

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ



Ανατομικά και Φυσιολογικά Χαρακτηριστικά  
των Ιδιοβλαστών που Σχηματίζουν  
Κρυστάλλους στο Μεσόφυλλο του Βλήτου  
(*Amaranthus sp.*)

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ  
Γεωργία Τσουλάκου

ΑΘΗΝΑ 2006



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

Ανατομικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των ιδιοβλαστών που  
σχηματίζουν κρυστάλλους στο μεσόφυλλο του βλήτου  
(*Amaranthus sp.*).

**Τουλάκου Γεωργία**

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

**ΑΘΗΝΑ 2006**



Το θέμα της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης εγκρίθηκε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύνθεσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (ΓΣΕΣ 2/26-10-2005). Η πενταμελής εξεταστική επιτροπή εγκρίθηκε με απόφαση της ΓΣΕΣ 7/29-11-2005.

## **ΠΕΝΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Γ. Καραμπουρνιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής (επιβλέπων)

Π. Κατινάκης, Καθηγητής (μέλος)

Δ. Μπουράνης, Αναπληρωτής Καθηγητής (μέλος)

Κ. Φασσέας, Αναπληρωτής Καθηγητής(μέλος)

Γ. Αϊβαλάκις, Επίκουρος Καθηγητής (μέλος)



## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....	5
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	11
I. Εισαγωγή.....	13
I.1. Φωτοσύνθεση .....	15
1.1. Φωτεινές αντιδράσεις .....	16
1.2. Σκοτεινές αντιδράσεις (κύκλος του Calvin) .....	18
1.2.1. C <sub>3</sub> φωτοσύνθεση .....	18
1.2.2. C <sub>4</sub> φωτοσύνθεση ή κύκλος των Hatch και Slack.....	21
1.2.3. Ο μεταβολισμός οξέων τύπου Crassulaceae (CAM).....	26
1.3. Φωτοσυνθετική δραστηριότητα σε ιστούς εκτός των φύλλων).....	26
1.4. Παράγοντες του περιβάλλοντος που επηρεάζουν την φωτοσύνθεση.....	27
1.4.1. Φωτεινή ακτινοβολία .....	27
1.4.2. Θερμοκρασία .....	28
1.4.3. Ανεπάρκεια νερού .....	28
1.4.4. Διοξείδιο του άνθρακα (CO <sub>2</sub> ).....	28
I.2. Αναπνοή .....	30
I.3. Διαπνοή.....	31
I.4. Τα σταθερά ισότοπα άνθρακα και η συμβολή τους στη μελέτη της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας των φυτών.....	34
I.5. Τα κυτταρικά έγκλειστα.....	37
5.1. Κρυστάλλοι οξαλικού ασβεστίου.....	37
5.1.1. Σχηματισμός κρυστάλλων σε ιδιόβλαστα κύτταρα.....	39
5.1.1.1. Χαρακτηριστικά των ιδιοβλαστών .....	39
5.1.1.2. Σχηματισμός των κρυστάλλων.....	41
5.1.2. Μορφολογία των κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου.....	44
5.1.3. Πιθανή φυσιολογική σημασία των κρυστάλλων .....	46
5.2. Κυστόλιθοι .....	48
5.3. Άμορφες εναποθέσεις πυριτίου (φυτόλιθοι).....	50
I.6. Τα κοκκολιθοφόρα .....	51
I.7. Βοτανικοί χαρακτήρες του πειραματόφυτου .....	53
II. Σκοπός της εργασίας.....	55
III. Υλικά και Μέθοδοι.....	59
III.1. Οι πειραματικοί χειρισμοί.....	61
III.2. Ανατομικές παρατηρήσεις.....	63
III.3. Απομόνωση κρυστάλλων.....	63
III.4. Μέτρηση των διαστάσεων των κρυστάλλων.....	64
III.5. Μετρήσεις των ημερονύκτιων διακυμάνσεων των διαστάσεων των κρυστάλλων και ορισμένων φυσιολογικών παραμέτρων.....	64
III.6. Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός των κρυστάλλων με τη μέθοδο FT-Raman.....	65
6.1. Φασματοσκοπία Raman .....	65
6.1.1. Εφαρμογές της φασματοσκοπίας FT-Raman .....	67

6.2. Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός των κρυστάλλων.....	67
III.7. Μέτρησεις με Isotope Ratio Mass Spectrometer (IRMS). .....	68
IV. Αποτελέσματα .....	69
IV.1. Ανατομικές παρατηρήσεις.....	71
IV.2. Απομόνωση κρυστάλλων .....	71
IV.3. Μέτρηση των διαστάσεων των κρυστάλλων.....	74
IV.4. Μέτρησεις των ημερονύκτιων διακυμάνσεων των διαστάσεων των κρυστάλλων και ορισμένων φυσιολογικών παραμέτρων.....	77
IV.5. Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός των κρυστάλλων με τη μέθοδο FT- Raman. ....	80
IV.6. Μέτρησεις με Isotope Ratio Mass Spectrometer (IRMS). .....	81
V. Συζήτηση .....	85
VI. Βιβλιογραφία .....	95



## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

Ένα ακόμη ταξίδι στο θαυμαστό κόσμο των φυτών κάπου εδώ τελειώνει. Όπως κάθε ταξίδι έτσι και αυτό εμπειρείχε στιγμές όμορφες γεμάτες χαμόγελα και αισιοδοξία αλλά και, στιγμές κούρασης, άγχους και στεναχώριας. Στο τέλος του ταξιδιού μου αυτού θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους ανθρώπους που βοήθησαν να κάνω ένα ακόμη βήμα προς την προσωπική μου Ιθάκη εμπλουτίζοντας ταυτόχρονα το ταξίδι με συναισθήματα εμπειρίες και συμβουλές.

Εγκάρδιες ευχαριστίες λοιπόν:

Στον Α.Καθηγητή κ. Γεώργιο Καραμπουρνιώτη για την ανάθεση, την επίβλεψη και την εξονυχιστική διόρθωση της μελέτης αυτής, για την εμπιστοσύνη που δείχνει στο πρόσωπο μου, για τις πολύτιμες συμβουλές του αλλά κυρίως για την ανθρώπινη σχέση, το ενδιαφέρον και την υπομονή του.

Στα μέλη της πενταμελούς εξεταστικής επιτροπής: Καθηγητή κ. Παναγιώτη Κατινάκη, Α.Καθηγητή κ. Δημήτρη Μπουράνη, Α.Καθηγητή κ. Κώστα Φασσέα και Ε.Καθηγητή κ. Γεώργιο Αιβαλάκι για την συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή, την διόρθωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης, καθώς και για τις παρατηρήσεις τις συμβουλές και την βοήθεια που μου παρείχαν.

Στον δρ. κ. Δημοσθένη Νικολόπουλο (μέλος ΕΙ.Ε.ΔΙ.Π) για την διαρκή βοήθεια και επίβλεψη κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, την υπομονή του αλλά κυρίως για το ευχάριστο κλίμα και την πάντα καλή και φιλική του συμπεριφορά.

Στον Καθηγητή Χρίστο Κοντογιάννη με τη βοήθεια του οποίου πραγματοποιήθηκε η ανάλυση απομονωμένων κρυστάλλων με φασματοσκοπία FT-Raman.

Στην δρ. Μαριαντζελα Φωτέλλη για την βοήθεια στην πραγματοποίηση των μετρήσεων με IRMS, για τη μετάγγιση γνώσης και θετικής ενέργειας.

Στην υπόλοιπη "εργαστηριακή οικογένεια": ιδιαίτερα στον μεταδιδακτορικό ερευνητή Γιώργο Λιακόπουλο για την απλόχερη βοήθεια, τη

φροντίδα του κειμένου και της παρουσίασης, τις υποδείξεις και την καλή διάθεση, στις υποψήφιες διδάκτορες Βασιλική Σταυρουλακη και Σωτηρία Σταυριανάκου για την φιλικό κλίμα και τις συμβουλές, στην γεωπόνο Βαρβάρα Ψαρούδη για τη βοήθεια το ενδιαφέρον και την φιλική συμπεριφορά και στην κ. Ανδριάννα Σιψά για την πάντα ευχάριστη διάθεση.

Στη συνοδουπόρο σ' αυτό το μεταπτυχιακό Ασπασία Κλουβάτου για την συμπαράσταση κατά τη διάρκεια των μαθημάτων και των πειραμάτων και το ζεστό χαμόγελο.

Στην Σκεύη, τον Αργύρη, την Κατερίνα, την Έλλη, τη Βάσω, την Αναστασία, τη Δέσπω, τον Γιώργο, την Δήμητρα, την Ευτυχία για την αγάπη, την φιλία, την εμπιστοσύνη, την αμέριστη συμπαράσταση και την ανιδιοτελή προσφορά βοήθειας.

Στον πατέρα μου Χριστόδουλο Τσουλάκο και στο αδερφό μου Παύλο για την αγάπη τους, την αρωγή, τη προστασία και την στήριξη τους σε κάθε μου βήμα. Στον αδερφό μου ιδιαίτερες ευχαριστίες και για την επιμέλεια του εξωφύλλου. Σ' όλη την υπόλοιπη οικογένεια για την αγάπη και το ενδιαφέρον τους όλα αυτά τα χρόνια .

**Στους παππούδες και στις γιαγιάδες μου**



## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε να δοθεί απάντηση στην υπόθεση εργασίας σύμφωνα με την οποία οι κρύσταλλοι αποτελούν δυναμικά συστήματα που εξυπηρετούν τη διαχείριση των αποθεμάτων οργανικού άνθρακα ή/και του ασβεστίου. Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκαν δεδομένα τα οποία σχετίζονται με τη δομή, τη θέση και τη συμπεριφορά των ιδιοβλαστών που σχηματίζουν κρυστάλλους στο μεσόφυλλο του βλήτου (*Amaranthus sp.*) ως δυναμικού συστήματος διαχείρισης. Οι κρύσταλλοι, δεδομένου ότι εντοπίζονται στο μεσόφυλλο μεταξύ των φωτοσυνθετικών κυττάρων, θα μπορούσαν κάλλιστα να επιτελέσουν το ρόλο των εναλλακτικών πηγών άνθρακα για τη φωτοσυνθετική λειτουργία. Διερευνήθηκε επίσης η δυνατότητα απόδοσης των αποθεμάτων άνθρακα των κρυστάλλων υπό συνθήκες πενίας CO<sub>2</sub>. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα τα οποία είχαν ως στόχο να αποκλειστεί η τροφοδοσία άνθρακα προς τα φωτοσυνθετικά κύτταρα αποκλείοντας το CO<sub>2</sub> από τη ρίζα (-r/+a), από την ατμόσφαιρα (+r/-a) αλλά και από τα δύο τμήματα (-r/-a) των φυτών. Στα φυτά όλων των χειρισμών διαπιστώθηκε η μείωση του μεγέθους των κρυστάλλων σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες. Επίσης διαπιστώθηκε ότι το μέγεθος των κρυστάλλων ελαττώνεται κατά τη διάρκεια της ημέρας και αυξάνεται κατά τη διάρκεια της νύκτας, όταν τα στομάτια κλείνουν.

Τα αποτελέσματα των φασμάτων FT-Raman επιβεβαίωσαν ότι οι κρύσταλλοι του *Amaranthus sp.* αποτελούνται από μονοένυδρο οξαλικό ασβέστιο (COM) ενώ στον χειρισμό (-r/-a) ανιχνεύθηκε και έντονη παρουσία KNO<sub>3</sub>. Ασθενής παρουσία KNO<sub>3</sub> ανιχνεύθηκε και στον χειρισμό (+r/-a). Θεωρείται πιθανόν ότι σε συνθήκες έλλειψης άνθρακα αφενός μεν οι κρύσταλλοι αποδομούνται, ώστε να προμηθεύσουν τον κύκλο του Calvin με τον απαραίτητο άνθρακα για την απρόσκοπτη λειτουργία του, αφετέρου εναποτίθεται στους κρυστάλλους άζωτο υπό μορφή KNO<sub>3</sub>.

Επιπλέον μελετήθηκε η ισοτοπική σύσταση ( $\delta^{13}\text{C}$ ) δειγμάτων βλαστού, ρίζας, φύλλων και κρυστάλλων. Οι τιμές του  $\delta^{13}\text{C}$  των φυτικών ιστών του φυτού

*Amaranthus sp.* είναι χαρακτηριστικές για C<sub>4</sub> φυτό ενώ δεν παρατηρούνται ουσιαστικές διαφορές μεταξύ των επιμέρους οργάνων γεγονός που υποδηλώνει ότι ο άνθρακας της βιομάζας έχει παρόμοια προέλευση, οι κρύσταλλοι παρουσιάζονται περισσότερο εμπλουτισμένοι σε <sup>13</sup>C σε σχέση με τη βιομάζα, εύρημα που ενισχύει την υπόθεση ότι το CO<sub>2</sub> που προέρχεται από την αναπνοή χρησιμοποιείται για το σχηματισμό των κρυστάλλων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι οι κρύσταλλοι δεν αποτελούν μια στατική δεξαμενή αποθήκευσης ιόντων ασβεστίου τα οποία βρίσκονται σε περίσσεια, αλλά ένα δυναμικό σύστημα, το οποίο έχει τη δυνατότητα να αποδώσει εκ νέου τα αποθηκευμένα ιόντα στο κυτταρικό περιβάλλον, όταν αυτό το επιβάλλουν οι συνθήκες. Επίσης ότι η λειτουργία των κρυστάλλων πιθανόν να συνδέεται αντιμετώπιση αντίξοων συνθηκών, κατά τη διάρκεια των οποίων τα στομάτια παραμένουν κλειστά και δεν πραγματοποιείται ανταλλαγή αερίων.

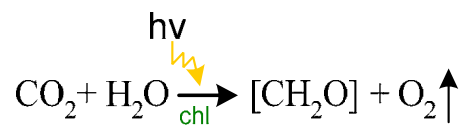
## *I. Εισαγωγή*





## Ι.1. Φωτοσύνθεση

Με τον όρο *φωτοσύνθεση* περιγράφεται η φωτοχημική διαδικασία μέσω της οποίας οι αυτότροφοι οργανισμοί (φυτά και φωτοσυνθετικά βακτήρια), αξιοποιούν τη φωτεινή ακτινοβολία και συνθέτουν οργανικές ενώσεις από πρόδρομα ανόργανα συστατικά. Η μετατροπή της φωτεινής ενέργειας σε χημική η οποία πραγματοποιείται μέσω πολυάριθμων αντιδράσεων και μηχανισμών, περιγράφεται συνοπτικά από την παρακάτω απλουστευμένη εξίσωση:



Στην εξίσωση αυτή το  $[\text{CH}_2\text{O}]$  αντιπροσωπεύει μια “υδατανθρακική μονάδα”. Με τη συνένωση έξι τέτοιων μονάδων σχηματίζεται ένα μόριο εξόζης [119,121,129].

Η φωτοσύνθεση είναι μια ισχυρά εξεργονική διαδικασία η οποία μπορεί να διακριθεί σε δύο φάσεις: Η πρώτη, φωτοεξαρτώμενη φάση, περιλαμβάνει τις *φωτεινές αντιδράσεις* και απαραίτητη προϋπόθεση είναι η παρουσία φωτός. Η ενέργεια ακτινοβολίας μετατρέπεται σε χημική με τη μορφή σταθερών χημικών ενώσεων υψηλού ενεργειακού περιεχομένου, του NADPH και του ATP. Στη φάση αυτή μόρια νερού φωτολύονται παράγοντας ηλεκτρόνια και πρωτόνια καθώς και μοριακό οξυγόνο ως παραπροϊόν. Στη δεύτερη φάση, τη βιοσυνθετική, η ενέργεια που έχει μετατραπεί σε NADPH και ATP χρησιμοποιείται για την ενσωμάτωση του  $\text{CO}_2$  και την βιοσύνθεση οργανικών ενώσεων. Η φάση αυτή αναφέρεται και ως σκοτεινή φάση ή *σκοτεινές αντιδράσεις* αφού δεν είναι απαραίτητη η παρουσία φωτός [62,119,123].

Χωροταξικά ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός των φυτών εντοπίζεται στους χλωροπλάστες, τα εξειδικευμένα υποκυτταρικά οργανίδια δικοκκιδούς συνήθως μορφής που απαντούν στα κύτταρα του φωτοσυνθετικού παρεγχύματος. Κάθε τυπικό φωτοσυνθετικό κύτταρο του μεσόφυλλου

## *Εισαγωγή*

περιέχει 20-60 χλωροπλάστες. Ο χλωροπλάστης περιβάλλεται από μια διπλή μεμβράνη, τον πλαστιδιακό φάκελο. Ο φάκελος περικλείει στο εσωτερικό του ένα άμορφο ζελατινώδες υλικό το οποίο ονομάζεται στρώμα και στο οποίο απαντώνται τα περισσότερα ένζυμα που καταλύουν τις σκοτεινές αντιδράσεις. Μέσα στο στρώμα αναπτύσσεται ένα δίκτυο μεμβρανών, τα θυλακοειδή του στρώματος τα οποία σε ορισμένες περιοχές οργανώνονται σε στιβάδες οι οποίες καλούνται grana. Τα θυλακοειδή που συμμετέχουν στο σχηματισμό των grana ονομάζονται θυλακοειδή των grana [97,119,124].

### **1.1. Φωτεινές αντιδράσεις**

Στα θυλακοειδή των grana λαμβάνουν χώρα οι φωτεινές αντιδράσεις αφού εκεί εντοπίζονται οι φωτοσυνθετικές χρωστικές. Για την πραγματοποίηση των φωτεινών αντιδράσεων λειτουργούν και συνεργάζονται μεταξύ τους δύο φωτοσυστήματα το Φωτοσύστημα I (PS I) και το Φωτοσύστημα II (PS II). Πρόκειται για μεγαλομοριακά σύμπλοκα πρωτεϊνών-χρωστικών τα οποία εντοπίζονται στις μεμβράνες των θυλακοειδών. Κάθε φωτοσύστημα διαθέτει ένα φωτοχημικό κέντρο στο οποίο συμβαίνει ο διαχωρισμός φορτίου και περιλαμβάνει χλωροφύλλη α ειδικής μορφής. Το PS I διεγείρεται από φως μήκους κύματος άνω των 700nm ενώ το PS II διεγείρεται από φως μήκους κύματος 680nm. Τα κέντρα αντίδρασης των Φωτοσυστημάτων I και II ονομάζονται P700 και P680 αντίστοιχα, από τα μέγιστα απορρόφησης τα οποία παρουσιάζουν. Οι διαφορές στις ιδιότητες της χλωροφύλλης α οφείλονται στις διαφορετικές μορφές των πρωτεϊνών από τις οποίες αποτελούνται τα σύμπλοκα. Κάθε κέντρο αντίδρασης διαθέτει αντίστοιχο φωτοσυλλεκτικό μηχανισμό ή αντένα φωτοσυλλογής ο οποίος απαρτίζεται από σύμπλοκα πρωτεϊνών-χρωστικών (LHC) όπως Ch1a, Ch1b και καροτενοειδή [119,124,129]. Οι χρωστικές στο φωτοσυλλεκτικό μηχανισμό είναι κατάλληλα διευθετημένες, ώστε η απορρόφηση ενός φωτονίου από ένα μόριο χρωστικής να μεταφέρει τη διέγερση αναγκαστικά προς το κέντρο αντίδρασης [62].

## *Εισαγωγή*

Όταν ένα φωτόνιο απορροφάται από το φωτοσυνθετικό μηχανισμό του PS II, ένα μόριο Chla του ενεργού κέντρου διεγείρεται με αποτέλεσμα ένα ηλεκτρόνιο να μεταφέρεται σε έναν αποδέκτη ηλεκτρονίων. Το PS II στην οξειδωμένη του μορφή είναι ισχυρά αναγωγικό και προκαλεί οξείδωση του νερού παράγοντας πρωτόνια ( $H^+$ ), ηλεκτρόνια ( $e^-$ ) και οξυγόνο [119,123]. Η διάσπαση των μορίων του νερού ονομάζεται φωτόλυση του νερού και καταλύεται από το σύμπλοκο φωτόλυσης του νερού, ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο ισχυρά συνδεδεμένο με το PS II. Τα  $e^-$  που προκύπτουν από τη φωτόλυση του νερού επαναφέρουν το PS II στην αρχική του κατάσταση. Τα  $e^-$  που προέρχονται από την οξείδωση του PS II μεταφέρονται διαμέσου μιας αλυσίδας μεταφοράς  $e^-$  με σημαντικότερο φορέα το σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων bf, στο PS I [106,119]. Ταυτόχρονα η απορρόφηση ενός φωτονίου από τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό του PS I προκαλεί διέγερση σε ένα μόριο Chla του ενεργού του κέντρου. Μέρος από τα  $e^-$  από το οξειδωμένο PS I μεταφέρονται μέσω ενός δέκτη  $e^-$  στην φερεδοξίνη η οποία ανάγεται. Στην συνέχεια η ανηγμένη φερεδοξίνη οξειδώνεται με τη βοήθεια της ρεδοκτάσης του  $NADP^+$  και ανάγει το  $NADP^+$  σε  $NADPH + H^+$ . Τα υπόλοιπα  $e^-$  μεταφέρονται μέσω φορέων και πάλι στο PS I το οποίο προσλαμβάνοντας και τα  $e^-$  που προέρχονται από το PS II επανέρχεται στην αρχική κατάσταση. Η ροή ηλεκτρονίων μεταξύ των δύο Φωτοσυστημάτων έχει ως τελικό αποτέλεσμα τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το νερό στο  $NADP^+$  παράγοντας ταυτόχρονα μια διαβάθμιση ηλεκτροχημικού δυναμικού και pH μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης των θυλακοειδών. Η διαβάθμιση αυτή αποτελεί την κινητήρια δύναμη για τη σύνθεση ATP [106,119,124]. Η σύνθεση του ATP πραγματοποιείται μέσω του διαμεμβρανικού συμπλόκου της σύνθεσης του ATP, που εντοπίζεται στην μεμβράνη των θυλακοειδών. Η αντίστροφη αυτή αυθόρμητη ροή  $H^+$  από το lumen προς το στρώμα διαμέσου του συμπλόκου τείνει να εξισορροπήσει τη διαφορά pH, ενώ παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για την φωσφορυλίωση του ADP σε ATP. Κατά συνέπεια η ροή  $e^-$  από τα φωτοσυστήματα δημιουργεί τις προϋποθέσεις και για την σύνθεση ATP. Η μετατροπή αυτή της φωτεινής ενέργειας σε

## *Εισαγωγή*

χημική ονομάζεται φωτοφωσφορλίωση. Η γραμμική ροή  $e^-$  από το PS II προς το PS I ονομάζεται μη κυκλική μεταφορά  $e^-$  ή μη κυκλική φωτοφωσφορλίωση και έχει ως τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή NADPH +  $H^+$  και ATP ενώ η κυκλική μεταφορά των  $e^-$  από το PS I στο οξειδωμένο PS I ονομάζεται κυκλική φωτοφωσφορλίωση και έχει ως αποτέλεσμα μόνο την παραγωγή ATP. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι προκειμένου να παραχθεί ένα μόριο NADPH +  $H^+$  απαιτείται η απορρόφηση 4 φωτονίων (δύο από κάθε φωτοσύστημα) [119,123].

