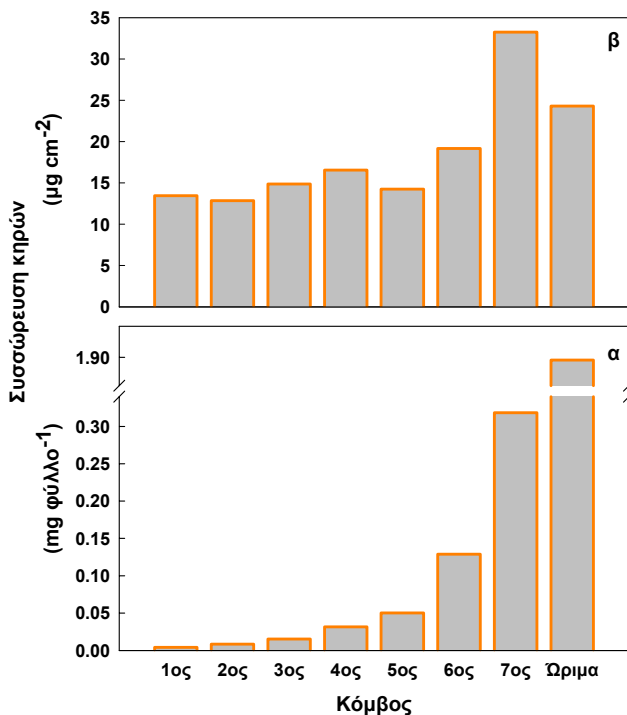
III. Αποτελέσματα

επιφάνειας του ελάσματος των φύλλων, ειδικά μετά το στάδιο του 4^{ου} κόμβου. Τα ώριμα φύλλα είχαν μια τελική μέση επιφάνεια της τάξης των 40 cm².

Σε αντίθεση με τα φύλλα του φυτού *P. persica*, η εναπόθεση κηρών στα φύλλα του φυτού *P. quinquefolia* ήταν συνεχής στα διαδοχικά αναπτυξιακά στάδια χωρίς να διακόπτεται (ΕΙΚΟΝΑ III.16.α) και ακολουθούσε το πρότυπο αύξησης της επιφάνειας του φύλλου (ΕΙΚΟΝΑ III.15). Η συγκέντρωση των κηρών ανά μονάδα επιφάνειας, σε αντίθεση με τα φύλλα του φυτού *P. persica*, εμφανίστηκε σταθερή σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια μέχρι και αυτό του 6^{ου} κόμβου και αυξήθηκε στα φύλλα

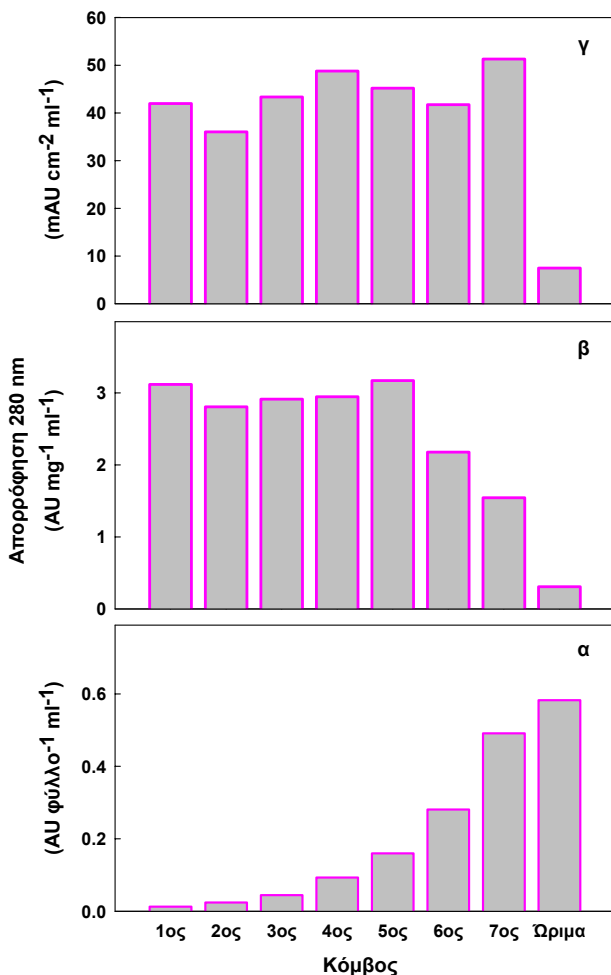


Εικόνα III.15. Η μέση επιφάνεια των φύλλων του φυτού *P. quinquefolia* στα διάφορα στάδια ανάπτυξης. Οι τιμές προέκυψαν από τον λόγο της συνολικής επιφάνειας προς τον αριθμό των φύλλων για κάθε δείγμα.



Εικόνα III.16.α. Η εναπόθεση ανά φύλλο και β. η συγκέντρωση ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου των κηρών των χλωροφορμικών εκπλυμάτων των φύλλων του φυτού *P. quinquefolia* σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια.

του 7^{ου} κόμβου, ενώ σταθεροποιήθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα στα ώριμα φύλλα (ΕΙΚΟΝΑ III.16.β). Στα φύλλα του 7^{ου} κόμβου η αύξηση της επιφάνειας του ελάσματος δεν ήταν τόσο έντονη ενώ παράλληλα η

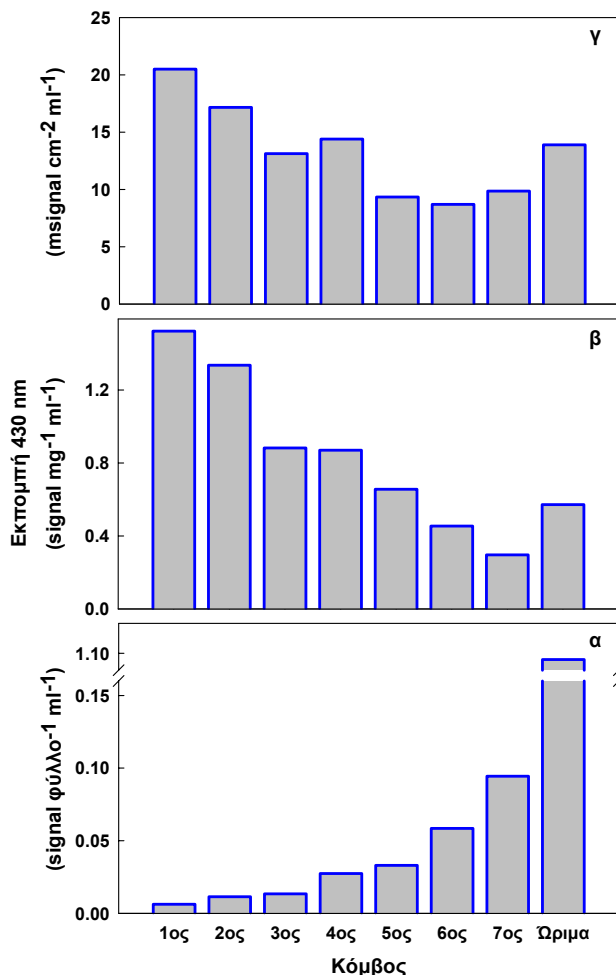


Εικόνα III.17.α. Η συσσώρευση ανά φύλλο, **β.** η συγκέντρωση ανά μονάδα βάρους κηρών και **γ.** η συγκέντρωση ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου των συστατικών που απορροφούν στα 280 nm στα χλωροφορμικά εκπλύματα των φύλλων του φυτού *P. quinquefolia* σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια.