Η ενέργεια που παράγεται κατά τη διάρκεια των φωτεινών αντιδράσεων υπό μορφή ATP, NADPH +  $H^+$  χρησιμοποιείται για τις ενεργειακές ανάγκες των φυτικών κυττάρων παίρνοντας μέρος σε πολυάριθμες βιοχημικές αντιδράσεις σύνθεσης και μεταφοράς.

### **1.2. Σκοτεινές αντιδράσεις (κύκλος του Calvin)**

Ένα μεγάλο μέρος της ενέργειας αυτής καταναλώνεται για τη δέσμευση του  $CO_2$  από την ατμόσφαιρα και την αναγωγή του μέχρι το επίπεδο των υδατανθράκων (φωτοσυνθετική αφομοίωση του  $CO_2$ ) στις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης. Δηλαδή η ενέργεια που παράγεται στις φωτεινές αντιδράσεις καταναλώνεται για τη δημιουργία του ανθρακικού σκελετού των φυτικών οργανισμών και επομένως την παραγωγή βιομάζας [119].

Μέχρι σήμερα είναι γνωστές τρεις κύριες βιοχημικές παραλλαγές του φωτοσυνθετικού μεταβολισμού του άνθρακα [108,119]:

- 1) Η  $C_3$  φωτοσύνθεση
- 2) Η  $C_4$  φωτοσύνθεση ή κύκλος των Hatch και Slack
- 3) Ο Μεταβολισμός οξέων τύπου Crassulaceae(CAM)

#### **1.2.1. $C_3$ φωτοσύνθεση**

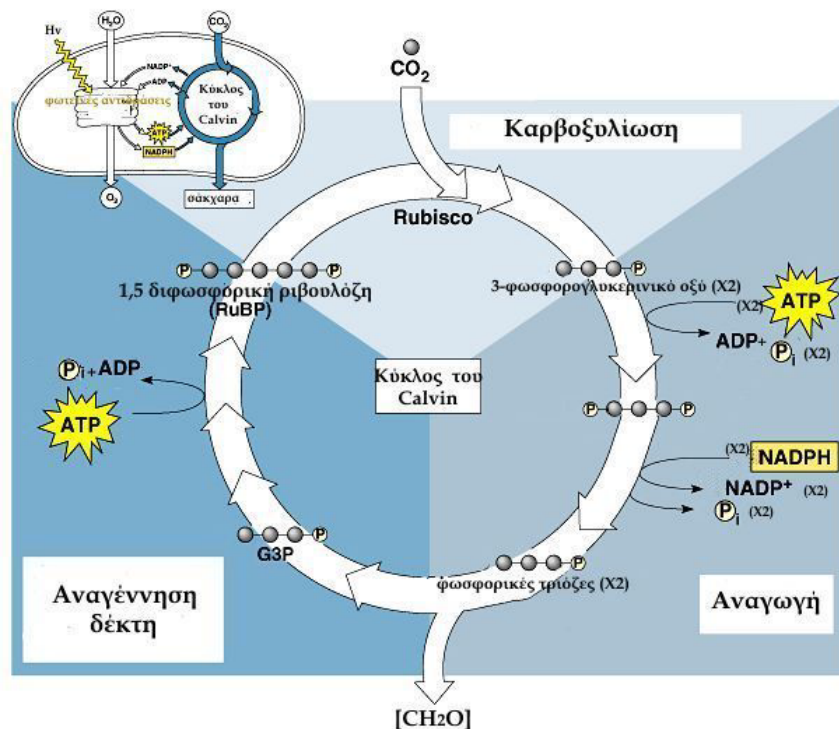
Η  $C_3$  φωτοσύνθεση ονομάζεται έτσι γιατί το πρώτο προϊόν της δέσμευσης του  $CO_2$  είναι μία ένωση με τρία άτομα άνθρακα (3-φωσφορογλυκερικό οξύ-3PGA). Αντίστοιχα τα φυτά που χρησιμοποιούν

## Εισαγωγή

αυτόν τον τύπο φωτοσύνθεσης ονομάζονται  $C_3$  και σ' αυτά ανήκουν τα περισσότερα φυτά της παγκόσμιας χλωρίδας. Στη  $C_3$  φωτοσυνθετική οδό το  $CO_2$  δεσμεύεται και στη συνέχεια ανάγεται έως το επίπεδο του υδατάνθρακα απευθείας μέσω του κύκλου του Calvin. Το  $CO_2$  μετατρέπεται σε φωσφορυλιωμένα σάκχαρα ενώ ταυτόχρονα αναγεννάται ο δέκτης του  $CO_2$  (η 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη- RuBP) [119].

Ο κύκλος περιλαμβάνει τρία επιμέρους στάδια (Εικόνα I.1.):

Στο πρώτο στάδιο του κύκλου, την καρβοξυλίωση, το  $CO_2$  ενσωματώνεται με τη μορφή μιας καρβοξυλομάδας στο μόριο-δέκτη, την 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη και παράγονται δύο μόρια 3-φωσφογλυκερικού οξέος (3-PGA). Την αντίδραση καταλύει το ένζυμο καρβοξυλάση-οξυγενάση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης (Rubisco) [97,119].



**Εικόνα I.1.** Η πορεία των βιοχημικών αντιδράσεων του κύκλου του Calvin. (τροποποίηση εικόνας από [www.uair.edu](http://www.uair.edu)).

Στο δεύτερο στάδιο, την αναγωγή, το 3-PGA ανάγεται προς φωσφορικές τριόζες (3-φωσφορική γλυκεριναλδεύδη ή φωσφορική διϋδροξυακετόνη) με

## *Εισαγωγή*

ταυτόχρονη κατανάλωση ATP και NADPH. Κατά το στάδιο αυτό το CO<sub>2</sub> έχει πλέον αναχθεί στο επίπεδο του υδατάνθρακα με κέρδος μία υδατανθρακική μονάδα, ενώ για κάθε τρεις περιστροφές του κύκλου το καθαρό προϊόν είναι ένα μόριο τριόζης [119,129].

Στο τρίτο στάδιο, την αναγέννηση του δέκτη, επιτελούνται μια σειρά από ενεργοβόρες αντιδράσεις (κατανάλωση ATP) ώστε η 1,5-διφωφορική ριβουλόζη να είναι διαθέσιμη εκ νέου για καρβοξυλίωση [119,108]. Οι επιμέρους αντιδράσεις του κύκλου καταλύονται από υδατοδιαλυτά ένζυμα που είναι εντοπισμένα στο στρώμα του χλωροπλάστη. Η λειτουργία του κύκλου του Calvin εξαρτάται άμεσα από τον εφοδιασμό σε ATP και NADPH (επομένως εξαρτάται έμμεσα από την ύπαρξη φωτισμού) καθώς και σε CO<sub>2</sub> [97,124].

Πρέπει να σημειωθεί ότι το ένζυμο καρβοξυλάση-οξυγενάση της 1,5-διφωφορικής ριβουλόζης (Rubisco) έχει θεμελιώδη σημασία όχι μόνο γιατί παίζει τον σημαντικότερο ρόλο στην ενσωμάτωση του CO<sub>2</sub> αλλά και γιατί είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη σε επίπεδο βιόσφαιρας Η συγκέντρωση της στα φύλλα κυμαίνεται μεταξύ 30 και 50 % της ολικής πρωτεΐνης, συνεπώς συμβάλλει σημαντικά στην διατροφή των ετερότροφων οργανισμών [119,124]. Όπως υποδηλώνει και η ονομασία της η Rubisco εκτός από την δράση της ως καρβοξυλάσης μπορεί να λειτουργήσει και ως οξυγενάση. Είναι λοιπόν φανερό ότι το CO<sub>2</sub> και το O<sub>2</sub> δρουν ανταγωνιστικά ως προς το υπόστρωμα, την 1,5-διφωφορική ριβουλόζη. Όπως αναφέρθηκε, κατά την καρβοξυλίωση της 1,5-διφωφορική ριβουλόζης παράγονται δύο μόρια 3-PGA, ενώ αντίθετα κατά την δράση της Rubisco ως οξυγενάσης παράγεται ένα μόριο 3-PGA και ένα μόριο φωσφογλυκολικού οξέως το οποίο παρεκκλίνει της πορείας του προς τον κύκλο του Calvin και αφού περάσει διαμέσου μίας σειράς από διαφορετικές αντιδράσεις σε διαφορετικά οργανίδια επανεισάγεται στον κύκλο του Calvin ως 3-PGA. Η βιοχημική αυτή οδός ονομάζεται φωτοαναπνοή διότι ενώ παρουσιάζει κοινά χαρακτηριστικά με την αναπνοή (κατανάλωση O<sub>2</sub> και παραγωγή CO<sub>2</sub>) απαιτείται φωτεινή

## *Εισαγωγή*

ακτινοβολία για να λειτουργήσει. Για κάθε δύο μόρια φωσφογλυκολικού οξέως (δηλ. 4 άτομα άνθρακα), τα τρία άτομα άνθρακα επιστρέφουν στον κύκλο του Calvin ενώ το ένα αποβάλλεται στην ατμόσφαιρα ως CO<sub>2</sub>. Συνεπώς η δραστηριότητα αυτή της Rubisco ως οξυγενάσης έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ενός ατόμου άνθρακα. Η ένταση της φωτοαναπνοής εξαρτάται από ορισμένους παράγοντες όπως το είδος του φυτού, την ένταση του φωτός, τη θερμοκρασία αλλά κυρίως την αναλογία των μερικών πιέσεων CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> στο περιβάλλον της Rubisco. Σε συνθήκες υψηλής μερικής πίεσης CO<sub>2</sub> η Rubisco λειτουργεί μόνο ως καρβοξυλάση χωρίς να επιτελείται ταυτόχρονα η λειτουργία της φωτοαναπνοής. Στις φυσιολογικές συγκεντρώσεις CO<sub>2</sub> και O<sub>2</sub> η δραστηριότητα της Rubisco ως οξυγενάσης φτάνει το 30% της δραστηριότητάς της ως καρβοξυλάσης. Οι απώλειες αυτές γίνονται μεγαλύτερες όταν οι χλωροπλάστες δεν τροφοδοτούνται με επαρκείς ποσότητες CO<sub>2</sub> στην περίπτωση π.χ που τα στομάτια λόγω υψηλής θερμοκρασίας παραμένουν κλειστά ή μισόκλειστα. Θεωρείται πιθανό η φωτοαναπνοή να αποτελεί εξελικτικό υπόλειμμα, που αντικατοπτρίζει την εξέλιξη της Rubisco από ένα αναερόβιο περιβάλλον (υψηλή συγκέντρωση CO<sub>2</sub> και χαμηλή συγκέντρωση O<sub>2</sub>) σε ένα αερόβιο περιβάλλον οπότε και εκδηλώθηκε ο διττός χαρακτήρας του ενζύμου. Ωστόσο τα φυτά μέσω της εξέλιξης αξιοποίησαν την βιοχημική αυτή αδυναμία και την μετέτρεψαν σε χρήσιμη μεταβολική διεργασία, αφού υπάρχουν ενδείξεις ότι η φωτοαναπνοή παρέχει προστασία στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Αυτό συμβαίνει είτε σε αντίξοες συνθήκες είτε σε περίπτωση περίσσειας ενέργειας στη φωτοσυνθετική συσκευή, ειδικότερα σε συνθήκες έλλειψης CO<sub>2</sub> [119,124].

### **1.2.2. C<sub>4</sub> φωτοσύνθεση ή κύκλος των Hatch και Slack**

Στη C<sub>4</sub> φωτοσύνθεση το πρώτο προϊόν της δέσμευσης του CO<sub>2</sub> είναι το οξαλοξικό οξύ (OOA), μια ένωση με τέσσερα άτομα άνθρακα. Τον τύπο αυτό της φωτοσύνθεσης χρησιμοποιούν φυτικά είδη τα οποία συγκροτούν μία λειτουργική ομάδα (C<sub>4</sub> φυτά) και εξαπλώνονται κυρίως σε περιοχές με τροπικό και υποτροπικό κλίμα. Αποτελούν μόλις το 1% των γνωστών ειδών στα οποία ωστόσο περιλαμβάνονται και καλλιεργούμενα φυτά μεγάλης

## *Εισαγωγή*

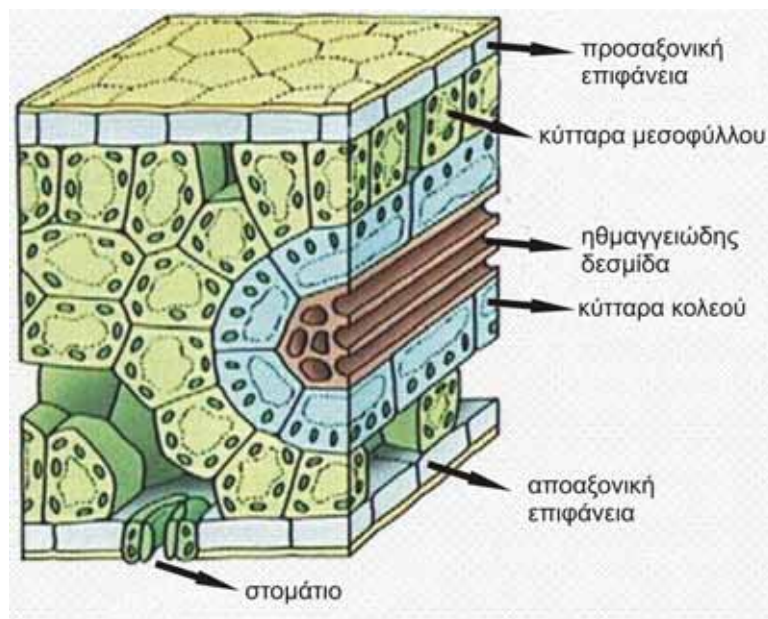
γεωργικής σημασίας όπως το καλαμπόκι και το σακχαροκάλαμο καθώς και ορισμένα δυσεξόντωτα ζιζάνια όπως η αγριάδα και το βλήτο. Η ομάδα αυτή των  $C_4$  φυτών περιλαμβάνει 1500 είδη τα οποία ανήκουν σε 18 οικογένειες. Τα φυτά αυτά πιθανότατα προήλθαν εξελικτικά από  $C_3$  φυτά τα οποία αναγκάστηκαν να προσαρμοστούν σε ένα αερόβιο περιβάλλον χαμηλής περιεκτικότητας σε  $CO_2$ . Η  $C_4$  οδός λειτουργεί ως ένα πολύπλοκο βιοχημικό και φυσιολογικό προσάρτημα του κύκλου του Calvin το οποίο εξυπηρετεί στη δέσμευση, μεταφορά και συγκέντρωση ατμοσφαιρικού  $CO_2$  στις περιοχές όπου λειτουργεί ο κύκλος του Calvin. Με το μηχανισμό αυτό επιτυγχάνονται πολύ υψηλότερες τοπικές συγκεντρώσεις  $CO_2$  και κατά συνέπεια αποτελεσματικότερη δέσμευσή του από τη Rubisco [101,119].

Σημαντικό ρόλο στην βιοχημική διαφοροποίηση των  $C_4$  φυτών από τα  $C_3$  έχει και η διαφορετική ανατομία των φύλλων των  $C_4$  φυτών. Σε μια εγκάρσια τομή ενός τυπικού  $C_3$  φύλλου χλωροπλάστες απαντώνται είτε σε ένα τύπο φωτοσυνθετικών κυττάρων (κύτταρα του μεσοφύλλου) είτε σε δύο τύπους φωτοσυνθετικών κυττάρων (δρυφρακτοειδούς παρεγχύματος και σπογγώδους παρεγχύματος) τα οποία δεν διαφοροποιούνται σημαντικά μεταξύ τους σε βιοχημικό επίπεδο. Αντίθετα σε μία εγκάρσια τομή ενός  $C_4$  φύλλου παρατηρούνται ηθμαγγειώδεις δεσμίδες πολύ κοντά μεταξύ τους, ενώ παρατηρούνται ανατομικά και βιοχημικά δύο διαφορετικοί τύποι φωτοσυνθετικών κυττάρων, τα κύτταρα του μεσοφύλλου και τα κύτταρα του κολεού της δέσμης. Τα κύτταρα αυτά είναι διευθετημένα σε ομόκεντρους κύκλους οι οποίοι περιβάλλουν τα κύτταρα της ηθμαγγειώδους δεσμίδας. Ο εξωτερικός κύκλος περιλαμβάνει τα κύτταρα του μεσοφύλλου ενώ ο εσωτερικός αποτελείται από τα κύτταρα του κολεού της δέσμης (Εικόνα I.2.). Η διεύθετηση αυτή των κυττάρων υπό μορφή στεφανιού αναφέρεται ως ανατομία τύπου Kranz (γερμανική λέξη η οποία σημαίνει στεφάνι) [101,119,129]. Τα κύτταρα του μεσοφύλλου δεν υπερβαίνουν τις τρεις στρώσεις και είναι χαλαρά συνδεδεμένα μεταξύ τους [124] σε αντίθεση με τα ευμεγέθη κύτταρα του κολεού της δέσμης τα οποία διαθέτουν παχιά κυτταρικά τοιχώματα και συνδέονται στενά μεταξύ τους. Σε τυπικές



## Εισαγωγή

περιπτώσεις  $C_4$  φύλλων δεν παρατηρείται δρυφρακτοειδές και σπογγώδες παρέγχυμα. Στα  $C_3$  φυτά στα κύτταρα του κολεού δεν παρατηρούνται συνήθως χλωροπλάστες, συνεπώς τα κύτταρα αυτά δεν διαδραματίζουν ρόλο στην φωτοσύνθεση. Σε επίπεδο λεπτής δομής οι χλωροπλάστες των  $C_4$  φυτών παρουσιάζουν διμορφισμό. Τα κύτταρα του κολεού των  $C_4$  φυτών διαθέτουν μεγάλο αριθμό καλά ανεπτυγμένων χλωροπλάστων των οποίων όμως τα grana είτε δεν είναι καλά σχηματισμένα) είτε απουσιάζουν και περιλαμβάνουν επίσης μεγάλο αριθμό μιτοχονδρίων και περοξυσωμάτων [119,126]. Αντίθετα οι χλωροπλάστες των κυττάρων του μεσόφυλλου είναι μικρότεροι με καλά ανεπτυγμένα grana. Επειδή η  $C_4$  μεταβολική οδός παρουσιάζει σημαντική πολυπλοκότητα, απαιτείται η καλή συνεργασία μεταξύ των δύο τύπων κυττάρων μέσω ενός εκτεταμένου δικτύου πλασμοδεσμών το οποίο διευκολύνει την επικοινωνία των κυττάρων και τη μετακίνηση των μεταβολιτών [119].



**Εικόνα I.2.** Η ανατομία τύπου Kranz σε ένα αντιπροσωπευτικό  $C_4$  φυτό. (τροποποίηση εικόνας από <http://ridge.icu.ac.jp/biobk/BioBookPS.html>)

Σε βιοχημικό επίπεδο η  $C_4$  φωτοσυνθετική οδός περιλαμβάνει τέσσερα στάδια (Εικόνα I.3.):

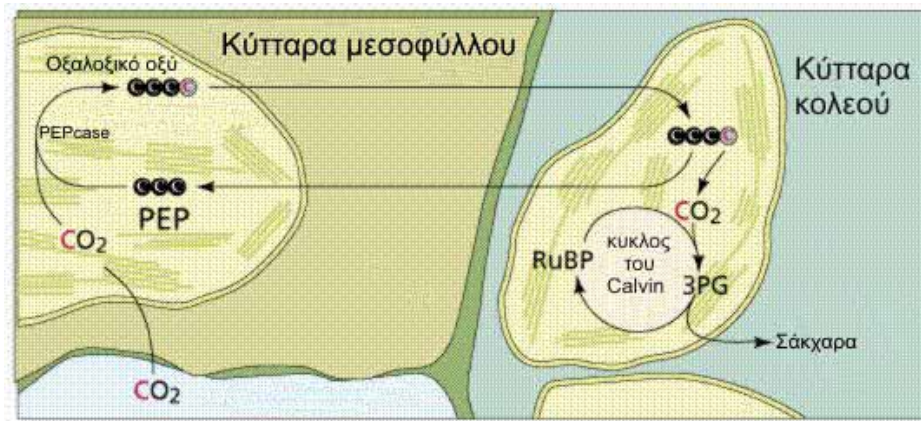
## *Εισαγωγή*

**α) την καρβοξυλίωση.** Στο στάδιο αυτό που λαμβάνει χώρα στο κυτόπλασμα των κυττάρων του μεσοφύλλου, το  $\text{CO}_2$  ενσωματώνεται στο μόριο δέκτη, το φωσφοροενολοπυροσταφυλικό οξύ (PEP), υπό μορφή μιας καρβοξυλομάδας. Σχηματίζεται έτσι ένα οξύ με 4 άτομα άνθρακα, το οξαλοξικό (OAA). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο-κλειδί της  $\text{C}_4$  οδού την καρβοξυλάση του φωσφοροενολοπυροσταφυλικού (PEPCase) [101,119].

**β) τη μεταφορά μεταβολιτών.** Το OAA μετατρέπεται, ανάλογα με το είδος του  $\text{C}_4$  φυτού, είτε σε μηλικό είτε σε ασπαραγινικό και μεταφέρεται μέσω των πλασμοδεσμών στα κύτταρα του κολεού [119]. Συνεπώς ενώσεις με τέσσερα άτομα άνθρακα ( $\text{C}_4$ ) μεταφέρουν  $\text{CO}_2$  (με τη μορφή καρβοξυλομάδων) από τα κύτταρα του μεσοφύλλου, στα οποία συμβαίνει η αρχική ενσωμάτωση του  $\text{CO}_2$ , στα κύτταρα του δεσμικού κολεού την αποκαρβοξυλίωση και επαναδέσμευση του  $\text{CO}_2$  στον κύκλο του Calvin [106]. Στα κύτταρα του κολεού το OAA αποκαρβοξυλιώνεται και έτσι απελευθερώνεται το  $\text{CO}_2$  και παράγεται πυροσταφυλικό. Τα κύτταρα του κολεού της δέσμης διαφοροποιούνται από τα κύτταρα του μεσοφύλλου και από βιοχημικής πλευράς αφού ως ένζυμο καρβοξυλίωσης διαθέτουν την Rubisco και όχι την PEPCase, ενώ ο κύκλος του Calvin σ' αυτά είναι ενεργός. Κατά συνέπεια το  $\text{CO}_2$  που απελευθερώνεται επαναδεσμεύεται με την βοήθεια της Rubisco και μεταβολίζεται μέσω της κλασσικής  $\text{C}_3$  οδού και του κύκλου του Calvin [101,119,129].

**γ) την αναγέννηση του δέκτη.** Το πυροσταφυλικό που απομένει μετά την αποκαρβοξυλίωση μέσω των πλασμοδεσμών επιστρέφει στα κύτταρα του μεσοφύλλου και μετατρέπεται σε PEP με κατανάλωση ATP ώστε ο αρχικός δέκτης να είναι εκ νέου διαθέσιμος [119].

## Εισαγωγή



Εικόνα I.1.3. Τα στάδια της αφομοίωσης του CO<sub>2</sub> διαμέσου της C<sub>4</sub> φωτοσυνθετικής οδού (τροποποίηση σχήματος από <http://ridge.icu.ac.jp/biobk/BioBookPS.html>).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η λειτουργία της C<sub>4</sub> οδού δεν αντικαθιστά τον κύκλο του Calvin, αντιθέτως τον διευκολύνει εξασφαλίζοντας υψηλότερες τοπικές συγκεντρώσεις CO<sub>2</sub> στα κύτταρα του κολεού αυξάνοντας την ταχύτητα της αντίδρασης καρβοξυλίωσης που καταλύει η Rubisco και η οποία λειτουργεί κυρίως ως καρβοξυλάση και όχι ως οξυγενάση. Παρά το γεγονός ότι παρουσιάζει αυξημένο ενεργειακό κόστος, έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό απωλειών άνθρακα μέσω της φωτοαναπνοής. Η αποτελεσματική αυτή δέσμευση του CO<sub>2</sub> οφείλεται στο ένζυμο PEPCase το οποίο παρουσιάζει δραστηριότητα μόνο καρβοξυλάσης και όχι οξυγενάσης ενώ ταυτόχρονα χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα τα δισανθρακικά ανιόντα και όχι το CO<sub>2</sub>. Λαμβάνοντας υπόψη ότι στο υδατικό περιβάλλον των κυττάρων η χημική ισορροπία κλίνει υπέρ των δισανθρακικών ανιόντων, η δέσμευσή τους είναι εφικτή ακόμα κι αν η συγκέντρωσή τους στο εσωτερικό του φύλλου είναι εξαιρετικά χαμηλή [101,108,119].

Για τους παραπάνω λόγους τα C<sub>4</sub> φυτά παρουσιάζουν ανταγωνιστικά πλεονεκτήματα, ιδιαίτερα σε περιβάλλοντα με υψηλές θερμοκρασίες, χαμηλή εδαφική υγρασία, έντονο φωτισμό και χαμηλές συγκεντρώσεις CO<sub>2</sub>. Εντούτοις τα C<sub>4</sub> φυτά είναι λιγότερο ανθεκτικά στις χαμηλές θερμοκρασίες έναντι των C<sub>3</sub>. Τα C<sub>4</sub> φυτά μπορούν να πετύχουν υψηλές φωτοσυνθετικές ταχύτητες λόγω της αποτελεσματικής δέσμευσης του CO<sub>2</sub> ακόμη και όταν τα στομάτια είναι μισόκλειστα, αποφεύγοντας έτσι απώλειες νερού [121,124] ενώ η

## ***Εισαγωγή***

φωτοσυνθετική τους ταχύτητα αυξάνεται συνεχώς ακόμη και σε πολύ υψηλές εντάσεις φωτισμού [119,124]. Τα χαρακτηριστικά αυτά εξηγούν την επικράτησή τους στην τροπική-υποτροπική ζώνη, την εξαιρετική ανθεκτικότητα και ταχύτερη ανάπτυξή τους. Αντίθετα, τα C<sub>3</sub> φυτά (λόγω της λειτουργίας της φωτοαναπνοής είναι πιο αποτελεσματικά σε θερμοκρασίες κάτω των 28 °C γι' αυτό και επικρατούν στις εύκρατες ζώνες [119].

### **1.2.3. Ο μεταβολισμός οξέων τύπου Crassulaceae (CAM)**

Η ονομασία του οφείλεται στο γεγονός ότι ο τρόπος αυτός δέσμευσης CO<sub>2</sub> παρατηρήθηκε αρχικά σε παχύφυτα, μέλη της οικογένειας Crassulaceae.

Τα φυτά που διαθέτουν το μεταβολισμό αυτό δεσμεύουν το CO<sub>2</sub> κατά τη διάρκεια της νύχτας, στη διάρκεια της οποίας τα στομάτια παραμένουν ανοικτά. Η αντίδραση αυτή καταλύεται όπως και στα C<sub>4</sub> φυτά από την PEPCase και ακολουθεί αναγωγή του σχηματιζόμενου οξαλοξικού οξέως σε μηλικό. Το μηλικό οξύ αποθηκεύεται στα χυμοτόπια και αποκαρβοξυλιώνεται στη διάρκεια της ημέρας, όταν τα στομάτια παραμένουν κλειστά. Με το μηχανισμό αυτό εξασφαλίζεται τεράστια οικονομία νερού [119,126,129].

Η C<sub>4</sub> οδός και ο μεταβολισμός τύπου Crassulaceae (CAM) χρησιμεύουν ουσιαστικά σαν αντλίες CO<sub>2</sub> για την μεταφορά του στα υποκυτταρικά διαμερίσματα όπου λειτουργεί ο κύκλος του Calvin και δρα η Rubisco με στόχο την αποτελεσματικότερη αφομοίωση του CO<sub>2</sub> και τον περιορισμό των απωλειών νερού [119].

### **1.3. Φωτοσυνθετική δραστηριότητα σε ιστούς εκτός των φύλλων**

Παρόλο που τα φύλλα αποτελούν τα κύρια φωτοσυνθετικά όργανα των φυτών, φωτοσυνθετική δραστηριότητα έχει παρατηρηθεί και σε άλλα όργανα όπως άνθη, καρπούς βλαστούς ακόμα και ρίζες [6,8,50]. Τα φύλλα, ορισμένοι βλαστοί και καρποί που διαθέτουν στομάτια χρησιμοποιούν για την λειτουργία της φωτοσύνθεσης ατμοσφαιρικό CO<sub>2</sub>. Αντίθετα σε όργανα τα οποία δεν διαθέτουν στομάτια (για παράδειγμα στο φλοιό πολυετών βλαστών, στους περισσότερους καρπούς και στις ρίζες) παρατηρείται ανακύκλωση CO<sub>2</sub> το οποίο προέρχεται από την λειτουργία της αναπνοής

## *Εισαγωγή*

[6,8,92,132]. Η ανακύκλωση του CO<sub>2</sub> μέσω της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας των οργάνων αυτών αποτελεί έναν αποτελεσματικό μηχανισμό μείωσης της περιεκτικότητάς τους σε CO<sub>2</sub> και παράλληλης αύξησης του O<sub>2</sub> στο εσωτερικό τους ώστε να μην επικρατούν συνθήκες υποξίας ή ανοξίας [6]. Παράλληλα εξοικονομούνται σκελετοί άνθρακα και επιτυγχάνεται μερική αυτονομία στο μεταβολισμό των υδατανθράκων [92,132]. Εκτός αυτού, υπάρχουν ενδείξεις για μεταφορά του αναπνευστικού CO<sub>2</sub> προς τα φύλλα και το βλαστό, μέσω των ξυλωδών αγγείων, προκειμένου να αφομοιωθεί μειώνοντας περαιτέρω τις απώλειες άνθρακα προς την ατμόσφαιρα [6,40,92,110].

### **1.4. Παράγοντες του περιβάλλοντος που επηρεάζουν την φωτοσύνθεση**

#### **1.4.1. Φωτεινή ακτινοβολία**

Τόσο η ποσότητα, όσο και η ποιότητα της φωτεινής ακτινοβολίας επηρεάζουν την φωτοσυνθετική δραστηριότητα. Η ποιότητα καθορίζεται από τη φασματική κατανομή της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και από την θέση των φύλλων (φύλλα σκιάς-φύλλα φωτός). Η ποσότητα (ένταση) της ακτινοβολίας μεταβάλλεται ανάλογα με την εποχή, το γεωγραφικό πλάτος, τις καιρικές συνθήκες (π.χ συννεφιά), τη θέση των φύλλων στην κόμη ενός δέντρου και την ύπαρξη υπερκείμενων φυτών [119]. Αυξανόμενης της έντασης της φωτεινής ακτινοβολίας η φωτοσυνθετική δραστηριότητα αυξάνει γραμμικά μέχρι μια ορισμένη τιμή, πέραν της οποίας κάμπτεται τείνοντας σε μία μέγιστη τιμή. Ο περιοριστικός παράγοντας για περαιτέρω αύξηση δεν είναι η ένταση της ακτινοβολίας αλλά η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> αφού επέρχεται κορεσμός στην ταχύτητα καρβοξυλίωσης της Rubisco και αυξάνεται η φωτοαναπνοή. Στα C<sub>4</sub> φυτά η φωτοσυνθετική ταχύτητα αυξάνεται ακόμη και σε υψηλές εντάσεις φωτισμού λόγω της απουσίας φωτοαναπνευστικής δραστηριότητας και του αποτελεσματικού μηχανισμού δέσμευσης του CO<sub>2</sub> από την ατμόσφαιρα [119,121,129].

### **1.4.2. Θερμοκρασία**

Η φωτοσυνθετική δραστηριότητα ως βιοχημική διαδικασία, αυξάνεται αυξανόμενης της θερμοκρασίας έως μία βέλτιστη περιοχή θερμοκρασιών η οποία για τα περισσότερα είδη των εύκρατων κλιμάτων κυμαίνεται μεταξύ 25–35 °C. Αύξηση της θερμοκρασίας πέραν των ορίων αυτών έχει ως αποτέλεσμα την πτώση της φωτοσυνθετικής ταχύτητας λόγω της αύξησης της αναπνοής και της φωτοαναπνοής, του κλεισίματος των στοματιών και της δυσλειτουργίας που παρατηρείται στα φωτοσυστήματα των θυλακοειδών των χλωροπλαστών. Η καμπύλη της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας συναρτησει της θερμοκρασίας εμφανίζεται κωδονοειδής. Η περιοχή βέλτιστων θερμοκρασιών των C<sub>4</sub> φυτών παρουσιάζει κατά κανόνα υψηλότερες τιμές σε σχέση με αυτήν των C<sub>3</sub> φυτών, αφού τα C<sub>4</sub> δεν παρουσιάζουν φωτοαναπνοή και δεσμεύουν αποτελεσματικά το CO<sub>2</sub> ακόμη και όταν τα στομάτια είναι μισόκλειστα [62,119].

### **1.4.3. Ανεπάρκεια νερού**

Η ανεπάρκεια νερού επηρεάζει την φωτοσύνθεση αφού στις συνθήκες αυτές τα στομάτια κλείνουν παρεμποδίζοντας έτσι την ανταλλαγή αερίων και την δέσμευση CO<sub>2</sub> από τα φωτοσυνθετικά κύτταρα. Παράλληλα η επικράτηση χαμηλού δυναμικού του νερού στον πρωτοπλάστη επηρεάζει την λειτουργική ακεραιότητα της φωτοσυνθετικής συσκευής. Τα C<sub>4</sub> φυτά, αλλά κυρίως τα CAM, παρουσιάζουν πλεονέκτημα έναντι των C<sub>3</sub> όσον αφορά τις υδατικές σχέσεις, λόγω των ιδιαίτερων ανατομικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών τους [119,124].

### **1.4.4. Διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>)**

Όπως είναι γνωστό η περιεκτικότητα του ατμοσφαιρικού αέρα σε CO<sub>2</sub> ανέρχεται σε 0,0036 % (360 ppm). Το CO<sub>2</sub> αποτελεί το υπόστρωμα για τις βιοχημικές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης και η συγκέντρωσή του στο περιβάλλον των φυτών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Έχει βρεθεί ότι όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα του αέρα σε CO<sub>2</sub>, τόσο πιο έντονη είναι η φωτοσυνθετική δραστηριότητα για μια συγκεκριμένη ένταση φωτισμού

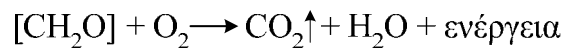
## *Εισαγωγή*

[119,126]. Δεδομένης της χαμηλής συγκέντρωσης του CO<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα, σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού, το CO<sub>2</sub> αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα για τη φωτοσύνθεση, κυρίως των C<sub>3</sub> φυτών. Σε υψηλές εντάσεις φωτισμού (στην περιοχή κορεσμού) η φωτοσυνθετική ταχύτητα αυξάνεται αυξανομένης της συγκέντρωσης του CO<sub>2</sub> στο περιβάλλον του φύλλου έως ένα όριο στο οποίο επέρχεται κορεσμός. Στα περισσότερα C<sub>3</sub> φυτά ο κορεσμός της φωτοσυνθετικής συσκευής επέρχεται σε συγκεντρώσεις κατά πολύ υψηλότερες της ατμοσφαιρικής και εξαρτάται από την ένταση της φωτοαναπνοής. Από την άλλη πλευρά όταν η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> πάρει χαμηλές τιμές, τότε το καθαρό ισοζύγιο στις ανταλλαγές O<sub>2</sub> ή CO<sub>2</sub> μηδενίζεται, δηλ. η φωτοσυνθετική δραστηριότητα αντισταθμίζεται από την αναπνευστική δραστηριότητα και τη δραστηριότητα της φωτοαναπνοής. Στην κατάσταση αυτή έχει επιτευχθεί το σημείο αντιστάθμισης CO<sub>2</sub>. Το σημείο αντιστάθμισης CO<sub>2</sub> για τα περισσότερα C<sub>3</sub> φυτά κυμαίνεται μεταξύ 25 και 100 ppm CO<sub>2</sub>. Αντίθετα, για τα περισσότερα C<sub>4</sub> φυτά το σημείο αντιστάθμισης CO<sub>2</sub> παίρνει συνήθως πολύ χαμηλές έως μηδενικές τιμές. Το γεγονός οφείλεται στο ότι στα C<sub>4</sub> φυτά δεν παρατηρείται συνήθως φωτοαναπνευστική δραστηριότητα. Ο κορεσμός της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας στα φυτά αυτά επέρχεται σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις CO<sub>2</sub> επειδή λειτουργεί ο μηχανισμός άντλησης CO<sub>2</sub> προς τα σημεία όπου λειτουργεί η Rubisco και επομένως εκμεταλλεύονται αποτελεσματικότερα τις χαμηλές συγκεντρώσεις CO<sub>2</sub>. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η ατμοσφαιρική συγκέντρωση CO<sub>2</sub> (360 ppm), δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για τη φωτοσύνθεση των C<sub>4</sub> φυτών, αντίθετα με τα C<sub>3</sub> φυτά [119,121,129].

## **I.2. Αναπνοή**

*Αναπνοή* ονομάζεται η διεργασία της σταδιακής και ελεγχόμενης οξείδωσης οργανικών μορίων προς νερό με ταυτόχρονη παραγωγή ATP, αναγωγικών ισοδυνάμων και δομικών βιομορίων, που απαιτούνται για όλες τις φυσιολογικές και βιοχημικές λειτουργίες των κυττάρων [129].

Συνοπτικά, η αναπνοή μπορεί να αναπαρασταθεί με την εξίσωση:



Η αναπνοή και η φωτοσύνθεση αποτελούν δύο "αντίστροφες" λειτουργίες που επιτελούνται ταυτόχρονα στα φυτικά όργανα, αφού τα φυτά είναι αερόβιοι οργανισμοί. Όταν η ταχύτητα της φωτοσύνθεσης υπερβαίνει τις ανάγκες των φωτοσυνθετικών κυττάρων σε άνθρακα και ενέργεια, η περίσσεια αποθηκεύεται ως άμυλο ή μεταφέρεται ως σακχαρόζη στις ετερότροφες περιοχές του φυτού, ή σε αυτότροφες των οποίων η φωτοσύνθεση δεν επαρκεί για να καλύψει τις αυξημένες ανάγκες τους (π.χ. νεαρά φύλλα). Ακόμη και ένα πλήρως ανεπτυγμένο, φωτοσυνθετικά ενεργό φύλλο, κατά τη διάρκεια της νύκτας μετατρέπεται σε ετερότροφο. Η ανάπτυξη και η συντήρηση των ετερότροφων περιοχών καθώς και των αυτότροφων κατά τη διάρκεια της νύκτας, στηρίζεται στην αναπνοή, δηλαδή στην ανάκτηση του άνθρακα και της ενέργειας που είναι αποθηκευμένη στο άμυλο και στη σακχαρόζη [128,129].

Σε βιοχημικό επίπεδο, η αναπνοή επιτελείται σε τρία στάδια [124,128]:

- α) Γλυκόλυση
- β) Κύκλος του Krebs
- γ) Οξειδωτική φωσφορυλίωση.

Συνοπτικά κατά το στάδιο της γλυκόλυσης η γλυκόζη οξειδώνεται τελικά προς πυροσταφυλικό οξύ, στον κύκλο του Krebs πραγματοποιείται η τελική οξείδωση του πυροσταφυλικού προς CO<sub>2</sub> και η παραγωγή ενώσεων υψηλού ενεργειακού περιεχομένου NADH, FADH ενώ τέλος κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση οι ενώσεις αυτές οξειδώνονται αποδίδοντας ενέργεια η οποία χρησιμοποιείται για την παραγωγή ATP [124,129].



### **I.3. Διαπνοή**

Ο μηχανισμός απώλειας, ενός σημαντικού ποσοστού (95% ή και περισσότερο), του νερού που μεταφέρεται από τη ρίζα στα υπέργεια φυτικά όργανα με τη μορφή υδρατμών μέσω των στοματίων χαρακτηρίζεται ως *διαπνοή* [119].

Η διαπνοή επιταχύνει την κίνηση του ανιόντος χυμού του ξύλου και σε περίπτωση μη αναπλήρωσης των απωλειών (λόγω ανεπάρκειας του εδαφικού νερού) είναι δυνατόν να προκαλέσει έλλειμμα νερού και μαρασμό των υπέργειων φυτικών οργάνων [124]. Μέσω όμως της διεργασίας αυτής εκτελούνται δύο ζωτικής σημασίας λειτουργίες [119,129]:

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

**β)** Δημιουργία διαπνευστικού ρεύματος, δηλαδή μιας συνεχής ροής νερού δια μέσου των αγγείων του ξύλου με κατεύθυνση από τη ρίζα προς τα φύλλα που έχει ως αποτέλεσμα τη συνεχή αναπλήρωση του διαπνεόμενου νερού από το έδαφος. Η ύπαρξη του ρεύματος αυτού είναι αναγκαία γιατί τροφοδοτεί τα υπέργεια όργανα με τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία τα οποία συμπαρασύρονται από το διακινούμενο νερό.

Τα στομάτια εκτός από πύλες εξόδου των υδρατμών, αποτελούν και πύλες εισόδου του CO<sub>2</sub> προς τα φωτοσυνθετικά κύτταρα, τα οποία παρέχουν οργανικό άνθρακα και ενέργεια προς το σύνολο του φυτικού οργανισμού. Ανοικτά στομάτια σημαίνει φωτοσύνθεση και ανάπτυξη, αλλά συγχρόνως και κίνδυνο αφυδάτωσης. Αντίθετα με κλειστά τα στομάτια διαφυλάσσονται τα αποθέματα νερού αλλά συγχρόνως περιορίζεται η φωτοσύνθεση. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να υπάρχει ένα ρυθμιστικός μηχανισμός που να συμβιβάζει επιτυχώς τις δύο αυτές αντίρροπες λειτουργίες. Το εύρος του στοματικού

## *Εισαγωγή*

πόρου αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα ρύθμισης των ανταλλαγών των αερίων και βεβαίως των απωλειών νερού από τα φύλλα. Ο έλεγχος των στοματικών κινήσεων διασφαλίζει την βελτιστοποίηση της φωτοσυνθετικής λειτουργίας με τις ελάχιστες δυνατές απώλειες σε νερό. Όταν τα φυτά υφίστανται υδατική καταπόνηση τότε προέχει η επιβίωση, δηλαδή η αποφυγή της αφυδάτωσης, και τα στόματα παραμένουν κλειστά έστω και αν οι υπόλοιποι περιβαλλοντικοί παράγοντες ευνοούν τη φωτοσύνθεση [119,129].

Οι παράγοντες του περιβάλλοντος που επηρεάζουν το μηχανισμό ρύθμισης του εύρους του στοματικού πόρου εν συντομία είναι οι εξής [119]:

**α) Ενταση φωτεινής ακτινοβολίας:** Στα περισσότερα φυτά (τόσο  $C_3$  όσο και  $C_4$ ), τα στομάτια ανοίγουν την ημέρα και κλείνουν τη νύχτα. Στα φυτά CAM συμβαίνει το αντίθετο.

**β) Συγκέντρωση  $CO_2$ :** Η επικράτηση χαμηλών συγκεντρώσεων  $CO_2$  στο εσωτερικό ενός φύλλου προκαλεί άνοιγμα των στοματιών, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις  $CO_2$  προκαλούν το κλείσιμο. Με τη ρύθμιση αυτή επιτυγχάνεται ο συντονισμός της φωτοσυνθετικής λειτουργίας με το μηχανισμό των κινήσεων των καταφρακτικών κυττάρων.

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

**δ) Επάρκεια νερού στο έδαφος:** Η διαμόρφωση χαμηλού δυναμικού του νερού στο έδαφος επηρεάζει αρνητικά την τροφοδοσία των υπέργειων οργάνων με νερό. Εάν δεν ελεγχθούν οι διαπνευστικές απώλειες, υπάρχει κίνδυνος να χάσουν τη σπαργή τους τα κύτταρα ή να δημιουργηθούν ασυνέχειες στη στήλη του νερού στα αγγεία του ξύλου. Συνεπώς σε συνθήκες έλλειψης νερού στο έδαφος επιβάλλεται το όσο το δυνατό ταχύτερο κλείσιμο των στοματιών ώστε να περιοριστούν στο ελάχιστο οι απώλειες νερού το οποίο δεν μπορεί να αναπληρωθεί μέσω του διαπνευστικού ρεύματος με τροφοδοσία από τη ρίζα.

## *Εισαγωγή*

ε) **Θερμοκρασία:** Αύξηση της θερμοκρασίας επιφέρει και αύξηση της διαφοράς των μερικών πιέσεων των υδρατμών ανάμεσα στο εσωτερικό του φύλλου και στην ελεύθερη ατμόσφαιρα. Όταν π.χ. η θερμοκρασία του αέρα αυξάνεται, συμπαρασύρεται και αυτή των φύλλων. Επειδή στο εσωτερικό των φύλλων η ατμόσφαιρα διατηρείται πάντα κορεσμένη σε υδρατμούς, η δε πίεση κορεσμού αυξάνεται με τη θερμοκρασία, έπεται ότι αυξάνεται και η διαφορά των μερικών πιέσεων, οπότε τα στόματα τείνουν να κλείσουν [125].