εναπόθεση ανά όργανο ήταν υψηλή με τελικό αποτέλεσμα να εμφανίζεται αυξημένη συγκέντρωση κηρών ανά επιφάνεια.

Η απορρόφηση στο υπεριώδες των χλωροφορμικών εκπλυμάτων εκφρασμένη ανά όργανο εμφάνισε μια ανοδική πορεία ανάλογη με την ποσότητα των κηρών σε όλα τα στάδια ενώ στα ώριμα φύλλα ήταν μόνο ελαφρά αυξημένη (ΕΙΚΟΝΑ III.17.α). Αντίστοιχα, η παράμετρος αυτή, εκφρασμένη ανά ποσότητα κηρών των αντίστοιχων φύλλων, παρέμεινε σταθερή μέχρι και στα φύλλα 5^{ου} κόμβου και εμφανίστηκε μειωμένη στα φύλλα του 6^{ου} και 7^{ου} κόμβου καθώς και στα ώριμα φύλλα (ΕΙΚΟΝΑ III.17.β). Σε αντίθεση με τα φύλλα του φυτού *P. persica*, η απορρόφηση στα 280 nm

των χλωροφορμικών εκπλυμάτων των φύλλων του φυτού *P. quinquefolia* εκφρασμένη ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου, παρέμεινε σχετικά σταθερή σε όλα τα στάδια ανάπτυξης μέχρι και τα φύλλα του 7^{ου} κόμβου. Εμφανίστηκε

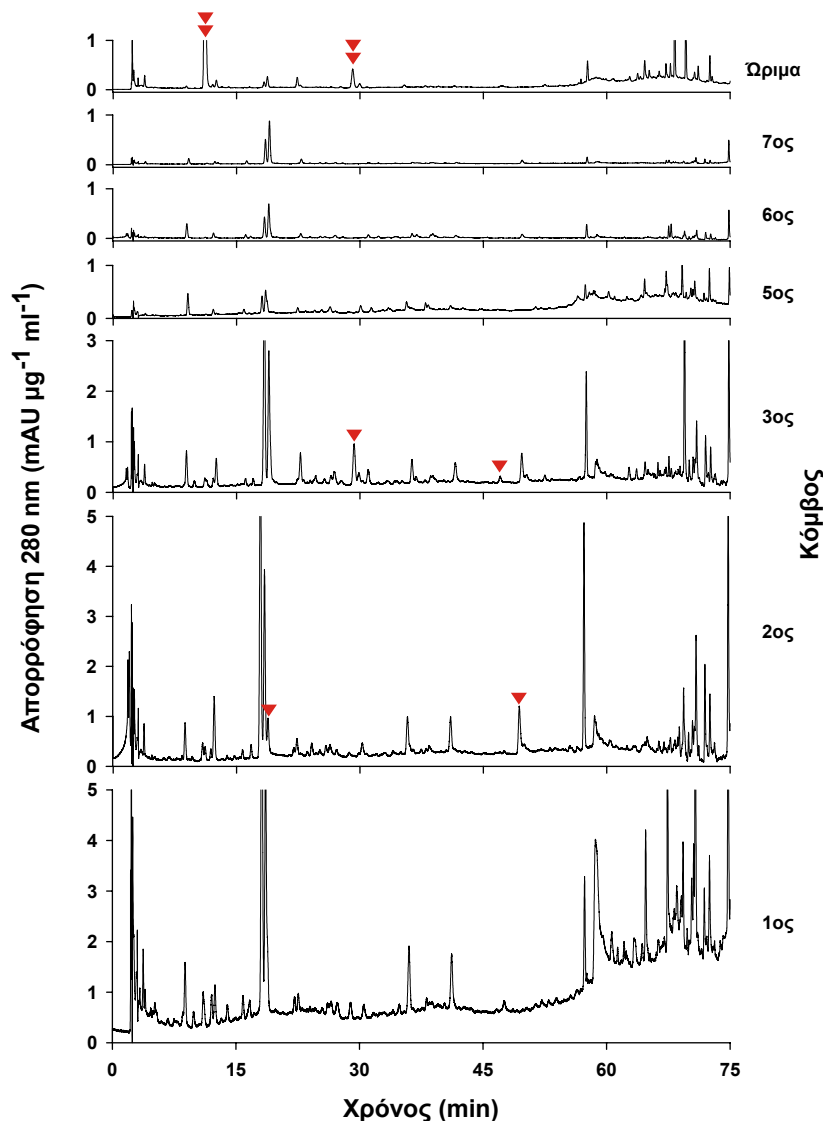


Εικόνα III.18.α. Η συσώρευση ανά φύλλο, **β.** η συγκέντρωση ανά μονάδα βάρους κηρών και **γ.** η συγκέντρωση ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου των συστατικών που εκπέμπουν φθορισμό στα 430 nm στα χλωροφορμικά εκπλύματα των φύλλων του φυτού *P. quinquefolia* σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια.

ωστόσο πολύ χαμηλή στα ώριμα φύλλα (**ΕΙΚΟΝΑ III.17.γ**).

Παράλληλα με την παράμετρο της απορρόφησης των εκπλυμάτων στα 280 nm, η παράμετρος της εκπομπής φθορισμού στα 430 nm εμφάνισε αυξητική τάση με το στάδιο ανάπτυξης των φύλλων (**ΕΙΚΟΝΑ III.18**). Αντίθετα όμως με την απορρόφηση στα 280 nm, η εκπομπή στα 430 nm εκφρασμένη ανά όργανο, εμφάνισε πολύ υψηλή τιμή στα εκπλύματα των ώριμων φύλλων (**ΕΙΚΟΝΑ III.18.α**) ως συνέπεια του γεγονότος ότι οι κηροί που εναποτέθηκαν στα ώριμα φύλλα ήταν αρκετά πλούσιοι σε φθορίζοντα συστατικά (**ΕΙΚΟΝΑ III.18.β**). Η τάση αυτή εμφανίστηκε και στη συγκέντρωση των φθορίζοντων συστατικών εκφρασμένων ανά μονάδα