#### Ι.4. Τα σταθερά ισότοπα άνθρακα και η συμβολή τους στη μελέτη της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας των φυτών

Στη φύση απαντώνται δύο σταθερά, μη ραδιενεργά, ισότοπα του C, το  $^{12}\text{C}$  και το  $^{13}\text{C}$ . Στο 0,0036% του ατμοσφαιρικού  $\text{CO}_2$  το 98,9 % αποτελείται από το πλεονάζον  $^{12}\text{C}$ , ενώ μόλις το 1,1 % αποτελείται από το βαρύτερο ισότοπο  $^{13}\text{C}$ . Συνεπώς τα φυτά κατά τη λειτουργία της φωτοσύνθεσης προσλαμβάνουν εκτός από  $^{12}\text{CO}_2$  και  $^{13}\text{CO}_2$ . Η σύσταση οργανικών δειγμάτων σε  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$ , carbon isotope composition) δίδεται από την ακόλουθη σχέση [11,62,87,116]:

$$\delta^{13}\text{C} \text{ ‰} = \left[ \left( \frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}}{\text{άγν. δειγμ.}} / \left( \frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}}{\text{PDB}} \right) - 1 \right] * 1000$$

$$\text{όπου } \left( \frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}}{\text{PDB}} \right) = 0.0112371 \text{ [13]}$$

και PDB = Pee Dee Belemnite (*Belemnitella americana*). Πρόκειται για δείγμα αναφοράς που προέρχεται από ιζηματογενή σχηματισμό στη Νότια Καρολίνα των Η.Π.Α. Η αναλογία  $(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}}$  χρησιμοποιείται ως σταθερά, βάση της οποίας υπολογίζεται η σύσταση οποιουδήποτε εξεταζόμενου δείγματος στο σταθερό ισότοπο  $^{13}\text{C}$ . Η αναλογία  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  του δείγματος μετριέται με τη βοήθεια φασματομέτρου μάζας αναλογίας ισοτόπων (Isotope Ratio Mass Spectrometer, IRMS) [25,87].

Σύμφωνα με τις παραπάνω προδιαγραφές, το  $\delta^{13}\text{C}$  του ατμοσφαιρικού  $\text{CO}_2$  υπολογίζεται σε -8 ‰. Ακόμη, η σύσταση των  $\text{C}_3$  φυτών σε  $^{13}\text{C}$  κυμαίνεται μεταξύ -(25-30) ‰, των  $\text{C}_4$  φυτών μεταξύ -(12-15) ‰ και των CAM φυτών μεταξύ -(12-28) ‰ [11,20,21,62]. Το αρνητικό πρόσημο των παραπάνω τιμών υποδηλώνει ότι τόσο το  $\text{CO}_2$  του ατμοσφαιρικού αέρα όσο και οι φυτικοί ιστοί είναι ελλειμματικοί σε  $^{13}\text{C}$  εν συγκρίσει με το δείγμα αναφοράς PDB [62,87].

Η διαφορά στο  $\delta^{13}\text{C}$  μεταξύ της ατμόσφαιρας και της φυτικής βιομάζας οφείλεται στο γεγονός ότι το  $^{13}\text{CO}_2$  λόγω του βαρύτερου ισότοπου άνθρακα το οποίο φέρει διαθέτει διαφορετικές θερμοδυναμικές και κινητικές ιδιότητες έναντι του  $^{12}\text{CO}_2$  [11,18,36]. Κατά συνέπεια η διάχυση του  $^{13}\text{CO}_2$  στους

## Εισαγωγή

μεσοκυττάρους χώρους είναι δυσχερέστερη σε σχέση με το  $^{12}\text{CO}_2$ . Επίσης, η παραπάνω διαφορά σχετίζεται με τη διάκριση εις βάρος του  $^{13}\text{C}$  ( $\Delta^{13}\text{C}$ , Discrimination) που παρατηρείται στη φάση της καρβοξυλίωσης, κατά τη φωτοσύνθεση από τα ένζυμα Rubisco και PEPCase στα  $\text{C}_3$  και  $\text{C}_4$  φυτά. Τόσο η Rubisco, όσο και η PEPCase παρουσιάζουν υψηλότερη συγγένεια προς το  $^{12}\text{C}$  ισότοπο, συνεπώς αφομοιώνουν ευχερέστερα το  $^{12}\text{CO}_2$  έναντι του  $^{13}\text{CO}_2$ . [11,21]. Ως αποτέλεσμα οι φυτικοί ιστοί στους οποίους ενσωματώνονται τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης είναι εμπλουτισμένοι σε  $^{12}\text{C}$ , σε σύγκριση με τον ατμοσφαιρικό αέρα [20,21,62]. Η διάκριση αυτή παρουσιάζεται πολύ εντονότερη στα  $\text{C}_3$  από ότι στα  $\text{C}_4$  φυτά, λόγω της υψηλότερης  $\Delta^{13}\text{C}$  από την οποία χαρακτηρίζεται η Rubisco (29 ‰) σε σύγκριση με την PEPCase (5,7 ‰). Επίσης, η συσσώρευση  $\text{CO}_2$  στα κότταρα του μεσοφύλλου ευνοεί την αφομοίωση του  $^{13}\text{CO}_2$  στα  $\text{C}_4$  φυτά [11,20,21]. Τα παραπάνω εξηγούν και τις μικρότερες (περισσότερο αρνητικές) τιμές  $\delta^{13}\text{C}$  των  $\text{C}_3$  φυτών σε σχέση με αυτές των  $\text{C}_4$  φυτών.

Λόγω της διαφορετικής συμπεριφοράς των δύο σταθερών ισotόπων του C κατά τη φωτοσύνθεση, η σύσταση φυτικών ιστών στο  $^{13}\text{C}$  ισότοπο ( $\delta^{13}\text{C}$ ) αποτελεί δείκτη που παρέχει πολυποίκιλες πληροφορίες σχετικά με τη φυσιολογία και οικοφυσιολογία των φυτών, από επίπεδο κυττάρου έως και ολόκληρου οικοσυστήματος [1,21,25]. Μέσω μαθηματικών τύπων στους οποίους εμπλέκεται και η τιμή  $\delta^{13}\text{C}$  μπορούν να εξαχθούν σημαντικές πληροφορίες για την φυσιολογική κατάσταση ιστών και οργάνων. Ένα τέτοιος τύπος έχει περιγραφεί από τους Farquhar et al (1989):

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{φυτού}} \text{‰} = \delta^{13}\text{C}_{\text{ατμ}} - a - (b-a) C_i/C_a$$

όπου:  $a$  είναι η διάκριση εις βάρος του ισotόπου  $^{13}\text{C}$  κατά τη διάχυση του ατμοσφαιρικού  $\text{CO}_2$  διαμέσου των στοματιών ( $\Delta = 4,4 \text{‰}$ )

$b$  είναι η διάκριση κατά τη διάρκεια της καρβοξυλίωσης από την RUBisco ( $\Delta = 29 \text{‰}$ )

$C_i$  είναι η συγκέντρωση του  $\text{CO}_2$  στους εσωκυττάρους χώρους

$C_a$  είναι η συγκέντρωση του ατμοσφαιρικού  $\text{CO}_2$

## *Εισαγωγή*

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι όσο ο παράγοντας  $C_i$  μειώνεται (όταν τα στομάτια παραμένουν κλειστά λόγω υδατικής καταπόνησης ή υψηλών θερμοκρασιών) τόσο το  $\delta^{13}C$  αυξάνεται, γίνεται δηλαδή λιγότερο αρνητικό [25,55]. Στη σχέση αυτή βασίζεται και η χρησιμότητα του  $\delta^{13}C$  ως δείκτη της υδατικής κατάστασης των φυτών, γεγονός το οποίο ενισχύεται από τη συσχέτιση που έχει βρεθεί μεταξύ του υδατικού δυναμικού και του  $\delta^{13}C$  φύλλων, φλοιώματος, ξύλου, ακόμη και μεμονωμένων μεταβολιτών (π.χ.σακχάρα) σε αρκετά είδη [1,15,24,32,34,35,49]. Στο ίδιο πλαίσιο, πολλές μελέτες αναφέρουν επίσης συσχέτιση μεταξύ  $\delta^{13}C$  και αποτελεσματικότητας χρήσης νερού (Water Use Efficiency, WUE) [1,116]. Στην τεκμηριωμένη πλέον αυτή σχέση μεταξύ  $\delta^{13}C$  και του υδατικού ισοζυγίου βασίζεται και η χρησιμοποίηση του  $\delta^{13}C$  για την έμμεση αποτίμηση της αντίδρασης ενός φυτού στις εποχιακές και στις κλιματικές αλλαγές [25,55,68].

Σε πολλές περιπτώσεις οι μεταβολές του  $\delta^{13}C$  φυτικών ιστών σχετίζονται με ορισμένες περιβαλλοντικές παραμέτρους, όπως η ηλιακή ακτινοβολία [1,25], η επάρκεια σε θρεπτικά συστατικά [1], το υψόμετρο [114], καθώς με τα ιδιαίτερα ανατομικά χαρακτηριστικά των φυτών [11]. Εκτός αυτού, έχουν αναφερθεί διαφορές στη φυσική σύσταση  $\delta^{13}C$  μεταξύ μεταβολιτών [34], όπως επίσης και μεταξύ οργάνων του ίδιου φυτού [25]. Οι διαφορές  $\delta^{13}C$  μεταξύ φυτικών οργάνων φαίνεται ότι οφείλονται σε παράγοντες όπως η μεταφορά μεταβολιτών μέσω του ηθμού και πιθανώς η διάκριση  $\Delta^{13}C$  κατά την αναπνοή, η οποία ενδέχεται να ποικίλει μεταξύ των επιμέρους οργάνων [35]. Σε αντιδιαστολή με την παλαιότερη πεποίθηση ότι δεν παρατηρείται διάκριση  $\Delta^{13}C$  κατά τη νυχτερινή αναπνοή και τη φωτοαναπνοή και επομένως το  $\delta^{13}C$  του  $CO_2$  που αποβάλλεται από το φυτό είναι παρόμοιο σε ισοτοπική σύσταση με αυτό της βιομάζας [67], νεότερες μελέτες υποστηρίζουν το αντίθετο. Παρά τις διαφορές, ανάλογα με τον μεταβολίτη που χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την αναπνοή, το  $CO_2$  που αποβάλλεται κατά την αναπνοή είναι εμπλουτισμένο κατά κανόνα σε  $^{13}C$ , εν συγκρίσει με το υπόστρωμα της αναπνοής ή την βιομάζα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του  $\delta^{13}C$  των φύλλων προς περισσότερο αρνητικές τιμές [15,35,36,117].

## **I.5. Τα κυτταρικά έγκλειστα**

Ο όρος "κυτταρικά έγκλειστα" αναφέρεται συνήθως σε εναποθέσεις στερεών συστατικών, κυρίως αλάτων, σε εξειδικευμένα κύτταρα. Οι ανόργανες και οργανικές εναποθέσεις αλάτων στα φυτά αυτά ταξινομούνται σε τρεις κύριες κατηγορίες [5,19,27,80,81]:

1. Κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου.
2. Άμορφο ανθρακικό ασβέστιο (κυστόλιθοι).
3. Άμορφες εναποθέσεις πυριτίου (φυτόλιθοι).

### **5.1. Κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου.**

Με τον όρο "κρύσταλλοι" περιγράφονται εναποθέσεις αλάτων (κυρίως οξαλικού ασβεστίου) σε κρυσταλλική μορφή. Κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου ( $\text{CaOx}$ ) παρατηρούνται σε πολυάριθμα μέλη των πέντε βασιλείων από τα φύκη έως τα γυμνόσπερμα και τα αγγειόσπερμα [29,83]. Παρατηρήθηκαν και περιγράφηκαν για πρώτη φορά τον 17<sup>ο</sup> αιώνα από τον Leeuwenhoeek με ένα απλό οπτικό μικροσκόπιο και προσέλκυσαν το ενδιαφέρον των ανατόμων για πολλά χρόνια [29,83 και η συναφής βιβλιογραφία που αναφέρεται στα άρθρα αυτά]. Κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου εμφανίζονται ως ένδο- ή εξωκυτταρικές εναποθέσεις σε φυτικά όργανα η ιστούς σε περισσότερες από 250 οικογένειες φυτών [29,42,85]. Τα είδη που σχηματίζουν κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται και πολλά καλλιεργούμενα είδη, συσσωρεύουν οξαλικό σε ποσοστό 3%-80% (w/w) του ξηρού τους βάρους [66,75]. Η ποσότητα Ca που εναποτίθεται στους κρυστάλλους μπορεί να φθάσει και το 90% του συνολικού Ca του φυτού [66,29 και συναφής βιβλιογραφία]. Το οξαλικό ασβέστιο απαντάται ως μονοϋδρικό ( $\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4)\cdot\text{H}_2\text{O}$ ) ή σπανιότερα ως διϋδρικό άλας ( $\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4)\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) [4,80,91,122]. Οι κρύσταλλοι σχηματίζονται από οξαλικό οξύ που συντίθεται εντός των κυττάρων και Ca που προσλαμβάνει το φυτό από το εξωτερικό περιβάλλον [29] και θεωρούνται ως τελικά προϊόντα του μεταβολισμού [29, 38,83,118]. Νεότερες πληροφορίες αναφέρουν ότι η βιοσύνθεση του οξαλικού

## Εισαγωγή

ελέγχεται μέσω της συγκέντρωσης του ασβεστίου και ο σχηματισμός του κρυστάλλου δεν αποτελεί το τελικό προϊόν μιας διαδικασίας διαχείρισης οξαλικού οξέως [29].

Ο σχηματισμός ενός κρυστάλλου εξαρτάται από μια σειρά παράγοντες όπως την γενική θρεπτική κατάσταση του φυτικού ιστού, την επάρκεια σε ασβέστιο, τα διαθέσιμα νιτρικά [2,80,90], την ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας και τη θερμοκρασία [27]. Ο σχηματισμός των κρυστάλλων του οξαλικού ασβεστίου συνήθως λαμβάνει χώρα στο χυμοτόπιο παρεγχυματικών κύτταρων της εντεριώνης, του φλοιού και του δευτερογενούς ηθμού καθώς και σε κυτταρικά τοιχώματα [80]. Σε ορισμένες περιπτώσεις αναφέρεται η κρυστάλλωσή τους και στο κυτόπλασμα [122]. Κρύσταλλοι ωστόσο παρατηρούνται σε όλα σχεδόν τα όργανα και τους ιστούς [80]. Ένα ακόμη σημαντικό χαρακτηριστικό αποτελεί ο τρόπος εξάπλωσης των κρυστάλλων στα επί μέρους όργανα. Τα κύτταρα-ιδιοβλάστες δεν κατανέμονται τυχαία στο φυτικό σώμα, αλλά συνήθως σε εντοπισμένους ιστούς όπως η επιδερμίδα και οι προεκτάσεις των δεσμικών κολεών.

Στα δικότυλα φυτά κρύσταλλοι μπορεί να σχηματιστούν:

1. Σε **τριχες** που διαδραματίζουν αμυντικό ρόλο π.χ στα γένη *Fagraea* και *Strychnos* της οικ. Loganiaceae και στο είδος *Tragia ramosa* [29,80,109].
2. Στην **επιδερμίδα** [80].
3. Στο χυμοτόπιο εξειδικευμένων κυττάρων τα οποία καλούνται **ιδιοβλάστες** [27,38,42,80]. Ιδιόβλαστα κύτταρα αυτού του τύπου εξαπλώνονται σε διαφορετικά μέρη του φυτού. Στα φύλλα οι ιδιοβλάστες αυτοί εντοπίζονται συνήθως στην περιοχή του μεσόφυλλου ενώ η παρουσία τους είναι συχνότερη στην περιοχή των δεσμικών κολεών ή των προεκτάσεών τους στην περιοχή της ηθμαγγειώδους δεσμίδας [29,80,118].
4. Στα **κυτταρικά τοιχώματα**. Η εναπόθεση των κρυστάλλων στο κυτταρικό τοίχωμα είναι ιδιαίτερα συχνή στα γυμνόσπερμα [27,42,43] και πραγματοποιείται σε όλα σχεδόν τα κύτταρα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα



εναπόθεσης κρυστάλλων στα κυτταρικά τοιχώματα κυττάρων αγγειοσπέρμων αποτελεί ο σχηματισμός αστροσκληριδίων [4,29,42,60]. Εναποθέσεις κρυστάλλων στο ΚΤ απαντώνται και σε ορισμένα είδη μυκήτων και λειχήνων [29].

### **5.1.1. Σχηματισμός κρυστάλλων σε ιδιοβλαστα κύτταρα.**

Η λειτουργία των κυττάρων αυτών παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον, αφού διακινούν και συσσωρεύουν μεγάλα ποσά ασβεστίου. Οι περισσότεροι ιδιοβλάστες παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση σε μεγάλο βαθμό ενώ διαθέτουν χαρακτηριστικά τα οποία δεν απαντώνται σε άλλους τύπους κυττάρων [27,29]. Οι ιδιοβλάστες αυτοί μπορεί να είναι μορφολογικά όμοιοι με τα γειτονικά τους κύτταρα τα οποία δε φέρουν κρυστάλλους ή να διαθέτουν χαρακτηριστική μορφή [27,38,80].

#### **5.1.1.1. Χαρακτηριστικά των ιδιοβλαστών.**

Στους ιδιοβλάστες παρατηρείται πυκνό κυτόπλασμα με άφθονο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΝΠΔ), πολυάριθμα στοιχεία golgi, μιτοχόνδρια και μικροσωληνίσκοι [29]. Το άφθονο ΕΝΠΔ (όπως και τα μιτοχόνδρια και τα στοιχεία golgi) αφενός μεν σχετίζεται με την υψηλή μεταβολική δραστηριότητα [27,29,57] και την ταχεία ανάπτυξη του κυττάρου, αφετέρου παίζει ρυθμιστικό ρόλο στη συσσώρευση του ασβεστίου στο κυτόπλασμα του ιδιοβλάστη μέσω ορισμένων πρωτεϊνών όπως η καρλετικούλίνη [84]. Η εκτεταμένη ενεργός και λειτουργική επιφάνεια του ΕΝΠΔ για πρόσληψη ασβεστίου από το κυτόπλασμα και ο εμπλουτισμός του σε καρλετικούλίνη, αυξάνει την ρυθμιστική ικανότητα ταχείας ανταλλαγής ασβεστίου. Η καρλετικούλίνη είναι πρωτεΐνη με υψηλή ικανότητα δέσμευσης ιόντων ασβεστίου και απαντάται στο lumen του ΕΝΠΔ. Τόσο η δραστηριότητα της πρωτεΐνης αυτής όσο [84], όσο και τα ιόντα ασβέστιου [57,78] εντοπίζονται σε εξειδικευμένα τμήματα του ΕΝΠΔ.

Ένα άλλο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των ιδιοβλαστών αποτελεί η παρουσία μεμβρανών εντός του χυμοτοπίου οι οποίες είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με το σχηματισμό των κρυστάλλων [4,91,93,115]. Οι μεμβράνες

## *Εισαγωγή*

αυτές δημιουργούν ένα θάλαμο στο χυμοτόπιο ενώ σχηματίζονται de novo και δεν είναι διαπλάσεις του τονοπλάστη [78,112]. Εντός του θαλάμου αυτού λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός του κρυστάλλου. Η φύση των μεμβρανών αυτών δεν έχει προσδιοριστεί. Επειδή οι μεμβράνες καθορίζουν τον χώρο σχηματισμού του κρυστάλλου, θεωρείται πιθανόν ότι ελέγχουν την μεταφορά του ασβεστίου και του οξαλικού οξέως από το χυμοτόπιο στο θάλαμο και τελικώς τη μορφή και το μέγεθος του κρυστάλλου [29 και συναφής βιβλιογραφία] Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων μεταφέρεται το οξαλικό οξύ και το ασβέστιο εντός του θαλάμου δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί, ωστόσο τόσο η μαζική μεταφορά, όσο και η λειτουργία μεταφορέων και καναλιών που εντοπίζονται στην μεμβράνη θεωρούνται πιθανοί. Υπάρχουν ενδείξεις για την παρουσία εντός του θαλάμου σχηματισμού θεμελιώδους μάζας η οποία απαρτίζεται από μη-κρυσταλλικές ενώσεις [4,5,9,29,112,115] οι οποίες παίρνουν μέρος στο σχηματισμό των κρυστάλλων [65,115]. Ένα ποσοστό της θεμελιώδους μάζας απαρτίζεται από πρωτεΐνες, εκ των οποίων μέχρι στιγμής έχει απομονωθεί μόνο μία [65].

Στους περισσότερους ιδιοβλάστες έχει παρατηρηθεί και η παρουσία πλαστιδίων τα οποία ενδεχομένως δεν είναι φωτοσυνθετικά ενεργά αφού δεν διαθέτουν grana, θυλακοειδή και δεν περιέχουν Rubisco [64]. Τα πλαστίδια αυτά αναφέρονται ως κρυσταλλοπλαστίδια [5] και πιθανός ρόλος τους είναι η βιοσύνθεση λιπιδίων. Θεωρείται πιθανόν να είναι υποκυτταρικός χώρος στο οποίο γίνεται η βιοσύνθεση του οξαλικού από ασκορβικό αφού έχει παρατηρηθεί άφθονη παρουσία των πλαστιδίων αυτών σε ιδιοβλάστες των οποίων το ασκορβικό αποτελεί το πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση του οξαλικού [29].

Στους περισσότερους ιδιοβλάστες η αύξηση του κυττάρου λαμβάνει χώρα ταυτόχρονα με τον σχηματισμό των κρυστάλλων. Οι δύο αυτές διαδικασίες είναι στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους αφού διαφορετικές μορφές κρυστάλλων απαιτούν και διαφορετικά σχήματα κυττάρων [29]. Η αύξηση του κυττάρου, ο σχηματισμός του οξαλικού, η συσσώρευση ασβεστίου και ο

## ***Εισαγωγή***

σχηματισμός του κρυστάλλου αποτελούν απόλυτα συγχρονισμένες διαδικασίες. Η μορφολογία των κρυστάλλων είναι πιθανόν να ελέγχεται από μηχανισμούς που εντοπίζονται στο χυμοτόπιο, ενώ λειτουργούν και μηχανισμοί ελέγχου της αύξησης και της επιμήκυνσης του κύτταρου ταυτόχρονα με την αύξηση του κρυστάλλου [56]. Έχει διαπιστωθεί ότι η αύξηση του κρυστάλλου σταματά οόταν οι ιδιοβλάστες αποκτήσουν ένα συγκεκριμένο μέγεθος. Σε διαφορετική περίπτωση η αύξηση του μεγέθους των κρυστάλλων θα ήταν ανεξέλεγκτη με αποτέλεσμα την ρήξη του τονοπλάστη και το θάνατο του ιδιοβλάστη [29]. Όπως αναμένεται οι ιδιοβλάστες έχουν εξαιρετική ικανότητα πρόσληψης ασβεστίου σε σχέση με τα γειτονικά κύτταρα [111]. Υπάρχουν βάσιμες ενδείξεις ότι τα ιόντα ασβεστίου εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανάπτυξης των ιδιοβλαστών [29].