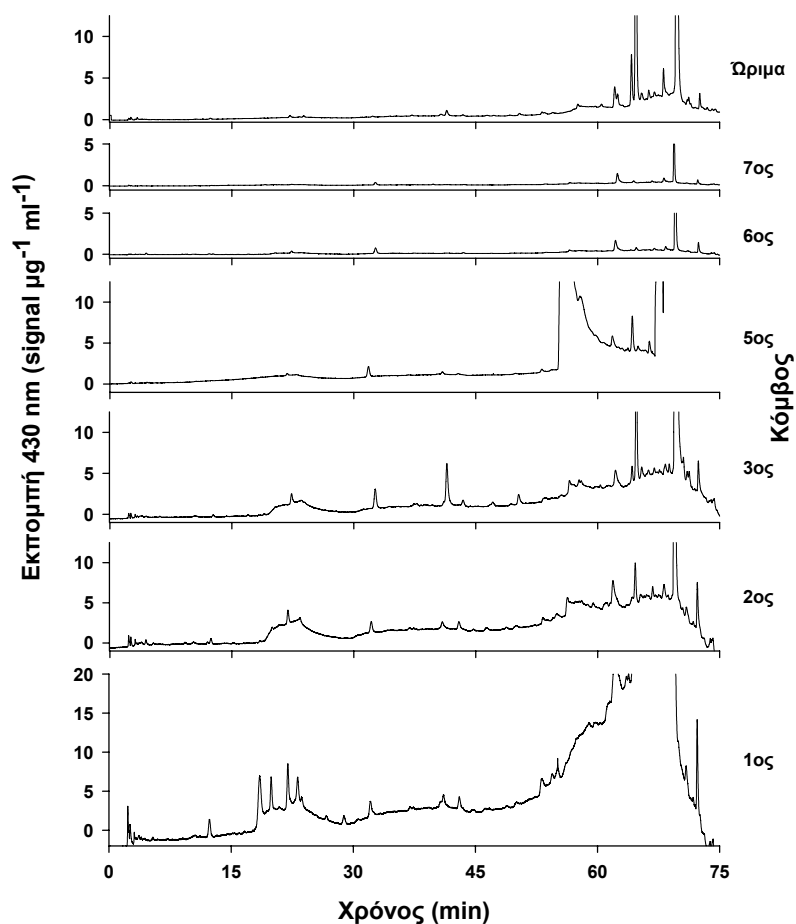
επιφάνειας φύλλου (ΕΙΚΟΝΑ III.18.γ). Η χρωματογραφική ανάλυση των εκπλυμάτων των φύλλων του φυτού *P. quinquefolia* έδειξε την παρουσία ενός αριθμού φαινολικών συστατικών (ΕΙΚΟΝΑ III.19). Η σύσταση του



Εικόνα III.19. Χρωματογραφική ανάλυση των φαινολικών συστατικών των κηρών των φύλλων του φυτού *P. quinquefolia* σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Η απόκριση του ανιχνευτή είναι εκφρασμένη ανά μονάδα βάρους κηρών. Τα βέλη υποδεικνύουν τις ποιοτικές αλλαγές κάθε δείγματος από τον 1^ο κόμβο έως τα ώριμα φύλλα. Τα διπλά βέλη υποδεικνύουν ποιοτικές αλλαγές που αφορούν στον κύριο όγκο των συστατικών του μίγματος.

κλάσματος εμφάνισε μεγάλες ομοιότητες με τα ανάλογα δείγματα του φυτού *P. persica* ωστόσο τα αναλυθέντα συστατικά ήταν πιο ολιγάριθμα. Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών ανά μονάδα βάρους κηρών εμφανίστηκε σταθερή στα δείγματα των φύλλων του 1^{ου}-3^{ου} κόμβου και

αρκετά μειωμένη στα υπόλοιπα δείγματα (**ΕΙΚΟΝΑ III.19**). Η εικόνα αυτή εμφανίζεται σε συμφωνία με τις μετρήσεις της απορρόφησης στα 280 nm των χλωροφορμικών εκπλυμάτων (**ΕΙΚΟΝΑ III.17.β**). Η ποιοτική σύσταση των δειγμάτων παρέμεινε σταθερή σε όλα τα δείγματα με εξαίρεση το δείγμα των ώριμων φύλλων όπου σημειώθηκαν αρκετές ποιοτικές αλλαγές (**ΕΙΚΟΝΑ III.19**). Η χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων με τη χρήση ανιχνευτή



Εικόνα III.20. Χρωματογραφική ανάλυση των φθορίζοντων συστατικών των κηρών των φύλλων του φυτού *P. quinquefolia* σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Η απόκριση του ανιχνευτή είναι εκφρασμένη ανά μονάδα βάρους κηρών.

φθορισμού έδειξε την παρουσία φθορίζοντων συστατικών των οποίων η συγκέντρωση ανά βάρος κηρών ήταν μέγιστη στα δείγματα που προέρχονταν από τον 1^ο-5^ο κόμβο, μειωμένη στα δείγματα που προέρχονταν από τον 6^ο και 7^ο κόμβο και σχετικά αυξημένη στο δείγμα των ώριμων φύλλων (**ΕΙΚΟΝΑ III.20**). Τα αποτελέσματα αυτά εναρμονίζονται με τις μετρήσεις εκπομπής φθορισμού των χλωροφορμικών εκπλυμάτων (**ΕΙΚΟΝΑ III.18**).



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

IV.1. Η διαμόρφωση του εκπεμπόμενου φθορισμού των στοματικών συμπλόκων των φύλλων σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια

Οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις των φύλλων των τριών ειδών που εξετάστηκαν έδειξαν ότι το πρότυπο φθορισμού των επιδερμικών κυττάρων και των στοματικών συμπλόκων διαμορφώνεται ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του φύλλου. Η παρουσία των στοματιών είναι φανερή μέσω του εκπεμπόμενου φθορισμού σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια συμπεριλαμβανομένων και των πολύ νεαρών φύλλων. Ο φθορισμός προέρχεται από τα φθορίζοντα συστατικά που υπάρχουν στην εφυμενίδα και τους επεφυμενιδικούς κηρούς (Karabourniotis et al., 2001; Liakopoulos et al., 2001). Η παρούσα εργασία έδειξε ότι στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης, η εκπομπή φθορισμού προέρχεται αρχικά από τα επάρματα της εφυμενίδας των καταφρακτικών κυττάρων και εξαπλώνεται στα γειτονικά επιδερμικά κύτταρα σε επόμενο χρονικό στάδιο. Η εμφάνιση του φθορισμού στα καταφρακτικά πριν από τα λοιπά επιδερμικά κύτταρα, ενδεχομένως να σχετίζεται με το γεγονός ότι τα καταφρακτικά είναι η πρώτη κατηγορία κυττάρων που διαφοροποιείται στην επιδερμίδα των αναπτυσσόμενων φύλλων (Wilmer, 1983). Η εναπόθεση φαινολικών συστατικών όπως υποδηλώνει ο χαρακτηριστικός μπλε φθορισμός των καταφρακτικών κυττάρων, ενδεχομένως να σχετίζεται τόσο με την προστασία των στοματικών συμπλόκων από την υπεριώδη ακτινοβολία, όσο και με την άμυνα έναντι παθογόνων.

Η μελέτη του εκπεμπόμενου φθορισμού από την επιφάνεια των επιδερμικών κυττάρων και των στοματιών των αναπτυσσόμενων φύλλων έδωσε ενδιαφέρουσες πληροφορίες για τον τρόπο με τον οποίο πραγματοποιείται η οντογένεση των στοματιών και των τριών φυτικών ειδών. Η οντογένεση των στοματιών φαίνεται να ακολουθεί το βασιπέταλο πρότυπο ανάπτυξης όπως αυτό έχει αναφερθεί για το φυτό *Arabidopsis* και άλλα δικότυλα φυτά (Pyke et al., 1991; Larkin et al., 1997; Croxdale, 2000). Η μικρή πυκνότητα φθορίζοντων στοματιών στη βάση των φύλλων και αντίστοιχα η μεγάλη πυκνότητα τους στην κορυφή των αναπτυσσόμενων φύλλων δείχνει ότι τα νέα μεριστωμοειδή σχηματίζονται από τη βάση του

φύλλου και καθώς το φύλλο εκτείνεται τα ώριμα στομάτια απαντώνται στην κορυφή.

IV.2. Ανάλυση των επεφυμενιδικών κηρών των φυτών *Prunus persica* και *Parthenocissus quinquefolia* σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια των φύλλων

Από τις μετρήσεις της ποσότητας των παραληφθέντων κηρών μέσω χλωροφορμικών εκπλύσεων των φύλλων, βρέθηκε ότι η εναπόθεση των κηρών στην εφυμενίδα των φύλλων είναι σε γενικές γραμμές συνεχής κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τους. Η συγκέντρωση ανά μονάδα επιφάνειας φαίνεται να διαμορφώνεται από τον ρυθμό εναπόθεσης ανά πλευρά σε συνδυασμό με τον ρυθμό έκτασης του ελάσματος. Ως γενική παρατήρηση, η συγκέντρωση κηρών ανά μονάδα επιφάνειας των φύλλων ήταν μέγιστη στο στάδιο του 2^{ου} κόμβου. Η ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων κηρών ανά μονάδα επιφάνειας στα πολύ πρώιμα στάδια ανάπτυξης των φύλλων και των δύο φυτών συνδέεται πιθανότατα με τη στρατηγική της βέλτιστης αμυντικής θωράκισης των νεαρών αναπτυσσόμενων οργάνων, ώστε να προστατεύονται από ανεξέλεγκτες απώλειες νερού αλλά και από τα παθογόνα και τους εχθρούς (Kerstiens, 1996b).

Στα φύλλα του φυτού *P. persica*, η μηδενική εναπόθεση κηρών μεταξύ 2^{ου} και 4^{ου} κόμβου, όπου παρατηρείται ο υψηλότερος ρυθμός έκτασης του ελάσματος, μπορεί να εξυπηρετεί την ανάγκη του οργάνου να διατηρήσει έναν βαθμό ελαστικότητας που θα επιτρέψει την απρόσκοπτη έκταση του ελάσματος. Σε ορισμένα φυτά κατά τη διάρκεια της φάσης ταχείας έκτασης του ελάσματος δεν εναποτίθενται νέα εφυμενιδικά υλικά ενώ η πλήρης διαμόρφωση του εφυμενιδικού κλάσματος (CP) σημειώνεται αφού το έλασμα έχει πάρει το τελικό του μέγεθος (Jeffree, 1996). Στα φύλλα του φυτού *P. quinquefolia* δεν παρατηρήθηκε ανάλογη διακοπή της διαδικασίας εναπόθεσης κηρών, ωστόσο η συγκέντρωσή τους ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου ήταν σε κάθε περίπτωση πολύ χαμηλότερη από αυτή των φύλλων του φυτού *P. persica*.

Η συγκέντρωση των κηρών στην προσαξονική επιφάνεια των φύλλων του φυτού *P. persica* ήταν μικρότερη σε σχέση με την αποαξονική, όπως

έχει παρατηρηθεί και σε ώριμα φύλλα του φυτού *P. persica* (Liakopoulos *et al.*, 2001). Οι μεγαλύτερες διαφορές στη συγκέντρωση των κηρών μεταξύ προσαξονικής και αποαξονικής επιφάνειας των φύλλων που αναφέρονται από τους Liakopoulos *et al.* (2001) μπορεί να οφείλονται στη διαφορετική ηλικία των φύλλων ή στην ύπαρξη διαφορών μεταξύ διαφορετικών πειραματόφυτων. Επίσης στα ώριμα φύλλα, η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως οι μηχανικές καταπονήσεις, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του στρώματος των κηρών στην προσαξονική επιφάνεια σε σχέση με την αποαξονική η οποία προφυλάσσεται καλύτερα (Nienhuis and Barthlott, 1997).

Στην περιοχή των 280 nm απορροφούν κατά κύριο λόγο φαινολικά συστατικά και συνεπώς η απορρόφηση στην περιοχή αυτή θεωρείται ότι οφείλεται στην παρουσία τέτοιου είδους συστατικών. Η παρουσία ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου των συστατικών που απορροφούν στα 280 nm βρέθηκε να μειώνεται με την ηλικία στα εκπλύματα των φύλλων του φυτού *P. persica* ενώ αντίθετα ήταν σταθερή στα εκπλύματα των φύλλων του φυτού *P. quinquefolia*. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των χλωροφορμικών εκπλυμάτων των φύλλων των δύο φυτών υποδεικνύουν ότι η σύσταση των εναποτιθέμενων κηρών σε συστατικά που απορροφούν στα 280 nm μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της έκπτυξης του ελάσματος και εμφανίζει δύο διακριτές περιόδους: η πρώτη περιλαμβάνει την εναπόθεση των κηρών στα νεαρά στάδια του 2^{ου}-4^{ου} ή 5^{ου} κόμβου που είναι σχετικά πλούσιοι σε συστατικά που απορροφούν στα 280 nm, ενώ η δεύτερη την εναπόθεση λιγότερο πλούσιων σε φαινολικά συστατικά κηρών στα στάδια του 7^{ου}-8^{ου} κόμβου. Η μεταβολή αυτή μπορεί να σχετίζεται είτε με ένα συγκεκριμένο αναπτυξιακό πρότυπο βιοσύνθεσης των ουσιών αυτών είτε με μεταβολές παραγόντων του περιβάλλοντος κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των φύλλων. Σύμφωνα με τους Hunt and Baker (1980) η ποιοτική σύσταση των εφυμενιδικών κηρών σε φαινολικά συστατικά μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρπού της τομάτας ενώ οι Wollenweber *et al.* (2000b) αναφέρουν ότι η συγκέντρωση των φλαβονοειδών στους

εφυμενιδικούς κηρούς των φύλλων του φυτού *Viscum album* παρουσιάζει εποχιακές διακυμάνσεις.

Το γεγονός ότι η μέγιστη συγκέντρωση των συστατικών που απορροφούν στα 280 nm παρατηρείται στα φύλλα του 2^{ου} κόμβου, πιθανόν να σχετίζεται με τον προστατευτικό ρόλο των ουσιών αυτών έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων (Bennett and Wallsgrove, 1994; Günthardt-Goerg, 1996). Πράγματι, οι χρωματογραφικές αναλύσεις των αντίστοιχων δειγμάτων απεκάλυψαν ότι η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών ανά μονάδα βάρους κηρών καθώς και ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου ήταν υψηλές στα νεαρά στάδια του 2^{ου} και 4^{ου} κόμβου για το φυτό *P. persica* και 1^{ου}-3^{ου} κόμβου για τον φυτό *P. quinquefolia*.

Επειδή τα φαινολικά συστατικά είναι εστεροποιημένα στο πλέγμα των υδρόφοβων πολυμερών, εκτός από τον αμυντικό τους προσανατολισμό, θα μπορούσαν να παίζουν ρόλο και στη διαμόρφωση των ιδιοτήτων της εφυμενίδας. Η ύπαρξη πλάγιων διακλαδώσεων μεταξύ των αλυσίδων των εφυμενιδικών μακρομορίων θα μπορούσε να διαμορφώνει φυσικοχημικές ιδιότητες ανάλογες με αυτές των πλάγιων διακλαδώσεων στα πολυμερή των κυτταρικών τοιχωμάτων στις οποίες συμμετέχουν ανόργανα ιόντα και φαινολικά οξέα όπως το φερουλικό οξύ. Έτσι, οι αλλαγές που παρατηρούνται με το χρόνο στην περατότητα του νερού διαμέσου της εφυμενίδας, θα μπορούσαν να αποδοθούν εν μέρει σε δημιουργία εστερικών δεσμών των πολυμερών με τα φαινολικά συστατικά που είναι εντοπισμένα στη μάζα των εφυμενιδικών υλικών.