### **5.1.1.2. Σχηματισμός των κρυστάλλων**

Ο σχηματισμός ενός κρυστάλλου αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία περιλαμβάνει έναν αριθμό επιμέρους σταδίων τα οποία συγχρονίζονται μεταξύ τους. Τα στάδια αυτά περιλαμβάνουν την πρόσληψη ασβεστίου από τον αποπλάστη, την μεταφορά του από το κυτόπλασμα στο χυμοτόπιο και ακολούθως στο θάλαμο του κρυστάλλου, τη βιοσύνθεση οξαλικού στο κυτόπλασμα και τη μεταφορά του στο χυμοτόπιο και στη συνέχεια στο θάλαμο. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η πρόσληψη ασβεστίου από τον αποπλάστη γίνεται μέσω λειτουργίας καναλιών ασβεστίου [29,111]. Η είσοδος του ασβεστίου στον ιδιοβλάστη προϋποθέτει τη ρύθμιση των επιπέδων του, έτσι ώστε να αποφευχθεί η διαταραχή της λειτουργίας του κυττάρου. Η έντονη παρουσία ΕΝΠΔ δίνει δυνατότητα ταχείας συσσώρευσης ασβεστίου στον ιδιοβλάστη [27,29,57,84]. Η μεταφορά του ασβεστίου στο ΕΝΠΔ επιτελείται πιθανότατα μέσω καναλιών ασβεστίου και Ca ATP-ασών [29] ενώ στο lumen του ΕΝΠΔ η συσσώρευση του ασβεστίου ελέγχεται από πρωτεΐνες όπως η καρλετικουλίνη [84]. Η διαδικασία μεταφοράς του ασβεστίου στο χυμοτόπιο δεν είναι γνωστή. Πιθανόν μέρος του ασβεστίου να μεταφέρεται κατευθείαν στο χυμοτόπιο από το κυτόπλασμα ενώ ένα άλλο μέρος διαμέσου των μικροσωληνίσκων κατά τη μεταφορά των πρωτεϊνών του

## *Εισαγωγή*

matrix του θαλάμου [65,78]. Από το χυμοτόπιο μεταφέρεται στο θάλαμο του κρυστάλλου [56] είτε μέσω μαζικής ροής είτε μέσω της λειτουργίας μεταφορέων [29].

Η συσσώρευση του ασβεστίου θα πρέπει να συνοδεύεται και από τη βιοσύνθεση του οξαλικού οξέος. Στη βιοσύνθεση του οξαλικού είναι δυνατό να εμπλέκονται περισσότερες της μιας μεταβολικές οδοί [28]. Οξαλικό είναι δυνατόν να σχηματίζεται με οξείδωση του γλυκολικού και του γλυοξυλικού με την δράση του ενζύμου γλυκολική οξειδάση [96,102]. Το γλυκολικό και το γλυοξυλικό αποτελούν προϊόντα της φωτοαναπνοής ενώ η γλυκολική οξειδάση είναι ένζυμο που εντοπίζεται στα περοξυσώματα και απαντάται σε αφθονία σε φωτοσυνθετικούς ιστούς. Μια ακόμη εναλλακτική μεταβολική οδός θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί είτε μέσω της δράσης της ισοκιτρικής λυάσης [33] είτε μέσω της οξείδωσης του οξαλοξικού, αν και το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση δεν είναι γνωστό. ενώ το μονοπάτι αυτό διαπιστώθηκε σε μικρό αριθμό ιστών [29 και συναφής βιβλιογραφία]. Ένας άλλο πρόδρομο μόριο για τη βιοσύνθεση του οξαλικού σε πολλά είδη φυτών μπορεί να είναι το L-ασκορβικό οξύ [28,41,47,59,69,104] παρόλο ότι τα ένζυμο/α του μονοπατιού αυτού παραμένουν αγνώστα.

Ως επικρατέστερο μονοπάτι βιοσύνθεσης οξαλικού που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία των κρυστάλλων θεωρείται αυτό του ασκορβικού. Το ασκορβικό αποτελεί πρόσφορο υπόστρωμα για την βιοσύνθεση του οξαλικού, αφού απαντάται σε πολλούς ιστούς σε υψηλότερα επίπεδα από όλα τα πιθανά πρόδρομα μόρια. Βρίσκεται επίσης σε όλους τους ιστούς, φωτοσυνθετικούς και μη [29,59,69,104]. Το μονοπάτι του γλυκολικού είναι πιθανόν να λειτουργεί σε φυτά με  $C_3$  φωτοσύνθεση, όχι όμως σε  $C_4$  φυτά και μη φωτοσυνθετικούς ιστούς [29 και συναφής βιβλιογραφία]. Οι ιδιοβλάστες δεν φωτοσυνθέτουν (συνεπώς δεν φωτοαναπνέουν) αφού είτε δεν διαθέτουν καθόλου χλωροπλάστες είτε δεν καλά ανεπτυγμένοι [5,27]. Περαιτέρω έρευνες έδειξαν ότι σε ορισμένους ιδιοβλάστες ραφίδων δεν εντοπίζεται το ένζυμο γλυκολική οξειδάση [64] αλλά εντοπίζεται το ένζυμο αφυδρογονάση της L-

## Εισαγωγή

galactono- $\gamma$ -lactone το οποίο καταλύει το τελευταίο στάδιο σχηματισμού του ασκορβικού οξέως [58]. Επιπλέον το οξαλοξικό δεν μπορεί να θεωρηθεί πρόδρομο μόριο αφού το μονοπάτι αυτό διαπιστώθηκε σε μικρό αριθμό ιστών. Απίθανη θεωρείται και η εμπλοκή του κιτρικού ως προδρόμου μορίου [29]. Από την άλλη πλευρά η ύπαρξη ασκορβικού οξέως στο μέσο καλλιέργειας επάγει τον σχηματισμό των κρυστάλλων σε σύστημα ιστοκαλλιέργειας. με τη χρήση μεθόδων σήμανσης με ραδιενεργό άνθρακα  $^{14}\text{C}$  δείχθηκε ότι σε ορισμένα φυτά το οξαλικό οξύ που παράγεται από το ασκορβικό συμμετέχει στο σχηματισμό των κρυστάλλων [41,47,59].

Ως πιθανά υποκυτταρικά διαμερίσματα βιοσύνθεσης του οξαλικού θεωρούνται είτε το χυμοτόπιο είτε το κυτόπλασμα. Η μεταφορά οξαλικού από τα γειτονικά κύτταρα είναι απίθανη, παρά την παρουσία πλασμοδεσμών [64]. Εάν η βιοσύνθεσή του επιτελείται στο χυμοτόπιο ο έλεγχος της σύνθεσής του θα παρουσιάζει δυσχέρειες ενώ εάν πραγματοποιείται στο κυτόπλασμα επιβάλλεται η ταχεία μεταφορά του στο χυμοτόπιο ώστε να αποφεύγεται η συσσώρευση του. Η ύπαρξη στον τονοπλάστη μεταφορέων δικαρβοξυλικών ή οξαλικού θεωρείται πιθανή [29].

Η παρουσία αλλά και η μορφή των κρυστάλλων αποτελούν εξαιρετικά σημαντικά χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στη μελέτη των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των φυτικών ειδών. Ο σχηματισμός των κρυστάλλων στους ιδιοβλάστες (λαμβάνοντας υπόψη τη σταθερότητα της μορφολογίας του ιστού στον οποίο πραγματοποιείται καθώς και τον απόλυτο συγχρονισμό όλων των διαδικασιών) φαίνεται ότι δεν αποτελεί μία απλή φυσικοχημική διαδικασία, αλλά ένα πολύπλοκο γενετικά ελεγχόμενο μηχανισμό [27,79,82,83,85]. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι πρόσφατα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγμένα φυτά *Medicago truncatula* έδειξαν ότι η απουσία των κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου δεν επηρεάζει τους ρυθμούς ανάπτυξης των πειραματοφύτων [86].

### **5.1.2. Μορφολογία των κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου**

Ο διαφορετικός τρόπος κρυστάλλωσης και οι πιθανές διαφορές στη σύσταση των κρυστάλλων δημιουργούν μια μεγάλη ποικιλία μορφών. Η μορφολογία των κρυστάλλων σχετίζεται και με την οικογένεια, το γένος ή ακόμη και το φυτικό είδος και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως ταξινομικό κριτήριο. Οι κρύσταλλοι κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες [5,16,19,27,29,38,80,120,121,130] (Εικόνα Ι.4.):

**α) Βελονοειδείς κρύσταλλοι.** Γενικός όρος με τον οποίο περιγράφονται κρύσταλλοι σχήματος βελόνας. Στην κατηγορία περιλαμβάνονται οι ραφίδες, οι στηλοειδείς κρύσταλλοι (ή στηλοειδή) και τα βελονοειδή.

**1. Ραφίδες:** επιμήκεις, λεπτοί, βελονοειδείς, μονοϋδρικοί συνήθως κρύσταλλοι με αιχμηρές απολήξεις που συνήθως αθροίζονται σε δέσμες. Οι μεμονωμένοι κρύσταλλοι περιβάλλονται από μία μεμβράνη και ολόκληρη η δέσμη συνήθως καλύπτεται από μία μάζα βλεννώδους υφής. Απαντώνται συχνότερα στα μονοκότυλα από ότι στα δικότυλα. Οι ραφίδες συνήθως σχηματίζονται μέσα σε ογκώδη ιδιόβλαστα κύτταρα, γνωστά ως "σάκοι ραφίδων", τα οποία λόγω του μεγέθους τους διακρίνονται από τα γειτονικά κύτταρα. Οι ραφίδες είναι άφθονες σε οικογένειες δικότυλων όπως Balsaminaceae, Rubiaceae και Dilleniaceae αλλά και σε ορισμένες οικογένειες μονοκότυλων. Ασυνήθιστες ραφίδες οι οποίες φέρουν ακίδες και αυλακώσεις έχουν αναφερθεί στο είδος *Xanthosoma sagittifolium* της οικογένειας Araceae.

**2. Στηλοειδείς κρύσταλλοι (ή στηλοειδή):** καλούνται και ψευδοραφίδες αφού είναι πρισματικοί μεγάλου μεγέθους κρύσταλλοι με τουλάχιστον τέσσερις φορές μεγαλύτερο μήκος από το πλάτος τους και με αιχμηρές ή τετραγωνισμένες απολήξεις. Είναι συνήθως μονήρεις αλλά απαντώνται και σε ζεύγη στις οικογένειες Liliaceae Agavaceae, Rosaceae, Rutaceae και στα φύλλα φυτών του γένους *Iris* (Iridaceae). Ογκώδεις στηλοειδείς κρύσταλλοι παρατηρούνται στο δευτερογενές ξύλο των φυτών *Cosmocalyx spectabilis* (οικ. Rutaceae) και *Henriettea sp.* (οικ. Melanostomataceae).

## Εισαγωγή

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

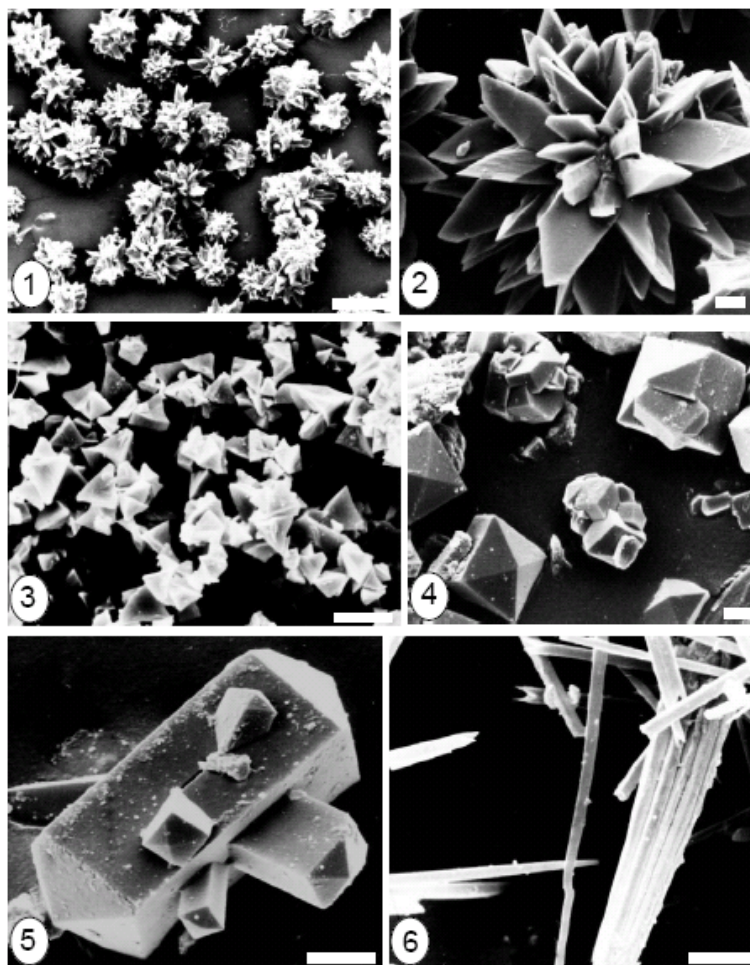
**β) Βοτρυόμορφοι κρύσταλλοι (druses):** κρύσταλλοι που αποτελούνται από ένα συνάθροισμα πρισματοειδών ή πυραμιδοειδών χαλαρά ενωμένων στο κέντρο και με προεξέχοντα άκρα παράγοντας μια δομή ακανόνιστου σχήματος. Ο τύπος αυτός κρυστάλλων παρουσιάζεται συχνά σε ορισμένες οικογένειες δικότυλων όπως *Leguminosae*, *Juglandaceae*, *Polygonaceae* και *Tiliaceae*.

Στους βοτρυόμορφους κρυστάλλους ανήκουν και οι *αστεροειδείς κρύσταλλοι (star crystals ή rosette crystals)* που διαθέτουν συμπαγές πυρήνα, ενώ τα συστατικά που τους αποτελούν είναι ίσα σε μήκος και ακτινικά διατεταγμένα γύρω από αυτόν παράγοντας μια αστεροειδή δομή.

**γ) Πρισματικοί κρύσταλλοι:** ρομβοεδρικοί ή οκταεδρικοί μεταβλητού μεγέθους ευρέως διαδεδομένοι ιδιαίτερα στα δικότυλα όπως τα είδη *Hyoscyamus niger*, *Vicia sativa* και *Pistacia palestina*. Απαντώνται συνήθως σε παρεγχυματικά κύτταρα της δευτερογενούς ανατομικής διάπλασης των ηθμαγγειωδών δεσμίδων.

**δ) Κρυσταλλική άμμος:** κοκκώδης μάζα από λειπούς, ιδιαίτερα συμπαγείς μικροκρυστάλλους οι οποίοι διασπείρονται σε όλο το κύτταρο στο οποίο προσδίδουν μία αμμώδη υφή. Είναι λιγότερο συχνόι στα δικότυλα από τους βοτρυόμορφους και τους πρισματικούς κρυστάλλους και απαντάται συνήθως στα γένη *Acuba* (οικ. *Cornaceae*), *Amaranthus* (οικ. *Amaranthaceae*) και *Sambucus* (οικ. *Caprifoliaceae*) και στην οικ. *Solanaceae*.

**ε) Σφαιρίτες:** σφαιρικοί κρύσταλλοι που απαντώνται κατά ομάδες. Η επιφάνεια τους είναι συνήθως λεία.



**Εικόνα 1.4.** Μικροφωτογραφίες απομονωμένων κρυστάλλων από TEM. 1,2. Βοτρυόμορφοι κρύσταλλοι από το βλαστό του *Opuntia ficus-indica* 3. Κρυσταλλική άμμος από το βλαστό του *Amaranthus spinosus* 4,5. Πρισματικοί κρύσταλλοι από *Begonia* sp. 6. Ραφίδες από *Cissus* sp. (bar = 100μm, 10μm for 1 and 2 to 6) [89].

### 5.1.3. Πιθανή φυσιολογική σημασία των κρυστάλλων

Οι μελέτες σχετικά με τους κρυστάλλους οι οποίοι σχηματίζονται σε ιδιόβλαστα φυτικά κύτταρα, περιορίζονται κυρίως στο περιγραφικό-ανατομικό επίπεδο. Οι διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με τη φυσιολογική σημασία και το λειτουργικό ρόλο των δομών αυτών είναι ελάχιστες και ως εκ τούτου διατυπώνονται μόνον υποθέσεις. Όσον αφορά τους κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου, οι υποθέσεις που έχουν διατυπωθεί μέχρι στιγμής για το λειτουργικό τους ρόλο μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:

**1. Αποθήκες κατιόντων ασβεστίου.** Οι ιδιοβλάστες και κατά συνέπεια οι κρύσταλλοι ασβεστίου θα πρέπει να λειτουργούν ως αποθήκες κατιόντων



## Εισαγωγή

ασβεστίου διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της συγκέντρωσης τους στους φυτικούς ιστούς [16,27,29,72,78,80,83,91,112,118]. Επίσης η διαπίστωση ότι σε μια σειρά ιστούς διαφορετικών ειδών παρατηρείται αποδόμηση των κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου (επομένως το μέγεθος του κρυστάλλου επιδέχεται ρύθμιση) σχετίστηκε με τη διαχείριση των αποθεμάτων ασβεστίου, χωρίς ωστόσο να δοθεί ικανοποιητική ερμηνεία για τη μεταβολική τύχη του άνθρακα του οξαλικού [44]. Οι Arnott and Pautard (1970) πρότειναν ότι το οξαλικό ασβέστιο (που σχηματίζεται στους ιδιοβλάστες) μπορεί να παρέχει ένα πρόσκαιρο απόθεμα Ca και επομένως η ανταλλαγή μεταξύ διαλυτών και αδιάλυτων δεξαμενών Ca ρυθμίζεται ανάλογα με τις ανάγκες των φυτικών ιστών. Πράγματι, τα επίπεδα οξαλικού Ca στους ιδιοβλάστες μπορεί να αυξηθούν ή να μειωθούν ανάλογα με τα επίπεδα του ασβεστίου στο μέσο ανάπτυξης [112].

**2. Άμυνα έναντι φυτοφάγων.** Οι κρύσταλλοι διαδραματίζουν είτε παθητικό είτε ενεργό ρόλο στην άμυνα έναντι φυτοφάγων ή/και παθογόνων όπως παρατηρήθηκε σε ορισμένες περιπτώσεις π.χ στο είδος *Tragia ramosa*. Οι τρίχες του φυτού αυτού αποτελούνται από ένα κύτταρο το οποίο περιέχει ένα μεγάλο σπηλοειδή κρύσταλλο. Όταν οι τρίχες έρθουν σε επαφή με ένα ζώο το άκρο του κυττάρου διαρρηγνύεται αποκαλύπτοντας τον κρύσταλλο, με αποτέλεσμα τον τραυματισμό του ζώου [109]. Η παρουσία κρυστάλλων στα φύλλα προσδίδει μηχανική σκληρότητα προσφέροντας προστασία έναντι εχθρών [22,70,100,113]. Το σχήμα, η τοποθέτηση, ο αριθμός και το μέγεθος των κρυστάλλων αποτρέπουν τα ζώα από το να καταναλώσουν τέτοιους ιστούς αφού τα αδιάλυτα άλατα του οξαλικού ασβεστίου επικάθονται στο ήπαρ των ζώων προκαλώντας προβλήματα, ακόμη και το θάνατο τους [12,51,100,103]. Ορισμένοι ογκώδεις μεγάλοι στυλοειδείς κρύσταλλοι εκτείνονται από την προσαξονική έως την αποαξονική επιφάνεια των φύλλων αποτρέποντας την κατανάλωση από ζώα, ενώ βοηθούν τη μηχανική στήριξη των ιστών σε περίπτωση αφυδάτωσής τους [27,29,80,113]. Η συσσώρευση σχετικών με την παθογένεση πρωτεϊνών σε ιδιοβλάστες που περιέχουν κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου ενισχύει την υπόθεση αυτή [17].

**3. Αποθήκες οξαλικού οξέως.** Οι κρύσταλλοι αποτελούν μία μορφή αποθήκευσης οξαλικού οξέος το οποίο επανεισάγεται στον μεταβολικό κύκλο όταν το απαιτούν οι συνθήκες. Η αδρανοποίηση του οξαλικού οξέος επιβάλλεται ώστε να μη δημιουργούνται παρενέργειες στους ιστούς λόγω του ισχυρά όξινου χαρακτήρα του [27,28,29]. Η αποθήκευση ιόντων ασβεστίου και οξαλικού οξέος με τη μορφή οξαλικού ασβεστίου σχετίζεται πιθανόν με μηχανισμούς οσμωρύθμισης [94]. Τα ιόντα ασβεστίου και οξαλικού που παίρνουν μέρος στη δημιουργία των κρυστάλλων ουσιαστικά «αποσύρονται από την κυκλοφορία» και δεν είναι πλέον οσμωτικά ενεργά. Το αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση αποδόμησης των κρυστάλλων.

**4. Σχέση με την φωτοσύνθεση.** Στο παρελθόν έχουν επίσης διατυπωθεί υποθέσεις για πιθανή σχέση κρυστάλλων που εντοπίζονται σε φωτοσυνθετικά κύτταρα με τη φωτοσυνθετική λειτουργία [27], χωρίς ωστόσο να συνοδεύονται από πειραματικά δεδομένα. Στο φυτό *Peperomia sp.* έχουν παρατηρηθεί περισσότεροι κρύσταλλοι στο πασσάλωδες παρέγχυμα από ότι σε ιδιόβλαστα κύτταρα και το γεγονός αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι ίσως ο ρόλος αυτών των κρυστάλλων να είναι η διάχυση του φωτός στις κατώτερες στοιβάδες των φωτοσυνθετικών κυττάρων [26].

**5. Αποτοξινωτικός μηχανισμός των βαρέων μετάλλων.** Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι κρύσταλλοι συμβάλλουν στην διαχείριση και αδρανοποίηση βαρέων μετάλλων. Το οξαλικό οξύ σχετίζεται με την αποτοξίνωση μετάλλων όπως το στρόντιο, το κάδμιο, το αργίλιο, ο μόλυβδος και ο χαλκός [29 και συναφής βιβλιογραφία, 71,76,77]. Το φυτό *Nymphaea sp.* π.χ. αποθηκεύει στα επιδερμικά κύτταρα των φύλλων του κάδμιο σε κρυσταλλική μορφή [61]. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι καταπόνηση από βαρέα μέταλλα μειώνει την απόθεση οξαλικού ασβεστίου στα φύλλα του φυτού *Phaseolus vulgaris* [45].

### 5.2. Κρυστόλιθοι

Σε ορισμένες περιπτώσεις ασβέστιο εναποτίθεται με τη μορφή άμορφου ανθρακικού ασβεστίου. Το άλας αυτό αν και λιγότερο διαδεδομένο εντοπίζεται με τη μορφή εναποθέσεων σε κύτταρα ορισμένων φυτικών ειδών.

## Εισαγωγή

Στις περιπτώσεις αυτές το ανθρακικό ασβέστιο εναποτίθεται είτε στα κυτταρικά τοιχώματα, είτε σε εξειδικευμένα κύτταρα που καλούνται λιθοκύστες [19,81,120]. Οι λιθοκύστες είναι ογκώδη ιδιόβλαστα κύτταρα στα οποία εναποτίθεται ανθρακικό ασβέστιο με τη μορφή κυστολίθων [19,81]. Απαντώνται συνήθως στην επιδερμίδα των φύλλων και στις δύο επιφάνειες. Οι λιθοκύστες σχηματίζονται κυρίως σε μέλη των οικογενειών *Moraceae*, *Acanthaceae*, *Cucurbitaceae*, *Urticaceae*, και *Cannabaceae*, ορισμένα από τα οποία είναι φυτά γεωργικού ενδιαφέροντος, όπως η συκιά (*Ficus carica*), η μουριά (*Morus alba*), το περδικάκι (*Parietaria judaica*), οι καλλωπιστικοί φίκου (*Ficus sp*) [16,19,81].

Σε ώριμα φύλλα φυτών των γενών *Boehmeria* και *Ficus* η παραγωγή των κυστόλιθων εξαρτάται από την περιεκτικότητα ασβεστίου στο έδαφος. Σύμφωνα με τους Metcalfe and Chalk (1985) οι κυστόλιθοι δημιουργούνται ακόμη και σε συνθήκες πλήρους έλλειψης ασβεστίου, ωστόσο το μέγεθος του εγκλειστού καθορίζεται από τη συγκέντρωση ασβεστίου στο μέσο της καλλιέργειας. Παρατεταμένη σκίαση επίσης εμποδίζει την ανάπτυξη των κυστόλιθων σε νεαρά φυτά. Εάν η συγκέντρωση του ατμοσφαιρικού διοξειδίου του άνθρακα αυξηθεί κατά δέκα φορές, οι μεμονωμένοι κυστόλιθοι αυξάνουν το μεγεθός τους, αλλά ο αριθμός τους δεν αυξάνεται. Από την άλλη πλευρά, αν η ατμόσφαιρα στερείται CO<sub>2</sub> μόνο στοιχειώδεις κυστόλιθοι παράγονται [30]. Οι λιθοκύστες πιθανόν να επιτελούν παρόμοιες λειτουργίες με τους κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου. Στη μουριά οι λιθοκύστες ίσως επιτελούν αμυντικό ρόλο αφού στην περιοχή της επιφανειακής θηλής συσσωρεύεται πυρίτιο [107]. Είναι γνωστό ότι το πυρίτιο που εναποτίθεται στα επιδερμικά κύτταρα ορισμένων φυτικών ειδών, κυρίως σιτηρών, παίζει ρόλο στην άμυνα των φυτικών επιφανειακών ιστών έναντι παθογόνων. Επομένως το ανιχνεύσιμο πυρίτιο μπορεί να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην αντοχή του κυτταρικού τοιχώματος στην περιοχή της θηλής και επομένως να συμβάλλει στην άμυνα έναντι προσβολών [107].

### **5.3. Άμορφες εναποθέσεις πυριτίου (φυτόλιθοι)**

Σπανιότερα σχηματίζονται κρύσταλλοι διοξειδίου του πυριτίου ( $\text{SiO}_2$ ) στο τοίχωμα των επιδερμικών κυττάρων, ή πυριτικά σωματίδια, άμορφες υαλώδεις μάζες μέσα στον πρωτοπλάστη. Έχει αναφερθεί ακόμη και η ύπαρξη κρυστάλλων θειϊκού ασβεστίου ( $\text{CaSO}_4$ ) [19].

## Ι.6. Τα κοκκολιθοφόρα

Συσσωρευση αλάτων ασβεστίου, κυρίως άμορφου ανθρακικού ασβεστίου, παρουσιάζεται όχι μόνο με τη μορφή κυστολίθων και κρυστάλλων σε φυτικά είδη, αλλά και σε ένα μεγάλο αριθμό οργανισμών με διαφορετικές μορφές. Παρόλο που το άμορφο ανθρακικό ασβέστιο αποτελεί μια ασταθή χημικά ένωση [63], συσσωρεύεται σε μια ομάδα μικροοργανισμών, τόσο του γλυκού όσο και του θαλασσινού νερού, που αναφέρονται ως κοκκολιθοφόρα. Πρόκειται για μονοκύτταρο θαλάσσιο φυτοπλανκτόν που περιβάλλεται από μία κοκκόσφαιρα, η οποία αποτελείται από ένα στρώμα από επικαθίσματα  $\text{CaCO}_3$ . Οι λεπιοειδείς εναποθέσεις αυτές είναι γνωστές ως κοκκόλιθοι [74]. Οι μικροοργανισμοί αυτοί παίζουν σημαντικό ρόλο στο βιογεωχημικό κύκλο του άνθρακα, του ασβεστίου και του θείου και στην ανταλλαγή του  $\text{CO}_2$  μεταξύ ωκεανών και ατμόσφαιρας [31,88]. Περισσότερα από 200 είδη κοκκολιθοφόρων είναι γνωστά: το *Gephyrocapsa oceanica* αποτελεί το επικρατέστερο είδος σε υποτροπικές περιοχές ενώ το *Emiliania huxleyi* (περισσότερο διαδομένο κοκκολιθοφόρο) σχηματίζει εκτεταμένες αποικίες σε παράκτιες περιοχές μέσου γεωγραφικού πλάτους οι οποίες είναι ορατές ακόμη και σε δορυφορικές φωτογραφίες [46].

Το ανθρακικό ασβέστιο, το οποίο παράγεται κατά την παρακάτω αντίδραση:



σχηματίζει κοκκολιθους στην εξωτερική πλευρά των κυττάρων [39]. Η μορφή των κοκκόλιθων παρουσιάζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τα οποία δεν παρατηρούνται στο αβιοτικό περιβάλλον, γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία μεταβολικού ελέγχου στη διαδικασία της ανοργανοποίησης. Η μορφή τους επηρεάζεται επίσης από μια σειρά παράγοντες του περιβάλλοντος, αλλά και το είδος του οργανισμού [73]. Η εναπόθεση ασβεστίου σε πολλά είδη κοκκολιθοφόρων διεγείρεται από την φωτεινή

## Εισαγωγή

ακτινοβολία. Πειράματα ιχνηθέτησης με  $^{14}\text{C}$  έδειξαν ότι η παραγωγή των κοκκόλιθων στο *E.huxleyi* εξαρτάται άμεσα από την ύπαρξη φωτισμού [88].

Ο ανόργανος «εξώσκελετός» των θαλάσσιων πλακτονικών μικροοργανισμών μετά το θάνατο του οργανισμού καταβυθίζεται στο βυθό των ωκεανών και παίρνει σημαντικό μέρος στην ιζηματογένεση. Η δημιουργία των κοκκόλιθων σχετίζεται με την ικανότητα τοπικής αύξησης της συγκέντρωσης  $\text{CO}_2$  στο υδατικό περιβάλλον και επομένως επηρεάζει άμεσα τη φωτοσυνθετική αφομοίωση του  $\text{CO}_2$  των μικροοργανισμών αυτών [39,98]. Σχετίζεται επίσης με τη μηχανική στήριξη και προστασία του οργανισμού. Η μορφή αλλά και ο τρόπος εναπόθεσης του ανθρακικού ασβεστίου παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των οργανισμών και πιθανόν σχετίζονται και με το λειτουργικό ρόλο των κοκκόλιθων [63].

Ο άνθρακας ο οποίος ενσωματώνεται στους κοκκόλιθους προέρχεται από ανόργανες μορφές άνθρακα του υδατικού περιβάλλοντος, δηλ. το  $\text{CO}_2$ , τα όξινα ανθρακικά και ανθρακικά ιόντα. Η ισορροπία μεταξύ  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  και  $\text{CO}_3^{2-}$  εξαρτάται κυρίως από το pH και τις επιμέρους συγκεντρώσεις και σε μικρότερο βαθμό από τη θερμοκρασία και αλατότητα [39].

Εχει διαπιστωθεί ότι οι κοκκόλιθοι σχηματίζονται κυρίως από όξινα ανθρακικά ιόντα, τα οποία στο υδατικό περιβάλλον των ωκεανών επικρατούν έναντι των δύο άλλων μορφών ανόργανου άνθρακα [88]. Κατά τη διάρκεια σχηματισμού των κοκκόλιθων παράγεται  $\text{CO}_2$  το οποίο χρησιμοποιείται άμεσα από τη Rubisco των πλανκτονικών μικροοργανισμών. Επίσης κατά τη διάρκεια της διαδικασίας το υδατικό περιβάλλον εμπλουτίζεται συνεχώς με  $\text{CO}_2$ , με αποτέλεσμα η μερική πίεση του διαλυμένου  $\text{CO}_2$  να παρουσιάζεται αυξημένη. Ο ρυθμός σχηματισμού των κοκκόλιθων φαίνεται ότι είναι ταχύτατος, αφού μπορεί να σχηματίζεται ένας μεμονωμένος κοκκόλιθος ανά ώρα [10,88]. Κάτω από ευνοϊκές συνθήκες περιβάλλοντος ο ρυθμός σχηματισμού κοκκόλιθων μπορεί να εξισωθεί με το ρυθμός αφομοίωσης  $\text{CO}_2$  μέσω της φωτοσύνθεσης.

### Ι.7. Βοτανικοί χαρακτήρες του πειραματόφυτου

Το γένος *Amaranthus* (κν. βλήτο) περιλαμβάνει περίπου 100 είδη τα οποία ευδοκούν σε θερμές και εύκρατες περιοχές. Ορισμένα χαρακτηρίζονται ως δυσεξοντώτα κοσμοπολιτικά ζιζάνια που φύονται σε καλλιεργήσιμους και χέρσους τόπους, αλλά καλλιεργούνται ως καλλωπιστικά για τις εντοπωσιακές ταξιανθίες τους ενώ ολιγάριθμα είδη καλλιεργούνται ως λαχανικά.

Το γένος περιλαμβάνει μονοετή (σπανίως πολυετή), μόνουκα ή δίοικα φυτά με φύλλα ακέραια κατ' εναλλαγή. Τα άνθη είναι συνήθως ερμαφρόδιτα σε κυματοειδή ταξιανθία. Τα μέρη του περιανθίου είναι 2-5, μικρά, μεμβρανώδη, χρώματος λευκού, πράσινου, κόκκινου ή κίτρινου. Οι στήμονες είναι συνήθως όσα και τα μέρη του περιανθίου. Ο στύλος είναι μικρός ή η αναπτύσσεται σε 2-3 στίγματα. Καρπός πυξίδιο, ξηρός που διαρηγνύεται εγκαρσίως ή τυχαίως, ενός σπέρματος.

Το γένος *Amaranthus* παρουσιάζει δυσχέρειες στην ταξινόμηση του και περίπλοκο ιστορικό ονοματολογίας λόγω των επαναλαμβανόμενων λαθών στη κατάταξη των ειδών που περιλαμβάνει. Η εποχή, η θρεπτική κατάσταση και ο τύπος καλλιέργειας αποτελούν παράγοντες που επηρεάζουν θεαματικά το φαινότυπο πολλών ειδών *Amaranthus* και γι' αυτό το λόγο παρουσιάζει έντονη φαινοτυπική ποικιλομορφία. Το ιδιόμορφο αυτό χαρακτηριστικό δημιούργησε πληθώρα ονομάτων και συνδυασμών σε όλα τα ταξινομικά επίπεδα. Το γένος *Amaranthus* στην Ελλάδα περιλαμβάνει είδη τα είδη *A. albus*, *A. blitoides*, *A. caudatus*, *A. cruentus*, *A. graecizans*, *A. hybridus*, *A. hypochondriacus*, *A. portuensis*, *A. uirtensis*, *A. retroflexus*, *A. blitum*, *A. bouchonii*, *A. deflexus*, *A. emarginatus*, *A. muricatus*, *A. viridis*, *A. bouchomi*, *A. quitensis*, *A. spinosus*, *A. Graecizans* τα οποία εξαπλώνονται σε όλη τη χώρα [95,131].

Το γένος *Amaranthus* αποτελεί τυπικό εκπρόσωπο της λειτουργικής ομάδας των C<sub>4</sub> φυτών και στα φύλλα του παρουσιάζεται η χαρακτηριστική ανατομία τύπου Kranz. Οι κρύσταλλοι του οξαλικού ασβεστίου που

### *Εισαγωγή*

παρουσιάζονται στο βλήτο χαρακτηρίζονται ως βοτρυόμορφοι και εντοπίζονται σε ιδιοβλαστα κύτταρα στο μεσόφυλλο πλησίον των κύτταρων του κολεού [23,80]. Κρυσταλλική άμμος εντοπίζεται στην περιοχή των ηθμαγγειωδών δεσμίδων. Πρισματικοί κρύσταλλοι εμφανίζονται σπανίως [16,23,105]. Κρυσταλλοειδή έχουν αναφερθεί και στους χλωροπλάστες ενώ εκτός από τα φύλλα κρύσταλλοι έχουν αναφερθεί και στον βλαστό [105].



## *II. Σκοπός της εργασίας*



## *Σκοπός της Εργασίας*

Λαμβάνοντας υπόψη ότι **α.** μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν επαρκή πειραματικά δεδομένα ώστε να δοθεί ικανοποιητική ερμηνεία για τη φυσιολογική σημασία των κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου που εντοπίζονται σε ιδιοβλαστα κύτταρα και **β.** το ρόλο τον οποίο επιτελούν ανάλογες δομές σε φωτοσυνθετικούς πλαγκτονικούς μικροοργανισμούς, θα μπορούσε να διατυπωθεί υπόθεση εργασίας, σύμφωνα με την οποία οι κρύσταλλοι *διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαχείριση του οργανικού άνθρακα των φωτοσυνθετικών ιστών.* Το οξαλικό ασβέστιο που βρίσκεται σε κρυσταλλική μορφή στις δομές αυτές θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει μια δεξαμενή ανθρακικών ιόντων τα οποία κάτω από κατάλληλες συνθήκες προκύπτουν από τη διάσπαση του οξαλικού ασβεστίου και είναι διαθέσιμα προς αφομοίωση από την καρβοξυλάση-οξυγενάση της διφωσφοροριβουλόζης (Rubisco) στα φωτοσυνθετικά κύτταρα. Σε συνθήκες “πενίας” άνθρακα, όταν για παράδειγμα τα στομάτια παραμένουν κλειστά στη διάρκεια της ημέρας λόγω αντίξων περιβαλλοντικών συνθηκών (επικράτηση ισχυρών ανέμων για μεγάλα χρονικά διαστήματα ή υδατική καταπόνηση) η διάσπαση του οξαλικού ασβεστίου θα μπορούσε δυνητικά να προμηθεύσει το απαραίτητο CO<sub>2</sub> για την απρόσκοπτη λειτουργία του κύκλου του Calvin, χωρίς να παραστεί ανάγκη ανοίγματος των στομάτων και συνεπώς να υπάρξει απώλεια νερού. Εάν αρθούν οι δυσμενείς συνθήκες, ή κατά τη διάρκεια της νύκτας όπου πλέον η φωτοσύνθεση δεν λειτουργεί, ξεκινά και η διαδικασία επαναδημιουργίας του κρυστάλλου. Ο άνθρακας που χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση του οξαλικού που σηματίζει κρυστάλλους μπορεί να προέρχεται από τρεις διαφορετικές πηγές: **α.** από την ατμόσφαιρα. **β.** από την αναπνευστική δραστηριότητα και **γ.** από το έδαφος. *Προτείνεται λοιπόν ότι οι κρύσταλλοι αποτελούν ένα δυναμικό σύστημα αποθήκευσης και διαχείρισης κυρίως ανόργανου άνθρακα παρά ασβεστίου.*

Η παρούσα εργασία κλήθηκε να απαντήσει στα ακόλουθα ερωτήματα:

1. Ποια η ανατομία των ιδιοβλαστών που σχηματίζουν κρυστάλλους στο μεσόφυλλο του πειραματόφυτου;

### *Σκοπός της Εργασίας*

2. Ποια η σύσταση των κρυστάλλων;
3. Από ποιους παράγοντες επηρεάζεται το μέγεθος των κρυστάλλων και υπό ποιες συνθήκες αποδομούνται;
4. Ποια η προέλευση του άνθρακα που χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση του οξαλικού των κρυστάλλων;
5. Ποια η σύσταση των κρυστάλλων και των φυτικών ιστών σε  $^{13}\text{C}$ ;

### *III. Υλικά και Μέθοδοι*



### III.1. Οι πειραματικοί χειρισμοί.

Ως πειραματόφυτο χρησιμοποιήθηκε το φυτό *Amaranthus sp.* (κν. βλητο) οικ. Amaranthaceae. Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε στερεό αδρανές υπόστρωμα (περλίτη) και ποτίστηκαν με διάλυμα Hoagland-Arnon ημίσιος συγκέντρωσης μέχρι να αναπτυχθούν επαρκώς. Τα φυτά στα οποία εφαρμόστηκε πενία CO<sub>2</sub> ποτίστηκαν με θρεπτικό διάλυμα το οποίο δεν περιείχε ανθρακικά ανιόντα ενώ τα φυτά-μάρτυρες ποτίστηκαν με διάλυμα που περιείχε ανθρακικά ανιόντα. Στη συνέχεια τα φυτά μεταφέρθηκαν σε υδροπονική καλλιέργεια (Εικόνα III.1.). Η οξυγόνωση του ριζικού συστήματος εξασφαλίστηκε με την παροχή αέρα (κανονικής ή μηδενικής συγκέντρωσης CO<sub>2</sub>) ανάλογα με το χειρισμό. Η δέσμευση του CO<sub>2</sub> γινόταν με την βοήθεια παγίδων που περιείχαν soda lime (μείγμα διοξειδίων ασβεστίου, καλίου, νατρίου). Τα φυτά πριν την έναρξη κάθε πειραματικού χειρισμού εγκλιματίστηκαν για περίπου 10 ημέρες στις συνθήκες της υδροπονίας και του θαλάμου ανάπτυξης (φωτοπερίοδος 16/8 hrs, θερμοκρασία ημέρας-νύκτας 25° και 20° C αντίστοιχα, ένταση φωτεινής ακτινοβολίας 300 μmole m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

Στη συνέχεια τα φυτά υποβλήθηκαν στους παρακάτω πειραματικούς χειρισμούς:

i. Φυτά μάρτυρες (control) στα οποία χορηγήθηκε αέρας κανονικής συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> (360-370 ppm CO<sub>2</sub>) και στο υπέργειο μέρος και στη ρίζα (Εικόνα III.1.α. και III.2.α.)

ii. Φυτά στα οποία χορηγήθηκε αέρας μηδενικής συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> στην ρίζα και κανονικής συγκέντρωσης στο υπέργειο μέρος (-r/+a).

Στα φυτά του χειρισμού αυτού διοχετευόταν στη ρίζα αέρας στον οποίο είχε δεσμευτεί το CO<sub>2</sub> με την βοήθεια παγίδων που περιείχαν soda lime και στο υπέργειο μέρος αέρας κανονικής συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> (360-370 ppm CO<sub>2</sub>).

iii. Φυτά στα οποία χορηγήθηκε αέρας μηδενικής συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> στην ρίζα και στο υπέργειο μέρος (-r/-a). (Εικόνα III.1.β. και III.2.β.).

## Υλικά και μέθοδοι

Τα φυτά εγκλείστηκαν στους διαφανείς αεροστεγείς θαλάμους στους οποίους διοχετεύθηκε (στο υπέργειο μέρος και στη ρίζα) αέρας μέσω αντλιών από τον οποίο είχε αφαιρεθεί το  $\text{CO}_2$ .

**iv. Φυτά στα οποία χορηγήθηκε αέρας κανονικής συγκέντρωσης  $\text{CO}_2$  στην ρίζα και μηδενικής συγκέντρωσης στο υπέργειο μέρος (+1/-a).**

Τα φυτά εγκλείστηκαν στους διαφανείς, αεροστεγείς θαλάμους και διοχετεύθηκε στο υπέργειο μέρος αέρας κανονικής συγκέντρωσης σε  $\text{CO}_2$  (360-370 ppm  $\text{CO}_2$ ) ενώ στη ρίζα αέρας στον οποίο είχε δεσμευτεί το  $\text{CO}_2$ .

Σε όλους τους χειρισμούς η συγκέντρωση του  $\text{CO}_2$  στον παρεχόμενο αέρα καταγραφόταν με αναλυτή  $\text{CO}_2$  (Li-6062 Licor Ltd).

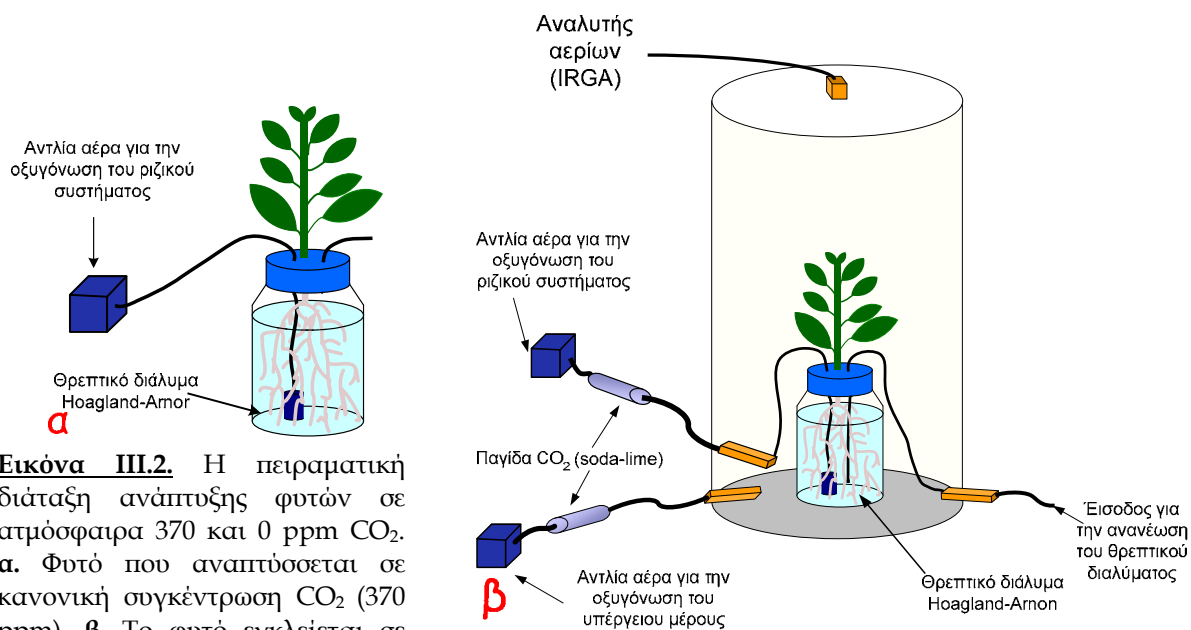
Τα φυτά παρέμειναν στις συνθήκες αυτές για 10 μέρες. Το θρεπτικό διάλυμα ανανεωνόταν κάθε δύο ημέρες και έγιναν δειγματοληψίες φύλλων σε συγκεκριμένες χρονικές περιόδους.