IV.3. Σχέση μεταξύ της εκπομπής φθορισμού της εφυμενίδας και των χαρακτηριστικών φθορισμού των εκπλυμάτων των φύλλων

Από τις αναλύσεις των χλωροφορμικών εκπλυμάτων προκύπτει ότι συγκέντρωση των φθοριζόντων συστατικών ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου εμφανίστηκε μειούμενη με το στάδιο ανάπτυξης και στα δύο φυτά. Ωστόσο, η εναπόθεση ανά πλευρά οργάνου (*P. persica*) ή ανά όργανο (*P. quinquefolia*) βρέθηκε να αυξάνει σημαντικά από τα φύλλα του 2^{ου} προς αυτά του 8^{ου} κόμβου. Οι χρωματογραφικές αναλύσεις στο φυτό *P. persica* έδειξαν ότι η

παρουσία των φθοριζόντων συστατικών είναι μέγιστη κατά τα στάδια όπου κυρίως διαμορφώνονται τα χαρακτηριστικά φθορισμού των στοματίων και μειώνεται κατά την ωρίμανση πιθανόν λόγω μεταβολών της σύστασης των κηρών που εναποτίθενται. Πιθανόν, στο στάδιο του 8^{ου} κόμβου όπου τα φύλλα έχουν διαμορφώσει το τελικό τους μέγεθος εναποτίθενται νέα υδρόφοβα υλικά τα οποία ωστόσο δεν περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις φθοριζόντων συστατικών και ως εκ' τούτου δεν τροποποιούν τα χαρακτηριστικά φθορισμού των επιδερμικών και καταφρακτικών κυττάρων.

Από την άλλη πλευρά, στο φυτό *P. quinquefolia* παρατηρήθηκε συνεχής μείωση της εκπομπής φθορισμού ανά βάρος κηρών αυξανόμενου του σταδίου ανάπτυξης χωρίς αιχμή στην ένταση φθορισμού των κηρών ανάλογη με αυτής του φυτού *P. persica*. Σύμφωνα με τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις, τα στοματικά σύμπλοκα των φύλλων του φυτού *P. quinquefolia* καθυστερούν να εμφανίσουν τη μέγιστη ένταση φθορισμού. Έχοντας συνεπώς μια πιο αργή διαδικασία ωρίμανσης, οι επιφάνειες των φύλλων του φυτού αυτού είναι πιθανόν να μην εμφανίζουν εναποθέσεις κηρών με υψηλές συγκεντρώσεις φθοριζόντων συστατικών σε κάποιο συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο. Ωστόσο, η συγκέντρωση των φθοριζόντων υλικών ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου εμφανίζεται συγκρίσιμη με αυτή των φύλλων του φυτού *P. persica* γεγονός που υποδηλώνει ότι το φαινόμενο της εναπόθεσης των κηρών στις επιφάνειες των φύλλων των δύο φυτικών ειδών έχει το ίδιο τελικό αποτέλεσμα όσον αφορά στον εκπεμπόμενο φθορισμό.

Φαινολικά συστατικά με φθορίζουσες ιδιότητες βρέθηκαν στα δείγματα των επεφυμενιδικών κηρών και των δύο φυτικών ειδών μετά από αλκαλική υδρόλυση ενώ η συγκέντρωση των φθοριζόντων φαινολικών συστατικών ανά βάρος κηρών εμφανίστηκε σε μεγάλο βαθμό ανάλογη με την ένταση φθορισμού των χλωροφορμικών εκπλυμάτων των φύλλων καθώς και με τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τον ρόλο των φαινολικών συστατικών ως φθοριζόντων συστατικών των επιφανειών των φύλλων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alenius, C.M., Vogelmann, T.C., Bornman, J.F.** (1995) A three-dimensional representation of the relationship between penetration of UV-B radiation and UV-screening pigments in leaves of *Brassica napus*. *New Phytologist* 131: 297-302
- Appel, H.M.** (1993) Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. *Journal of Chemical Ecology* 19: 1521-1551
- Barnes, J., Nigel, P., Percy, K., Broadbent, P., McLaughlin, C., Mullineux, P., Creissen, G. and Wellburn, A.** (1994) Effects of UV-radiation on wax biosynthesis. In: Air pollutant and the leaf cuticle (eds. Percy, K., Cape, J.N., Jagels, R., Simpson, C.J.) NATO ASI Series Vol. G
- Barnes, J.D. and Cardoso-Vilhena, J.** (1996) Interactions between electromagnetic radiation and the plant cuticle In: Plant Cuticles an integrated functional approach (ed. Kerstiens, G.). Bios Scientific Publications, Oxford.
- Barnes, J.D., Percy, K.E., Paul, N.D., Jones, P., McLaughlin, C.K., Mullineux, P.M., Creissen, G. and Wellburn, A.R.** (1996) The influence of UV radiation on the physicochemical nature of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaf surfaces. *Journal of Experimental Botany* 47: 99-109
- Barthlott, W. and Neinhuis, C.** (1997) Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta*: 202: 1-8
- Barthlott, W., Neinhuis, C., Cutler, D., Ditsch, F., Meusel, I., Theisen, I., Wilhelmi, H.** (1998) Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 126: 237-260
- Baur, P., Buchholz, A., Schönherr, J.** (1997) Diffusion in plant cuticles as affected by temperature and size of organic solutes: similarity and diversity among species. *Plant, Cell and Environment* 20: 982-994
- Becker, M., Kerstiens, M., Schönherr, J.** (1986) Water permeability of plant cuticles: permeance, diffusion, and partition coefficients. *Trees* 1: 54-60
- Berling, D.J., McElwain, J.C., Osborne, C.P.** (1998) Stomatal responses of the 'living fossil' *Ginkgo biloba* L. to changes in atmospheric CO₂ concentrations. *Journal of Experimental Botany* 49: 1603-1607
- Belding, R.D., Sutton, T.B., Blankenship, S.M., Young, E.** (2000) Relationship between apple fruit epicuticular wax and growth of *Peltaster fruticola* and *Leptontidium elatius*, two fungi that cause sooty blotch disease. *Plant Disease* 84: 767-772
- Bennett, R.N. and Wallsgrove, R.M.** (1994) Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* 127: 617-633