Μετά την πάροδο των 10 ημερών συλλέχθηκαν τα φύλλα από τον κάθε χειρισμό για να απομονωθούν οι κρύσταλλοι.



**Εικόνα III.1.** Διάταξη υδροπονικής καλλιέργειας. **α.** φυτό το οποίο αναπτύσσονται σε ατμόσφαιρα κανονικής συγκέντρωσης  $\text{CO}_2$ . **β.** φυτά που αναπτύσσονται σε αεροστεγείς θαλάμους ελεγχόμενης ατμόσφαιρας  $\text{CO}_2$ .





**Εικόνα III.2.** Η πειραματική διάταξη ανάπτυξης φυτών σε ατμόσφαιρα 370 και 0 ppm CO<sub>2</sub>. **α.** Φυτό που αναπτύσσεται σε κανονική συγκέντρωση CO<sub>2</sub> (370 ppm). **β.** Το φυτό εγκλείεται σε θάλαμο στον οποίο παρέχεται αέρας μηδενικής συγκέντρωσης σε CO<sub>2</sub> με δέσμευση του CO<sub>2</sub> κατάλληλη παγίδα. Η συγκέντρωση CO<sub>2</sub> ελέγχεται μέσω αναλυτή αερίων (IRGA). Η ροή αέρα ρυθμίζεται με ροόμετρα ώστε να παραμένει αμετάβλητη σε όλους τους χειρισμούς.

### III.2. Ανατομικές παρατηρήσεις.

Για την μελέτη της ανατομίας των κρυστάλλων χρησιμοποιήθηκαν νωπά δείγματα από τα οποία ελήφθησαν εγκάρσιες τομές με ξυράφι και οι μικροφωτογραφίες ελήφθησαν σε οπτικό μικροσκόπιο Zeiss AxioLab (Carl Zeiss, Jena, Germany) με τη χρήση ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής SONY DSC75-S (SONY Corp., Tokyo, Japan). Η παρατήρηση των κρυστάλλων πραγματοποιήθηκε σε πεδίο πολωμένου φωτός.

### III.3. Απομόνωση κρυστάλλων.

Η μέθοδος απομόνωσης περιλαμβάνει τεμαχισμό ώριμων φύλλων και ομογενοποίησή τους σε διάλυμα ισοπροπανόλης. Η ομογενοποίηση πραγματοποιήθηκε σε ομογενοποιητή (Omni mixer homogeniser) με χαμηλή ταχύτητα περιστροφής ώστε να μη διαλυθούν οι κρύσταλλοι. Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις - εκπλύσεις με ισοπροπανόλη κατά τη διάρκεια των οποίων οι κρύσταλλοι καθιζάνουν ταχύτερα όλων των άλλων κυτταρικών συστατικών. Με συνεχή επανάληψη της διαδικασίας παραλήφθηκε ίζημα πλούσιο σε κρυστάλλους υψηλής καθαρότητας. Στη συνέχεια οι απομονωμένοι κρύσταλλοι παρατηρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο για

έλεγχο της καθαρότητας του δείγματος και παρατήρησης της μορφολογίας των κρυστάλλων.

#### **III.4. Μέτρηση των διαστάσεων των κρυστάλλων.**

Η μέτρηση των διαστάσεων των κρυστάλλων έγινε με τη βοήθεια σταχτογραμμάτων [30]. Δίσκοι φύλλων γνωστής διαμέτρου τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους και μπήκαν σε κλίβανο για ξήρανση για 24 ώρες. Ακολούθησε καύση σε πυραντήριο στους 500°C για 7 ώρες. Στη συνέχεια τα υπολείμματα των φύλλων παρατηρήθηκαν σε διερχόμενο φως στο οπτικό μικροσκόπιο. Η μέθοδος επιτρέπει τον υπολογισμό των διαστάσεων των κρυστάλλων σε ένα φύλλο με σχετικά καλή ακρίβεια. Η μέτρηση των διαστάσεων των κρυστάλλων έγινε με τη χρήση κατάλληλης κλίμακας ενσωματωμένης στον προσοφθάλμιο φακό.

#### **III.5. Μετρήσεις των ημερονύκτιων διακυμάνσεων των διαστάσεων των κρυστάλλων και ορισμένων φυσιολογικών παραμέτρων.**

Μετά από την περίοδο εγκλιματισμού των φυτών *Amaranthus sp.* στις συνθήκες του θαλάμου σταθερών συνθηκών (φωτοπερίοδος 14/10 hrs, θερμοκρασία 25°C, ένταση φωτεινής ακτινοβολίας 300  $\mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), ελήφθησαν φύλλα σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (μια στο μέσο της φωτοπεριόδου, μία ώρα πριν και μια ώρα μετά την λήξη της φωτοπεριόδου μία ώρα πριν και μια ώρα μετά την έναρξη της φωτοπεριόδου) και για διάστημα 33 ωρών. Οι δειγματοληψίες γίνονταν από φυτά-μάρτυρες στα οποία χορηγήθηκε αέρας κανονικής συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> (360-370 ppm CO<sub>2</sub>) και στο υπέργειο μέρος και στη ρίζα και από φυτά στα οποία χορηγήθηκε αέρας μηδενικής συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> στην ρίζα και κανονικής συγκέντρωσης στο υπέργειο μέρος (-r/+a). Στα δείγματα αυτά προσδιορίστηκε το μέγεθος των κρυστάλλων με τη μέθοδο των σταχτογραμμάτων.

Παράλληλα και για στις ίδιες χρονικές περιόδους λαμβάνονταν μετρήσεις φυσιολογικών παραμέτρων (φωτοσύνθεση, αγωγιμότητα στομα-

τίων) με φορητό όργανο μέτρησης φωτοσύνθεσης (LCPro, ADC Bioscientific Ltd).

### **III.6. Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός των κρυστάλλων με τη μέθοδο FT-Raman.**

#### **6.1. Φασματοσκοπία Raman**

Η φασματοσκοπία Raman (Raman spectroscopy) οφείλει το όνομά της στον Ινδό sir Chandrasektra Vencata Raman ο οποίος ανακάλυψε το 1928 το φαινόμενο της ανελαστικής σκέδασης του φωτός, το οποίο καλείται φαινόμενο Raman Για την εργασία αυτή του απονεμήθηκε το βραβείο Νόμπελ το 1930.

Η σκέδαση είναι ένα από τα φαινόμενα που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση ακτινοβολίας και ύλης. Όταν μια ακτίνα φωτός προσπίπτει σε ένα υλικό, ένα πολύ μικρό ποσοστό των φωτονίων της (<0,0001%) σκεδάζεται από το δείγμα με ταυτόχρονη μεταβολή της συχνότητάς τους από αυτήν της προσπίπτουσας ακτίνας. Η μετατόπιση αυτή της συχνότητας καλείται φαινόμενο Raman και η σκεδαζόμενη ακτινοβολία, ακτινοβολία Raman. Η φασματοσκοπία Raman στηρίζεται στο φαινόμενο της σκέδασης όταν μια ακτίνα φωτός όταν προσπίπτει σε ένα μόριο, διεγείροντας τις δονήσεις χαρακτηριστικών ομάδων.

Αρχικά ως πηγή ακτινοβολίας στη φασματοσκοπία Raman χρησιμοποιήθηκαν συστήματα ηλεκτρικής εκκένωσης και για την καταγραφή των φασμάτων φωτογραφικά φιλμς. Το πρώτο εμπορικό όργανο Raman παρουσιάστηκε το 1953. Κατά τη δεκαετία του 1960, το laser αντικατέστησε την ηλεκτρική εκκένωση [7,37]. Σήμερα στη φασματοσκοπία Raman χρησιμοποιούνται ακτίνες laser με πολύ στενή περιοχή συχνοτήτων εκπομπής (σχεδόν μόνο μια διακεκριμένη συχνότητα) [52,53,54].

Το φαινόμενο Raman αποτελεί φασματοσκοπία εκπομπής, κατά την οποία η αλληλεπίδραση μεταξύ φωτονίων και μορίων ολοκληρώνεται σε πολύ

σύντομο χρονικό διάστημα, ενώ οι αιχμές του φάσματος Raman αντιστοιχούν σε φωτόνια τα οποία “σκεδάζονται” ανελαστικά από τα μόρια.

Οι θεμελιώδεις φυσικές αρχές που διέπουν την κλασσική ερμηνεία του φαινομένου μπορούν να συνοψιστούν ως εξής [7,37]:

1. Το προσπίπτον φως προκαλεί πόλωση των μορίων του μέσου με το οποίο αλληλεπιδρά, δημιουργώντας κατά τον τρόπο αυτό ταλαντούμενα ηλεκτρικά δίπολα. Σύμφωνα με την κλασσική ηλεκτροδυναμική θεωρία επιταχυνόμενα φορτία έχουν τη δυνατότητα να ακτινοβολούν. Η δευτερογενής αυτή ακτινοβολία των διπόλων αποδίδεται σε σκέδαση.

2. Η σκέδαση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας προέρχεται από την αλληλεπίδραση των φωτονίων με το ηλεκτρονιακό νέφος. Με άλλα λόγια το φως σκεδάζεται από τα ηλεκτρόνια του μορίου και όχι από τους πυρήνες.

3. Η σκέδαση Raman αποδίδεται στην σύζευξη των κινήσεων των ηλεκτρονίων και των πυρήνων. Η διαμόρφωση των θέσεων των πυρήνων καθορίζει το ενδομοριακό πεδίο το οποίο “καταλαμβάνουν” τα ηλεκτρόνια. Η δυνατότητα παραμόρφωσης του ηλεκτρονιακού νέφους από το προσπίπτον ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από τη στιγμιαία διαμόρφωση των πυρηνικών συντεταγμένων. Η ασθενής φύση του φαινομένου απαιτεί την ύπαρξη πολύ ισχυρών πηγών ακτινοβολίας όπως π.χ. ενός laser.

Κύρια προϋπόθεση προκειμένου μια δόνηση να είναι ενεργή κατά Raman αποτελεί η μεταβολή του επιπέδου πόλωσης του μορίου κατά τη δόνηση. Ο ρόλος της συμμετρίας των μορίων και των τρόπων δόνησής τους θεωρείται σημαντικός στον προσδιορισμό της ενεργότητας κατά Raman

Τα φάσματα Raman αποτελούν συνδυασμό αμιγών περιστροφικών φασμάτων και αμιγών δονητικών φασμάτων και καταγράφονται με ευαίσθητα όργανα.

Τα περιστροφικά φάσματα Raman παρέχουν δομικές πληροφορίες για τη δομή των μορίων που θα ήταν αδύνατο να αντληθούν με άλλες

φασματοσκοπικές μεθόδους. Για παράδειγμα διατομικά και χαμηλού μοριακού βάρους τριατομικά μόρια παρουσιάζουν φάσματα Raman με υψηλή διακριτική ικανότητα, αφού από τις αποστάσεις των φασματικών αιχμών είναι δυνατόν να υπολογιστεί το μήκος των δεσμών των μορίων. Τα μόρια αυτά δεν προσφέρονται για φάσματα IR γιατί δεν παρουσιάζουν διπολική ροπή [7,37].

### **6.1.1. Εφαρμογές της φασματοσκοπίας FT-Raman**

Η φασματοσκοπία FT-Raman πλεονεκτεί σε σχέση με τις άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές, στη μελέτη βιολογικών μορίων για τους παρακάτω λόγους [7,37]:

α) Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη ουσιών σε υδατικά διαλύματα γιατί η παρεμβολή των μορίων του νερού στο φάσμα Raman είναι χαμηλή και επομένως ο θόρυβος στο φάσμα της ουσίας που ελαχιστοποιείται.

β) Η ποσότητα του δείγματος που απαιτείται είναι πολύ μικρή.

γ) Είναι εφαρμόσιμη σε βιολογικά μόρια σε κάθε κατάσταση και σε ποικίλες πειραματικές συνθήκες. Είναι δυνατή η λήψη φασμάτων ουσιών από φυτικούς ή ζωικούς ιστούς χωρίς να προηγηθεί εκχύλιση, διαχωρισμός και καθαρισμός τους διότι στη περιοχή του εγγύς-υπέρυθρου που εκπέμπει η πηγή ακτινοβολίας οι ουσίες δεν εκπέμπουν φθορισμό

### **6.2. Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός των κρυστάλλων.**

Απομονωμένοι κρύσταλλοι φύλλων προετοιμάστηκαν όπως περιγράφηκε από τους Kontoyannis et al (1997) τοποθετήθηκαν σε δειγματοφορείς και μελετήθηκαν με φασματοσκοπία FT-Raman. Λήφθηκαν φάσματα των δειγμάτων χρησιμοποιώντας FRA-106/S FT-Raman. Η ακτίνα εκπομπής του laser είχε μήκος κύματος 1064 nm. Πραγματοποιήθηκαν 300 σαρώσεις σε κάθε δείγμα και λήφθηκαν φάσματα των δειγμάτων.

### **III.7. Μέτρησεις με Isotope Ratio Mass Spectrometer (IRMS).**

Δείγματα από βλαστούς, φύλλα και ρίζες από όλους τους χειρισμούς λειοτριβήθηκαν και αποξηράνθηκαν (72h, 65°C). Στη συνέχεια ζυγίστηκαν 0,5mg και τοποθετήθηκαν σε κάψουλες κασσιτέρου (Type A; Thermo Quest, Milan, Italy). Ομοίως ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε κάψουλες και δείγματα απομονωμένων κρυστάλλων. Οι κάψουλες τοποθετήθηκαν σε στοιχειακό αναλυτή (NA2500; GE Instruments, Milan, Italy) ο οποίος είναι συνδεδεμένος με ένα IRMS (Delta Plus; Finnigan MAT GmbH, Bremen, German;') μέσω Conflo II interface (finnigan MAT GmbH, Bremen Germany). Μετρήθηκαν η εκατοστιαία σύσταση των δειγμάτων σε άζωτο (N), σε άνθρακα (C) καθώς και η σύσταση φυτικών ιστών στο <sup>13</sup>C ισότοπο ( $\delta^{13}\text{C}$ ). Οι τιμές του  $\delta^{13}\text{C}$  προσδιορίστηκαν από την ακόλουθη σχέση [87,116]:

$$\delta^{13}\text{C} \text{ ‰} = \left[ \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{άγν. δειγμ.}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}}} - 1 \right] * 1000$$

## ***IV. Αποτελέσματα***





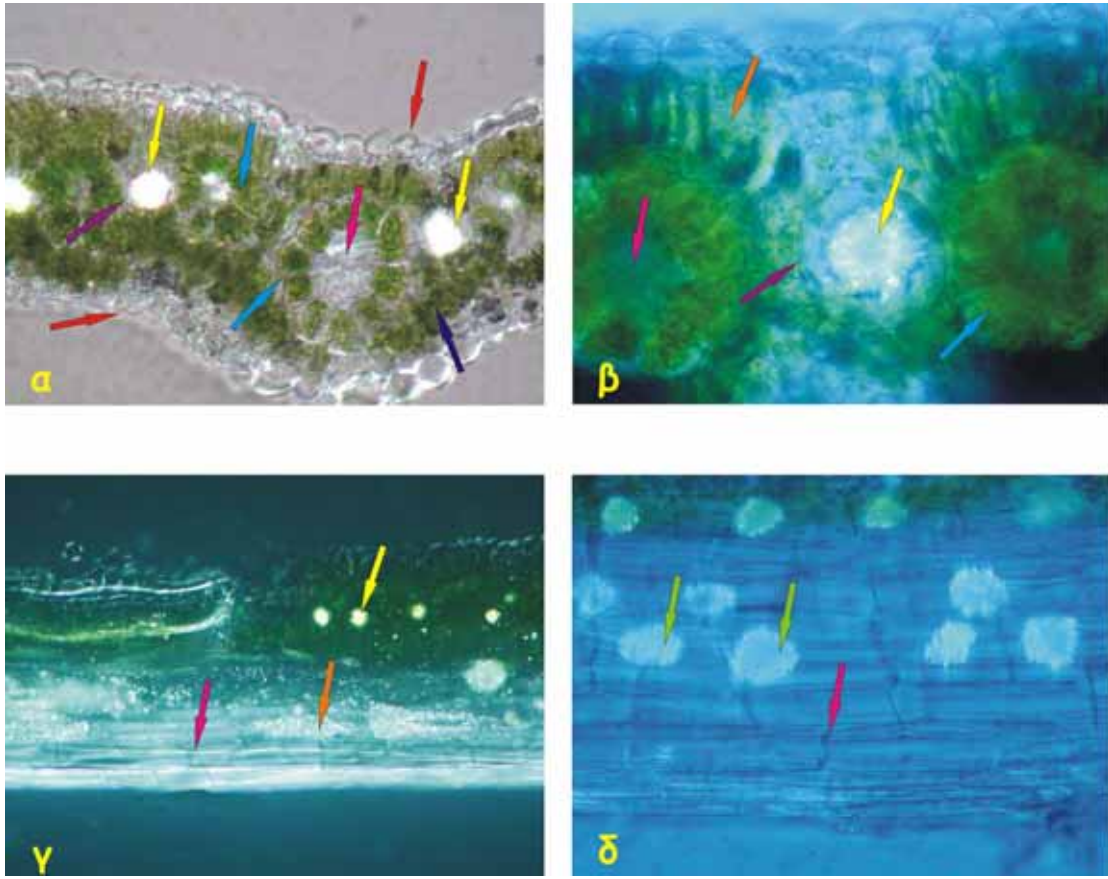
#### **IV.1. Ανατομικές παρατηρήσεις**

Οι κρύσταλλοι στο είδος *Amaranthus sp.* εντοπίζονται κυρίως στο μεσόφυλλο σε ιδιόβλαστα κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε άμεση επαφή με τα κύτταρα του κολεού της δέσμης. Πλησίον των κυττάρων ενός κολεού εντοπίζονται ένας ή δύο ιδιοβλάστες (Εικόνα IV.1.α.). Ο ιδιοβλάστης είναι ογκώδες κύτταρο, με το μέγεθος του να πλησιάζει αυτό του κολεού της ηθμαγγειώδους δεσμίδας. Σε κάθε ιδιοβλάστη διακρίνεται ένας κρύσταλλος ο οποίος φαίνεται να "αιωρείται" εντός του κυττάρου (Εικόνα IV.1.β.). Οι κρύσταλλοι από μορφολογική άποψη χαρακτηρίζονται ως βοτρυόμορφοι και αποτελούνται εξ'ολοκλήρου από οξαλικό ασβέστιο. Στο κοινό οπτικό μικροσκόπιο είναι ιδιαίτερα εμφανείς σε πεδίο πολωμένου φωτός αφού αποπολώνουν το πολωμένο φως (Εικόνα IV.1.). Στο *Amaranthus* παρατηρούνται επίσης κρύσταλλοι εντός της ηθμαγγειώδους δεσμίδας είτε υπό μορφή μοναδιαίων κρυστάλλων είτε κρυσταλλικής άμμου (Εικόνα IV.1.γ. και δ.).

#### **IV.2. Απομόνωση κρυστάλλων**

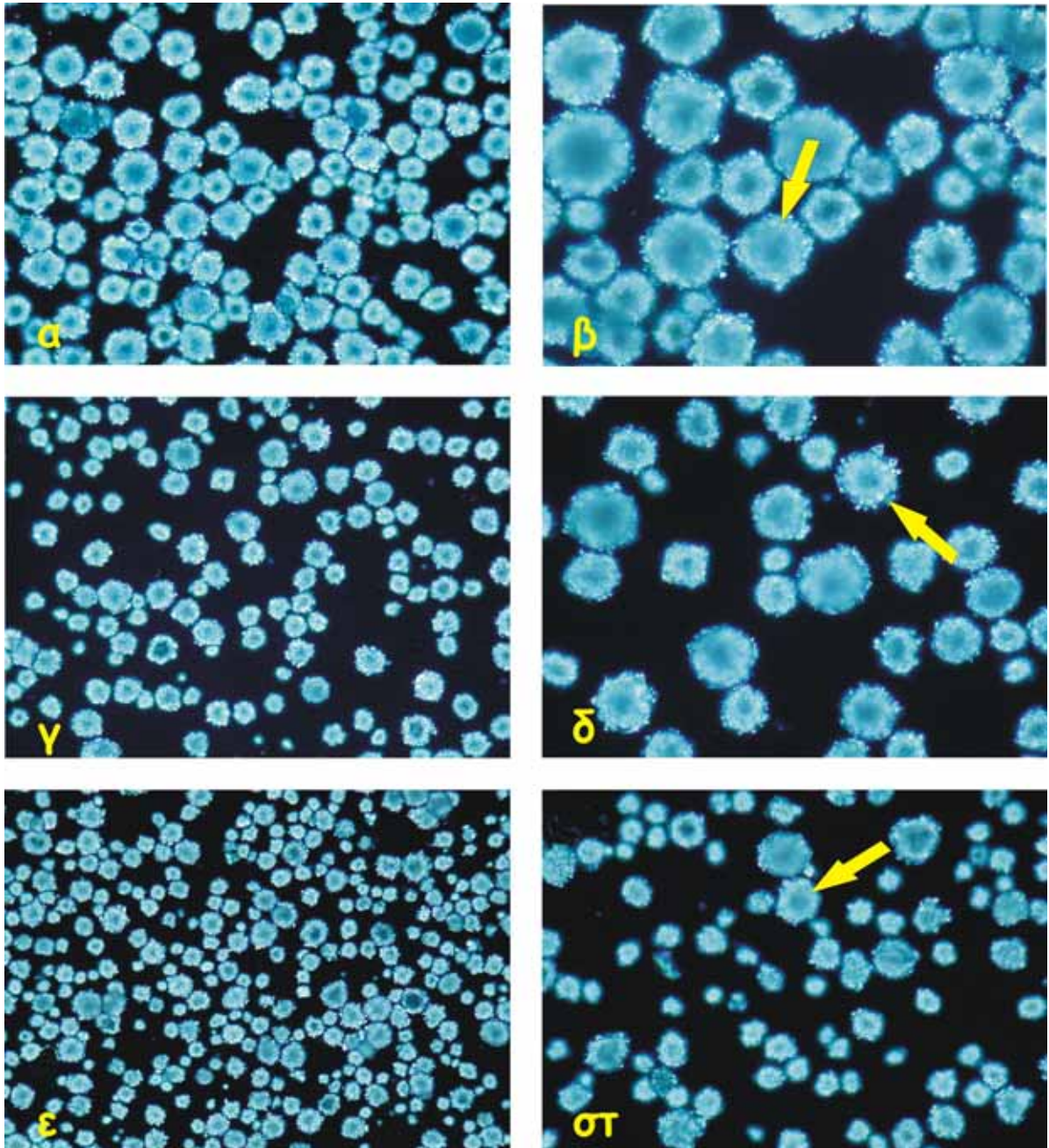
Οι απομονωμένοι κρύσταλλοι (βλ. Υλικά και Μέθοδοι) παρατηρήθηκαν με κοινό οπτικό μικροσκόπιο σε πεδίο πολωμένου φωτός. Οι βοτρυόμορφοι κρύσταλλοι που απομονώνονται από το είδος *Amaranthus sp.* είναι υψηλής καθαρότητας (Εικόνα IV.2.). Η διαφορά στο μέγεθος των κρυστάλλων μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών γίνεται αντιληπτή στα δείγματα των απομονωμένων κρυστάλλων. Εκτός αυτού παρατηρούνται διαφορές όχι μόνο στο μέγεθος αλλά και στη μορφή των κρυστάλλων. Οι κρύσταλλοι από φυτά (-r/+a) και (-r/-a) (Εικόνα IV.2.γ. και δ.) παρουσιάζουν περισσότερο αδρή επιφάνεια έναντι αυτής των φυτών μαρτύρων (Εικόνα IV.2.α. και β.).