- Berger, D. and Altmann, T.** (2000) A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development* 14: 1119-1131
- Bergman, D.K., Dillwith, J.W., Zarrabi, A.A., Caddel, J.L., Berberet, R.C.** (1991) Epicuticular lipids of alfalfa relative to its susceptibility to spotted alfalfa aphids (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology* 20: 781-785
- Blum, U., Shafer, S.R., Lehman, M.E.** (1999) Evidence for inhibitory allelopathic interactions involving phenolic acids in field soils: concepts vs. an experimental model. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18: 673-693
- Bornman, J.F.** (1999) Localisation and functional significance of flavonoids and related compounds. In: *Stratospheric Ozon Depletion: The Effects of Enhanced UV-B Radiation on Terrestrial Ecosystems* (Rozema, J. ed.) Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Buchholz, A., Baur, P., Schönherr, J.** (1998) Differences among plant species in cuticular permeabilities and solute mobilities are not caused by differential size selectivities. *Planta* 208: 322-328
- Butler, D.R.** (1996) The presence of water on leaf surface and its importance for microbes and insects. In: *Plant Cuticles an integrated functional approach* (ed. Kerstiens, G.). Bios Scientific Publications, Oxford.
- Bodnaryk, R.P.** (1992) Distinctive leaf feeding patterns on oilseed rapes and related Brassicaceae by flea beetles, *Phyllotreta cruciferae* (Goeze) (Coleoptera, Chrysomelidae). *Canadian Journal of Plant Science* 72: 575-581
- Casado, C.G. and Heredia, A.** (2001) Ultrastructure of the cuticle during growth of the grape berry (*Vitis vinifera*). *Physiologia Plantarum* 111:220-224
- Chin, J.C., Wan, Y., Smith, J., Croxdale, J.** (1995) Linear aggregations of stomata and epidermal cells in *Tradescantia* leaves: evidence for their group patterning as a function of the cell cycle. *Developmental Biology* 168: 39-46
- Comménil, P., Brunet, L., Audran, J-C.** (1997) The development of the grape berry cuticle in relation to susceptibility to bunch rot disease. *Journal of Experimental Botany* 48(313): 1599-1607
- Croxdale, J.L.** (2000) Stomatal patterning in angiosperms. *American Journal of Botany* 87: 1069-1080
- Deising, H., Nicholson, R.L., Haug, M., Howard, R.J., Mendgen, K.** (1992) Adhesion pad formation and the involvement of cutinase and esterases in the attachment of uredospores to the host cuticle. *Plant Cell* 4: 1101-1111
- Drilias, P., Karabourniotis, G., Levizou, E., Nikolopoulos, D., Petropoulou, Y., Manetas, Y.** (1997) The effects of enhanced UV-B radiation on the Mediterranean evergreen sclerophyll *Nerium oleander* depend on the extent of summer precipitation. *Australian Journal of Plant Physiology* 24: 301-306

- Δροσόπουλος, I.B.** (1992) Η Μορφολογία και Ανατομία των Φυτών, Εκδόσεις Γεωπονικού Παν/μίου Αθηνών
- Ebel, J. and Hahlbroch, K.** (1982) Biosynthesis In: The flavonoids: Advances in research (eds Harborne, J.B., Marby, T.J.), Chapman and Hall, London.
- Eigenbrode, S.D. and Espelie, K.E.** (1995) Effects of plant epicuticular lipids on insect herbivores. *Annual Review of Entomology* 40: 171-194
- El-Otmani, M. and Coggins, J.C.W.** (1985) Fruit development and growth regulator effects on normal alkanes of Washington navel orange fruit epicuticular wax. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry* 33: 656-663
- Fahn, A.** (1990) *Plant Anatomy* (4th ed.). Pergamon Press, Oxford.
- Ferrer, M.A., Muñoz, R., Ros Barceló, A.** (1991) A biochemical and cytochemical study of the cuticle-associated peroxidases in *Lupinus*. *Annals of Botany* 67: 561-568
- Fisher, R.F., Long, S.R.** (1992) *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature* 357: 655-660
- Gausman, H.W., Rodrigues, R.R., Escobar, D.E.** (1975) Ultraviolet radiation reflectance, transmittance and absorbance by plant leaf epidermises. *Agronomy Journal* 67: 720-724
- Geisler, M., Yang, M., Sack, F.D.** (1998) Divergent regulation of stomatal initiation and patterning in organ and suborgan regions of the *Arabidopsis* mutants *too many mouths* and *four lips*. *Planta* 205: 522-530
- Gevens, A. and Nicholson, R.L.** (2000) Cutin composition: a subtle role for fungal cutinase? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 43-45
- Gonzalez, L., Souto, X.C., Reigosa, M.J.** (1997) Weed control by *Capsicum annuum*. *Allelopathy Journal* 4: 101-107
- Gonzalez, R., Paul, N.D., Percy, K., Ambrose, M., McLaughlin, C.K., Barnes, J.D., Areses, M. and Wellburn, A.R.** (1996) Responses to ultraviolet-B radiation (280-315nm) of pea (*Pisum sativum*) lines differing in leaf surface wax. *Physiologia Plantarum* 98: 852-860
- Gordon, D.C., Percy, K.E., Riding, R.T.** (1998) Effects of uv-B radiation on epicuticular wax production and chemical composition of four *Picea* species. *New Phytologist* 138: 441-449
- Grant, R.H., Jenks, M.A., Rich, P.J., Peters, P.J., Aswforth, E.N.** (1995) Scattering of ultraviolet and photosynthetically active radiation by *Sorghum bicolor*: influence of epicuticular wax. *Agricultural and Forest Meteorology* 75: 263-281
- Gültz, P-G.** (1994) Epicuticular leaf waxes in the evolution of the plant kingdom. *Journal of Plant Physiology* 143: 453-464

- Günthardt-Goerg, M.S.** (1996) Leaf surface features (*Populus xeuroamericana* and *Populus tremula*) developed under lowered or ambient UV-B radiation. *Journal of Experimental Botany* 47(sup): 58
- Hammer, P.E. and Evensen, K.B.** (1994) Differences between rose cultivars in susceptibility to infection by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 84: 1305-1312
- Harborne, J.B. and Williams, C.A.** (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504
- Helbsing, S., Riederer, M., Zotz, G.** (2000) Cuticles of vascular epiphytes: efficient barriers for water loss after stomatal closure? *Annals of Botany* 86: 765-769
- Heldt, H-W.** (1997) Phenylpropanoids. In: *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press, Oxford.
- Hopkins, R.J., Birch, A.N.E., Griffiths, D.W., Baur, R., Städler, E., McKinlay, R.G.** (1997) Leaf surface compounds and oviposition preference of turnip root fly *Delia floralis*: The role of glucosinolate and nonglucosinolate compounds. *Journal of Chemical Ecology* 23(3): 629-643
- Hoque, E. and Renus, G.** (1996) Reflective light properties of tissue layers in beech (*Fagus sylvatica* L.) leaves. *Phytochemistry and Photobiology* 63: 498-506
- Hung, C-Y., Lin Y., Zhang, M., Pollock, S., Marks, M.D., Schiefelbein, J.** (1998) A common position-dependent mechanism controls cell-type patterning and GLABRA2 regulation in the root and hypocotyls epidermis of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 117:73-84
- Hunt, G.M. and Baker, E.A.** (1980) Phenolic constituents of tomato fruit cuticles. *Phytochemistry* 19: 1415-1419
- Jefferson, P.G., Johnson, D.A., Asay, K.H.** (1989) Epicuticular wax production, water status and leaf temperature in *Triticaceae* range grasses of contrasting visible glaucousness. *Canadian Journal of Plant Science* 69: 513-519
- Jeffree, C.E.** (1996) Structure and ontogeny of plant cuticles. In: *Plant Cuticles an integrated functional approach* (ed. Kerstiens, G.). Bios Scientific Publications, Oxford.
- Jetter, R. and Riederer, M.** (1994) Epicuticular crystals of nonacosan-10-ol: in-vitro reconstitution and factors influencing crystal habits. *Planta* 195: 257-270
- Jetter, R., Schäffer, S. and Riederer M.** (2000) Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L.. *Plant Cell and Environment* 23: 619-628
- Johnson G.A, Mantha S.V, Day T.A.** (2000) A spectrofluorometric survey of UV-induced blue-green fluorescence in foliage of 35 species. *Journal of Plant Physiology* 156: 242-252.
- Johnson, D.A., Richards, R.A., Turener, R.C.** (1983) Yield, water relations, gas exchange and surface reflectances of near-isogenic wheat lines differing in glaucousness. *Crop Science* 23: 318-325

- Ju, Z. and Bramlage, W.J.** (1999) Phenolics and lipid-soluble antioxidants in fruit cuticle of apples and their antioxidant activities in model system. *Postharvest Biology and Technology* 16: 107-118
- Ju, Z. and Bramlage, W.J.** (2000) Cuticular phenolics and scald development in Delicious apples. *Journal of the American Society of the Horticultural Science* 125: 498-504
- Kagan M.L. and Sachs, T.** (1991) Development of immature stomata: evidence for epigenetic selection of a spacing pattern. *Developmental Biology* 146: 100-105
- Karabourniotis G, Tzobanoglou D, Nikolopoulos D, Liakopoulos G.** (2001) Epicuticular phenolics over guard cells: exploitation for *in situ* stomatal counting by fluorescence microscopy and combined image analysis. *Annals of Botany* 87: 631-639.
- Karabourniotis, G., Kofidis, G., Fasseas, C., Liakoura, V., Drossopoulos, I.** (1998) Polyphenol deposition in leaf hairs of *Olea europaea* (Oleaceae) and *Quercus ilex* (Fagaceae). *American Journal of Botany* 85: 1007-1012
- Karabourniotis, G., Kyparissis, A., Manetas, Y.** (1993) Leaf hairs of *Olea europaea* protect underlying tissues against ultraviolet-B radiation damage during leaf development. *Environmental and Experimental Botany* 33: 341-345
- Karabourniotis, G., Papadopoulos, K., Papamarkou, M., Manetas, Y.** (1992) Ultraviolet-B radiation absorbing capacity of leaf hairs. *Physiologia Plantarum* 86: 414-418
- Kerstiens, G.** (1996a) Signalling across the divide: a wider perspective of cuticular structure-function relationships. *Trends in Plant Science* 1: 125-129
- Kerstiens, G.** (1996b) Cuticular water permeability and its physiological significance. *Journal of Experimental Botany* 47: 1813-1832
- Knoll, D. and Schreiber, L.** (1998) Influence of epiphytic micro-organisms on leaf wettability: wetting of the upper leaf surface of *Juglans regia* and of model surfaces in relation to colonization by micro-organisms. *New Phytologist* 140: 271-282
- Kolattukudy, P.E.** (1980) Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science* 208: 990-999
- Kolattukudy, P.E., Purdy, R.E., Maiti, I.B.** (1981) Cutinases from fungi and pollen. *Methods in Enzymology* 71: 652-660
- Krauss, P., Markstädter, C., Riederer, M.** (1997) Attenuation of UV radiation by plant cuticles from woody species. *Plant, Cell and Environment* 20: 1079-1085
- Lake, J.A., Quick, W.P., Beerling, D.J., Woodward, F.I.** (2001) Plant development: Signals from mature to new leaves. *Nature* 411: 154
- Larkin, J.C., Marks, M.D., Nadeau, J., Sack, F.** (1997) Epidermal cell fate and patterning in leaves. *Plant Cell* 9: 1109-1120

- Larsson, S. and Svenningsson, M.** (1986) Cuticular transpiration and epicuticular lipids of primary leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *Physiologia Plantarum* 68: 13-19
- Liakopoulos, G., Stavrianakou, S., Karabourniotis, G.** (2001) Analysis of epicuticular phenolics of *Prunus persica* and *Olea europaea* leaves: evidence for the chemical origin of the UV-induced blue fluorescence of stomata. *Annals of Botany* 87: 641-648
- Liakoura, V., Stefanou, M., Manetas, Y., Cholevas, C., Karabourniotis, G.** (1997) Trichome density and its UV-B protective potential are affected by shading and leaf position on the canopy. *Environmental and Experimental Botany* 38: 223-229
- Machado, R.D. and Barros, C.F.** (1995) Epidermis and epicuticular waxes of *Syagrus coronata* leaflets. *Canadian Journal of Botany* 73: 1947-1952
- Manetas, Y., Petropoulou, Y., Stamatakis, K., Nikolopoulos, D., Levizou, E., Psaras, G., Karabourniotis, G.** (1997) Beneficial effects of enhanced UV-B radiation under field conditions: improvement of needle water relations and survival capacity of *Pinus pinea* L. seedlings during dry Mediterranean summer. *Plant Ecology* 128: 100-108
- Marois, R.T., Bledsoe, A.M., Bostock, R.M., Gubler, W.D.** (1985) Effects of surfactant adjuvants on development of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 75: 1329-1335
- McDonald, R.E, Nordby, E., McCollum, T.G.** (1993) Epicuticular wax morphology and composition are related to grapefruit chilling injury. *Hortscience* 28: 311-312
- Mendgen, K., Hahn, M., Deising, H.** (1996) Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant phytopathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 34: 367-386
- Mérida, T., Schönherr, J., Schmidt, H.W.** (1981) Fine structure of plant cuticles in relation to water permeability: The fine structure of *Clivia miniata* Reg. leaves. *Planta* 152: 259-267
- Meusel, I., Neinhuis, C., Markstädter, C., Barthlott, W.** (2000) Chemical composition and recrystallization of epicuticular waxes: coiled rodlets and tubules. *Plant Biology* 2: 462-470
- Mulroy, T.W.** (1979) Spectral properties of heavily glaucous and non-glaucous leaves of a succulent rosette-plant. *Oecologia* 38: 349-357
- Murphy, A.M., Chivasa, S., Singh, D.P., Carr, J.P.** (1999) Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways? *Trends in Plant Science* 4: 155-160
- Neinhuis, C. and Barthlott, W.** (1997) Characterization and distribution of water-repellent, self-cleaning plant surfaces. *Annals of Botany* 79: 667-677

- Neinhuis, C., Koch, K., Barthlott, W.** (2001) Movement and regeneration of waxes through plant cuticles. *Planta* 213: 427-434
- Podila, G. K., Rogers, L.M., Kolattukudy, P.** (1993) Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiology* 103: 267-272
- Post-Beittenmiller, D.** (1996) Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 405-430
- Prokopy, R.J., Collier, R.H., Finich, S.** (1983) Leaf color used by cabbage root flies to distinguish among host plants. *Science* 221: 190-192
- Pyee, J., Yu, H.S., Kolattukudy, P.E.** (1994) Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of broccoli (*Brassica oleracea*) leaves *Archives in Biochemistry and Biophysics* 311: 460-468
- Pyke, K.A., Marrison, J.L., Leech, R.M.** (1991) Temporal and spatial development of the cells of the expanding first leaf of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Journal of Experimental Botany* 42: 1407-1416
- Rao, N.N., Siegel, M.R., Neilson, M.T., Wiglesworth, M.D., Burton, H.R., Kuc, J.** (1989) Relationship between susceptibility of field-grown burley tobacco to blue mold and contents of divatrienediols. *Phytopathology* 79: 267-270
- Raskin, I.** (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 439-463
- Reynhardt, E.C. and Riederer, M.** (1994) Structure and molecular dynamics of the cuticular waxes. II Cuticular waxes from leaves of *Fagus sylvatica* L. and *Hordeum vulgare* L. *European Biophysics Journal* 23: 59-70
- Riederer, M. and Schneider, G.** (1989) Comparative study of the composition of waxes extracted from isolated leaf cuticles and from whole leaves of *Citrus*: evidence for selective extraction. *Physiologia Plantarum* 77: 373-384
- Riederer, M. and Schneider, G.** (1990) The effect of the environment on the permeability and composition of *Citrus* leaf cuticles. *Planta* 180: 154-165
- Riederer, M. and Schönherr, J.** (1988) Development of plant cuticles fine structure and cutin composition of *Clivia miniata*. *Planta* 174: 127-138
- Rieley, G., Welker, J.M., Callaghan, T.V., Eglinton, G.** (1995) Epicuticular waxes of two arctic species: compositional differences in relation to winter snow cover. *Phytochemistry* 38: 45-52
- Riley, R.G. and Kolattukudy, P.E.** (1975) Evidence for covalently attached *p*-coumaric acid and ferulic acid in cutins and suberins. *Plant Physiology* 56: 650-654
- Robberecht, R., Caldwell, M.M., Billings, W.D.** (1980) Leaf ultraviolet optical properties along a latitudinal gradient in the arctic-alpine life zone. *Ecology* 61: 612-619

- Robinson., S.A. and Osmond, C.B.** (1994) Internal gradients of chlorophyll and carotenoid pigments in relation to photoprotection in thick leaves of plants with *Crassulacean* acid metabolism. *Australian Journal of Plant Physiology* 21: 497-506
- Rosenquist, J.K. and Morrisson, J.C.** (1988) The development of the cuticle and epicuticular wax of the grape berry. *Vitis* 27: 63-70
- Rost, F.W.D.** (1992) Fluorescence microscopy (vol.1). Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Rost, F.W.D.** (1995) Fluorescence microscopy (vol.2). Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Russin, J.S., Guo, B.Z., Tubajika, K.M., Brown, R.L., Cleveland, T.E., Widstrom, N.W.** (1997) Comparison of kernel wax from corn genotypes resistant or susceptible to *Asperigillus flavus*. *Phytopathology* 87: 529-533
- Sachs, T.** (1991) Pattern formation in plant tissues. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Sachs, T., Novoplansky, N., Kagan, M.L.** (1993) Variable development and cellular patterning in the epidermis of *Ruscus hypoglossum*. *Annals of Botany* 71: 237-243
- Salisbury, F.B. and Ross, C.W.** (1992) Plant Physiology Wadsworth Publishing Company, California
- Schmidt, H.W. and Schönherr, J.** (1982) Development of plant cuticles- Occurrence and role of non-ester bonds in cutin of *Clivia miniata* Reg. leaves. *Planta* 156: 380-384
- Schönherr, J.** (1976) Water permeability of isolated cuticular membranes: The effect of cuticular waxes on diffusion of water. *Planta* 131: 159-164
- Schreiber, L. and Riederer, M.** (1996) Determination of diffusion coefficients of octadecanoic acid in isolated cuticular waxes and their relationship to cuticular water permeabilities. *Plant, Cell and Environment* 19: 1075-1082
- Schreiber, L., Kirsch, T., Riederer, M.** (1996) Transport properties of cuticular waxes of *Fagus sylvatica* L. and *Picea abies* (L.) Karst.: estimation of size selectivity and tortuosity from diffusion coefficients of aliphatic molecules. *Planta* 198: 104-109
- Seigler, D.S.** (1995) Tannins. In: Plant Secondary Metabolism Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Serna, L. and Fenoll, C.** (2000a) Stomatal development in *Arabidopsis*: how to make a functional pattern. *Trends in Plant Science* 5: 4458-4460
- Serna, L. and Fenoll, C.** (2000b) Stomatal development and patterning in *Arabidopsis* leaves. *Physiologia Plantarum* 109: 351-358

- Shepherd, T., Robertson, G.W., Griffiths, D.W., Birch, A.N.** (1999) Epicuticular wax composition in relation to aphid infestation and resistance in red raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Phytochemistry* 52: 1239-1254
- Shirley, B.W.** (1996) Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. *Trends in Plant Science* 1: 377-382
- Sieber, P., Schorderet, M., Ryser, U., Buchala, A., Kolattukudy, P.E., Métraux, J.-P. and Nawrath, C.** (2000) Transgenic *Arabidopsis* plants expressing a fungal cutinase show alterations in the structure and properties of the cuticle and postgenital organ fusions. *Plant Cell* 12: 721-738
- Skaltsa, H., Vercokidou, E., Harvala, C., Karabourniotis, G., Manetas, Y.** (1994) UV-B protective potential and flavonoid content of leaf hairs of *Quercus ilex*. *Phytochemistry* 37: 987-999
- Stockwell, V. and Hanchey, P.** (1983) The role of the cuticle in resistance of beans to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 73: 1640-1642
- Strack, D.** (1997) Phenolic metabolism. In: *Plant Biochemistry* (eds Dey, P.M., Harborne, J.B.). Academic Press, London.
- Taiz, L. and Zeiger E.** (1998) *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts.
- Tevini, M.** (1994) UV-B effects radiation on terrestrial plants In: *UV-B radiation and ozone depletion*. (Tevini, M. ed.) Lewis Publishers, Boca Raton.
- Tichá, I.** (1982) Photosynthetic characteristics during ontogenesis of leaves 7. Stomata density and sizes. *Photosynthetica* 16: 375-471
- Wallace, G. and Fry, S.C.** (1994) Phenolic components of the plant cell wall. *International Review of Cytology* 151:229-267
- Wang, C., Chin, C-K., Gianfagna, T.** (2000) Relationship between cutin monomers and tomato resistance to powdery mildew infection. *Physiological and Molecular Plant Physiology* 57: 55-61
- Wang, S.C. and Pinckard, J.A.** (1973) Cotton boll cuticle, a potential factor in boll resistance. *Phytopathology* 63: 315-319
- Weaver, L.M. and Herrmann, K.M.** (1997) Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends in Plant Science* 2: 346-351
- Wei, N., Kwok, S.F., von Arnim, A.G., Lee, A., McNellis, T.W., Piekos, B., Deng, X-W.** (1994) *Arabidopsis* COP8, COP10, and COP11 genes are involved in repression of photomorphogenic development in darkness. *Plant Cell* 6: 629-643
- White, C. and Eigenbrode, S.D.** (2000) Leaf surface waxbloom in *Pisum sativum* influences predation and intra-guild interactions involving two predator species. *Oecologia* 124: 252-259
- Willmer, C.M.** (1983) *Stomata*. Longman Inc., New York

- Wollenweber, E.** (1982) Flavones and flavonols. In: The flavonoids: advances in research (eds Harborne, J.B., Marby, T.J.). Chapman and Hall, London.
- Wollenweber, E., Wehde, R., Dorr, M., Lang, G. and Stevens, J.F.** (2000a) *C*-methyl-flavonoids from leaf waxes of some Myrtaceae. *Phytochemistry*, 55: 965-970
- Wollenweber, E., Wieland, A. and Haas, K.** (2000b) Epicuticular waxes and flavonol aglycons of the European mistletoe *Viscum album* L. *Zeitschrift für Naturforschung* 55c: 314-317
- Yang, M. and Sack, F.D.** (1995) The *too many mouths* and *four lips* mutations affect stomatal production in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 7: 2227-2239
- Zhao, L. and Sack, F.D.** (1999) Ultrastructure of stomatal development in *Arabidopsis* (Brassicaceae) leaves. *American Journal of Botany* 86: 929-939