## Αποτελέσματα



**Εικόνα IV.1.** Μικροφωτογραφίες νωπών τομών σε φύλλα βλήτου όπως εμφανίζονται σε κοινό οπτικό μικροσκόπιο σε πεδίο πολωμένου φωτός.  
**α. και β.** εγκάρσιες τομές φύλλου στις οποίες διακρίνονται η προσαξονική και η αποσαξονική επιφάνεια του φύλλου (κόκκινα βέλη), οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ροζ βέλη), τα κύτταρα του κολεού της δέσμης (γαλάζια βέλη) τα κύτταρα του μεσοφύλλου (μπλε βέλος), οι ιδιοβλάστες (μωβ βέλη) και οι βοτριομόρφοι κρύσταλλοι (κίτρινα βέλη).  
**γ. και δ.** Επιμήκειες τομές φύλλου στην περιοχή των νευρώσεων. Διακρίνονται οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ροζ βέλος), βοτριομόρφοι κρύσταλλοι στο μεσόφυλλο (κίτρινα βέλη), βοτρυόμορφοι κρύσταλλοι στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα (πράσινα βέλη) και κρυσταλλική άμμος (πορτοκαλί βέλος).

## Αποτελέσματα



**Εικόνα IV.2.** Μικροφωτογραφίες απομονωμένων κρυστάλλων όπως εμφανίζονται σε κοινό οπτικό μικροσκόπιο σε πεδίο πολωμένου φωτός.

**α.** και **β.** Απομονωμένοι κρυστάλλοι από φυτά στα οποία χορηγήθηκε αέρας κανονικής συγκέντρωσης  $\text{CO}_2$  και στο υπέργειο μέρος και στην ρίζα (control).

**γ.** και **δ.** Απομονωμένοι κρυστάλλοι από φυτά στα οποία χορηγήθηκε αέρας κανονικής συγκέντρωσης  $\text{CO}_2$  στο υπέργειο μέρος και μηδενικής συγκέντρωσης στην ρίζα (-r/+a).

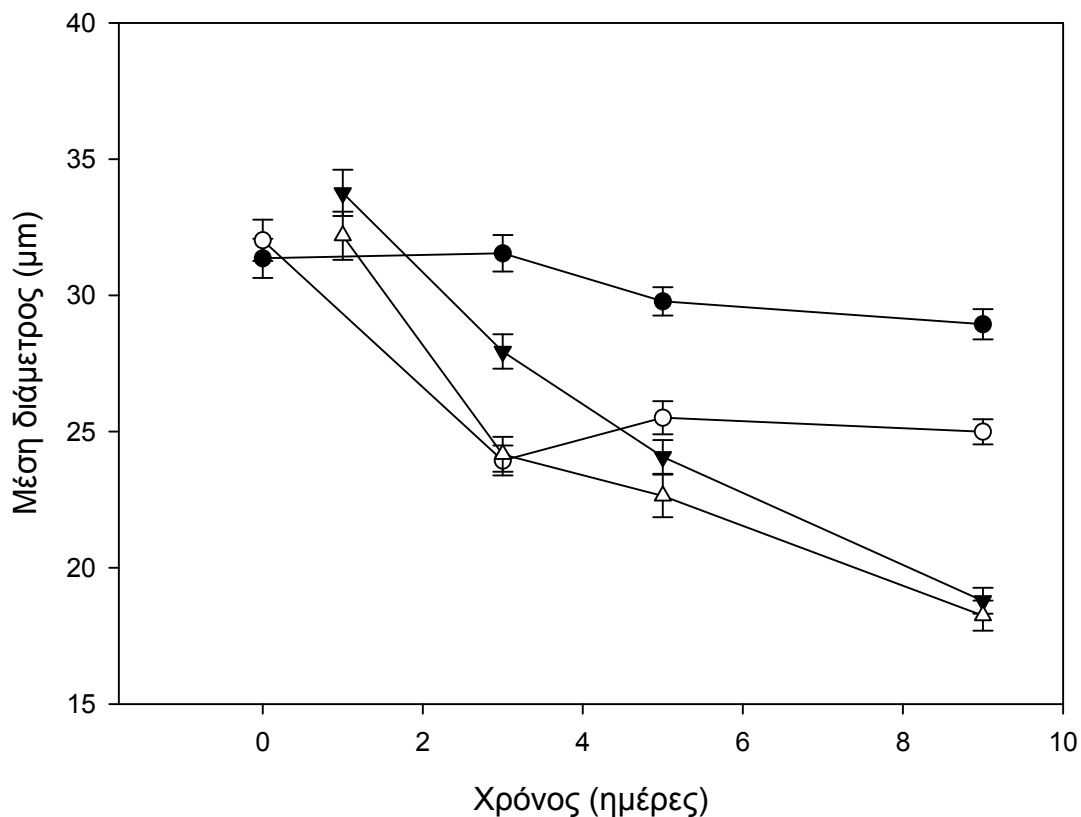
**ε.** και **στ.** απομονωμένοι κρυστάλλοι από φυτά στα οποία χορηγήθηκε αέρας μηδενικής συγκέντρωσης  $\text{CO}_2$  τόσο στο υπέργειο μέρος όσο και στην ρίζα (-r/-a). Με κίτρινα βέλη υποδηλώνεται η επιφάνεια των κρυστάλλων.

Στις φωτογραφίες **δ.** και **στ.** οι κρυστάλλοι παρουσιάζουν περισσότερο αδρή επιφάνεια έναντι αυτών των φυτών μαρτύρων.

### **IV.3. Μετρήση των διαστάσεων των κρυστάλλων.**

Οι πειραματικοί χειρισμοί που περιγράφονται στα Υλικά και Μέθοδοι αποσκοπούσαν στην άμεση εφαρμογή 'πενίας' άνθρακα στα πειραματόφυτα, ώστε να δοθεί απάντηση στο ερώτημα εάν στις συνθήκες αυτές οι κρύσταλλοι αποδομούνται, και επομένως η διάμετρός τους μειώνεται. Για την όσο το δυνατόν αντικειμενικότερη μέτρηση της διαμέτρου των κρυστάλλων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των σταχτογραμμάτων (βλ. Υλικά και Μέθοδοι) ως η πλέον αξιόπιστη, επειδή τα περιγράμματα των κρυστάλλων στο οπτικό μικροσκόπιο παρουσιάζονται περισσότερο ευκρινή. Στην εικόνα IV.4. δίδονται ενδεικτικές μικροφωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο με διερχόμενο φωτισμό σταχτογραμμάτων φύλλων διαφορετικών πειραματικών χειρισμών (βλ. Υλικά και Μέθοδοι), στις οποίες οι διαφορές είναι εμφανείς. Στον χειρισμό στον οποίο στα φυτά χορηγήθηκε αέρας κανονικής συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> (360-370 ppm CO<sub>2</sub>) τόσο στο υπέργειο μέρος, όσο και στη ρίζα (φυτά μάρτυρες) οι κρύσταλλοι εμφανίζονται ευμεγέθεις και ευδιάκριτοι (Εικόνα IV.4.γ). Όταν στα φυτά χορηγήθηκε αέρας μηδενικής συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> στην ρίζα και κανονικής συγκέντρωσης στο υπέργειο μέρος (-r/+a), η διάμετρος των κρυστάλλων και κατά συνέπεια το μέγεθός τους μειώθηκε (Εικόνα IV.4.ε.). Ωστόσο, η διάμετρος των κρυστάλλων παρουσιάζεται αισθητά μικρότερη, όταν στα φυτά εφαρμόστηκε πλήρης πενία άνθρακα (αέρας μηδενικής συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> τόσο στην ρίζα όσο και στο υπέργειο μέρος (-r/-a) (Εικόνα IV.4.α. και β.). Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν όταν στα φυτά χορηγήθηκε αέρας κανονικής συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> στην ρίζα, αλλά μηδενικής συγκέντρωσης στο υπέργειο μέρος (+r/-a) (Εικόνα IV.4.δ.).

## Αποτελέσματα

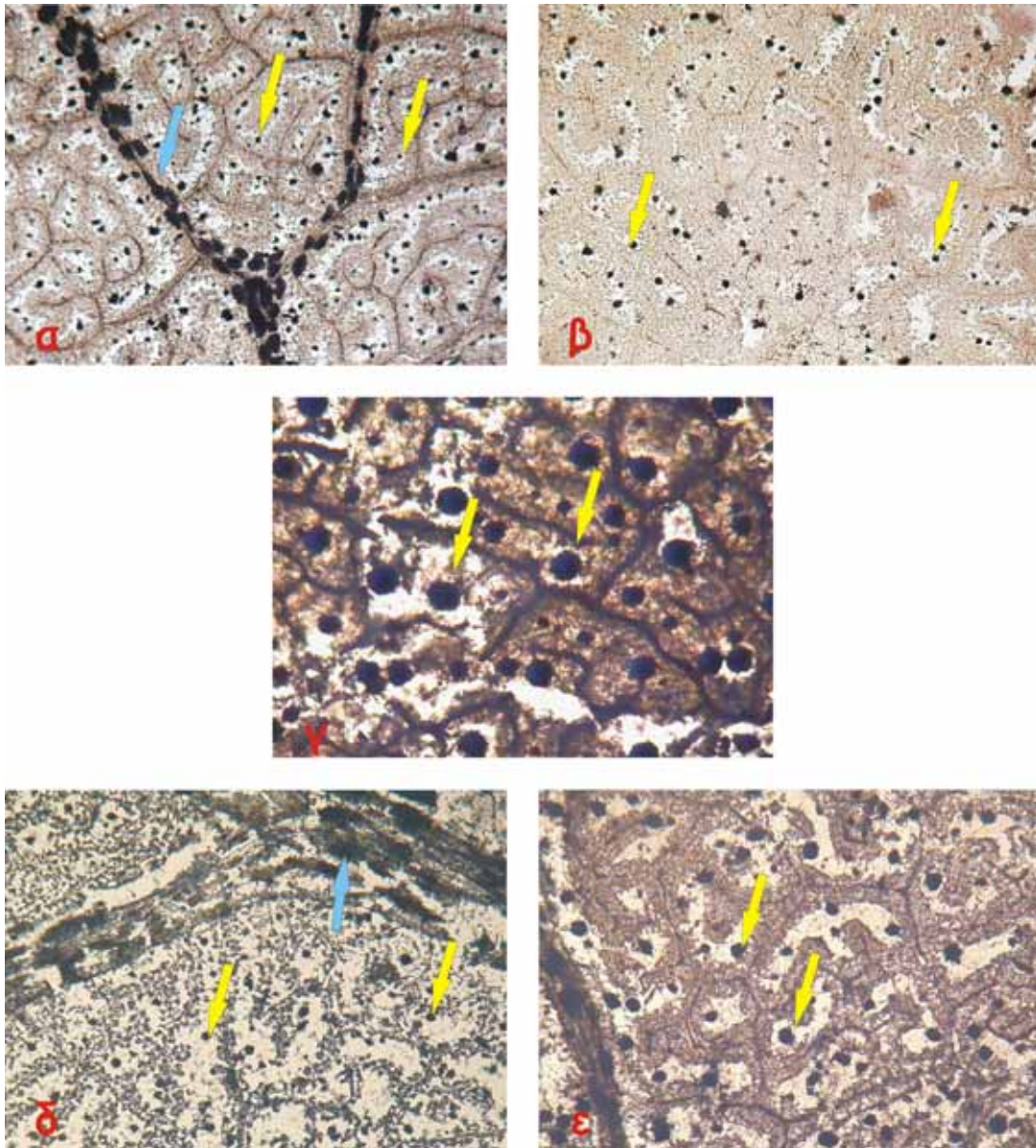


**Εικόνα IV.3.** Η μέση διάμετρος των κρυστάλλων συναρτήσει του χρόνου στους διάφορους πειραματικούς χειρισμούς. Με μαύρους κύκλους απεικονίζονται τα φυτά-μάρτυρες και με άσπρους ο χειρισμός (-r/+a) ενώ με μαύρα τρίγωνα ο χειρισμός (+r/-a) και με άσπρα ο χειρισμός (-r/-a).

Η διαφορά που παρατηρείται στα σταχογράμματα, αντικατοπτρίζεται και στις μετρήσεις της διαμέτρου των κρυστάλλων. Στην εικόνα IV.3. παρουσιάζεται η διακύμανση της διαμέτρου συναρτήσει του χρόνου στους ίδιους πειραματικούς χειρισμούς. Αξίζει να σημειωθεί ότι στους χειρισμούς (+r/-a) και (-r/-a) εφαρμόζεται πενία άνθρακα την ημέρα μηδέν και η πρώτη δειγματοληψία γίνεται την πρώτη ημέρα του πειράματος. Η διάμετρος των κρυστάλλων στα φυτά-μάρτυρες παρουσιάζει σχετική σταθερότητα με μικρές αυξομειώσεις στη πορεία του πειράματος. Στα φυτά (-r/+a) παρουσιάζεται απότομη μείωση στη διάμετρο των κρυστάλλων την τρίτη μέρα του πειράματος η οποία αμβλύνεται στη συνέχεια. Η απότομη αυτή μείωση



## Αποτελέσματα



**Εικόνα IV.4.** Μικροφωτογραφίες σταχτογραμμμάτων φύλλων από διαφορετικούς πειραματικούς χειρισμούς όπως εμφανίζονται σε κοινό οπτικό μικροσκόπιο με διερχόμενο φωτισμό.

**α.** και **β.** σταχτογράμματα από φυτά στα οποία χορηγήθηκε αέρας μηδενικής συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> και στο υπέργειο μέρος και στην ρίζα (-r/-a).

**γ.** σταχτόγραμμα από φυτά-μάρτυρες, στα οποία χορηγήθηκε αέρας κανονικής συγκέντρωσης CO<sub>2</sub>, τόσο στο υπέργειο μέρος όσο και στην ρίζα

**δ.** σταχτόγραμμα από φυτά στα οποία χορηγήθηκε αέρας μηδενικής συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> στο υπέργειο μέρος και κανονικής συγκέντρωσης στην ρίζα (+r/-a)

**ε.** σταχτόγραμμα από φυτά στα οποία χορηγήθηκε αέρας κανονικής συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> στο υπέργειο μέρος και μηδενικής συγκέντρωσης στην ρίζα (-r/+a). Με κίτρινα βέλη υποδεικνύονται οι κρύσταλλοι στο μεσόφυλλο και με γαλάζια βέλη οι κρύσταλλοι στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες.

πιθανόν να οφείλεται στην καταπόνηση στην οποία υπόκεινται τα φυτά με την απομάκρυνση του CO<sub>2</sub> από τη ρίζα τους. Στο χειρισμό (-r/-a) όπως επίσης και στο χειρισμό (+r/-a) η διάμετρος των κρυστάλλων μειώνεται σταδιακά. Η διάμετρος των κρυστάλλων των φυτών (-r/-a) από την τιμή 32,19 μm μειώθηκε στην τιμή 18,25 μm. Αντίστοιχα η διάμετρος των κρυστάλλων στο χειρισμό (+r/-a) από την τιμή 33,76 μm μειώθηκε στην τιμή 18,79 μm. Από το παραπάνω διάγραμμα καθώς και από τις φωτογραφίες των σταχτογραμμάτων προκύπτει ότι οι κρύσταλλοι πιθανότατα αποτελούν ένα δυναμικό σύστημα αποθήκευσης C υπό μορφή οξαλικού ασβεστίου.

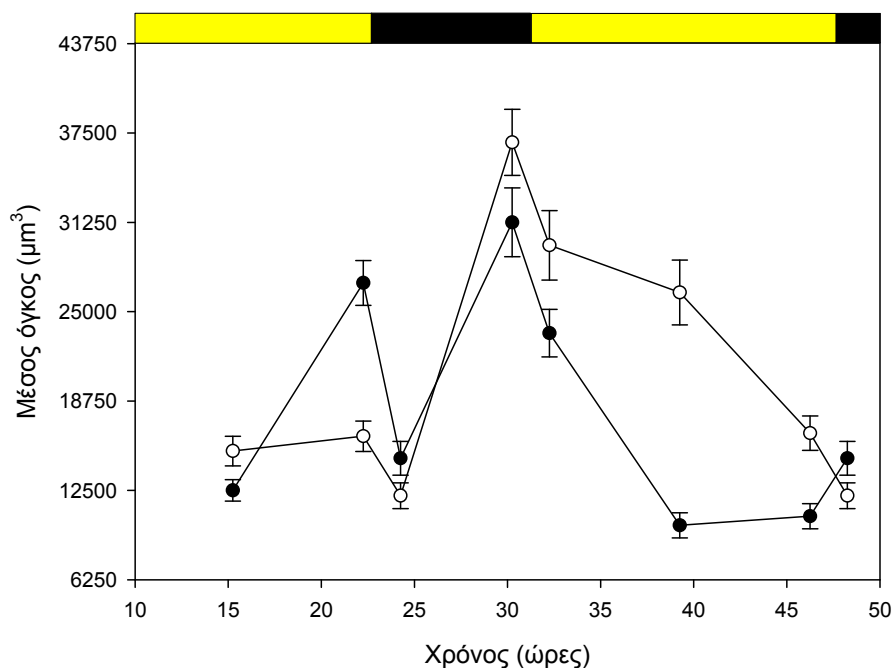
#### **IV.4. Μετρήσεις των ημερονύκτιων διακυμάνσεων των διαστάσεων των κρυστάλλων και ορισμένων φυσιολογικών παραμέτρων.**

Με βάση την υπόθεση εργασίας, ότι οι κρύσταλλοι αποτελούν ένα δυναμικό και συνεχώς μεταβαλλόμενο σύστημα αποθήκευσης οργανικού άνθρακα, διερευνήθηκαν οι πιθανές μεταβολές στις διαστάσεις των κρυστάλλων στη διάρκεια ημερονύκτιου κύκλου διάρκειας 33 ωρών. Καταγράφηκαν αφενός μεν οι διαστάσεις των κρυστάλλων (Εικόνα IV.5.) σε τακτά χρονικά διαστήματα αφετέρου φυσιολογικές παράμετροι όπως η φωτοσύνθεση (Εικόνα IV.6.) και η αγωγιμότητα των στοματίων (Εικόνα IV.7.), προκειμένου να διαπιστωθεί πιθανή συσχέτιση των παραμέτρων αυτών με τις διαστάσεις των κρυστάλλων.

Στην εικόνα IV.5. φαίνεται ότι οι κρύσταλλοι κατά το τέλος της νυχτερινής περιόδου αποκτούν τον μέγιστο, ενώ προς το τέλος της ημερήσιας περιόδου τον ελάχιστο όγκο τους. Κατά τη διάρκεια της ημέρας παρατηρείται μερική αποδόμηση των κρυστάλλων.

Η φωτοσύνθεση παρουσιάζει αναμενόμενη πορεία (Εικόνα IV.6.). Κατά τη διάρκεια της νύκτας η φωτοσυνθετική ταχύτητα είναι μηδενική ενώ κατά τη διάρκεια της μέρας τα φυτά φωτοσυνθέτουν κανονικά.

## Αποτελέσματα



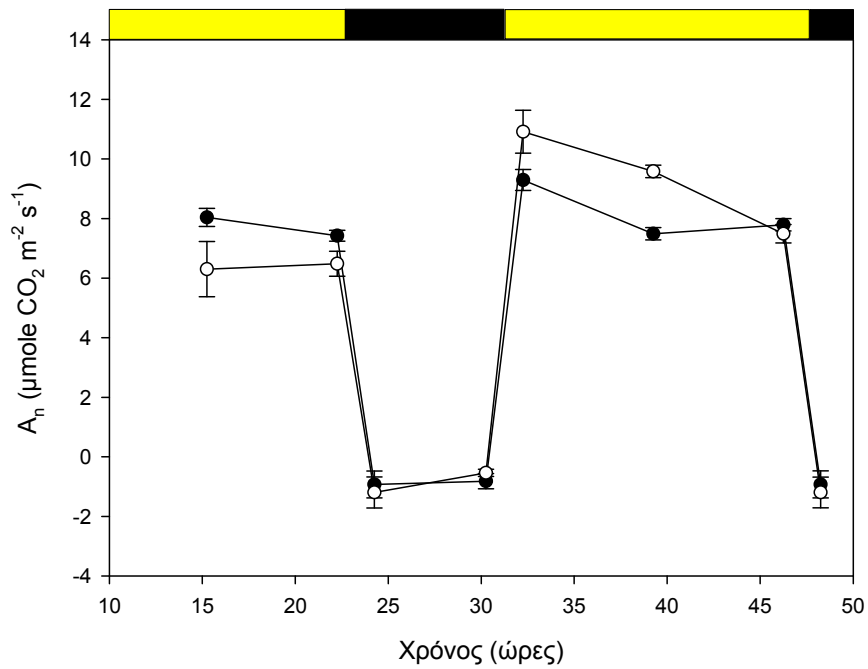
**Εικόνα IV.5.** Ο μέσος όγκος των κρυστάλλων συναρτήσει του χρόνου στους δύο χειρισμούς. Με μαύρους κύκλους απεικονίζονται τα φυτά μάρτυρες ενώ με άσπρους κύκλους ο χειρισμός (-r/+a).

Αντίστοιχα η στοματική αγωγιμότητα (Εικόνα IV.7.) παρουσιάζεται αυξημένη τη μέρα αφού τα στομάτια είναι ανοικτά για ανταλλαγή αερίων ενώ το βράδυ που δεν λειτουργεί η φωτοσύνθεση τα στομάτια παραμένουν κλειστά.

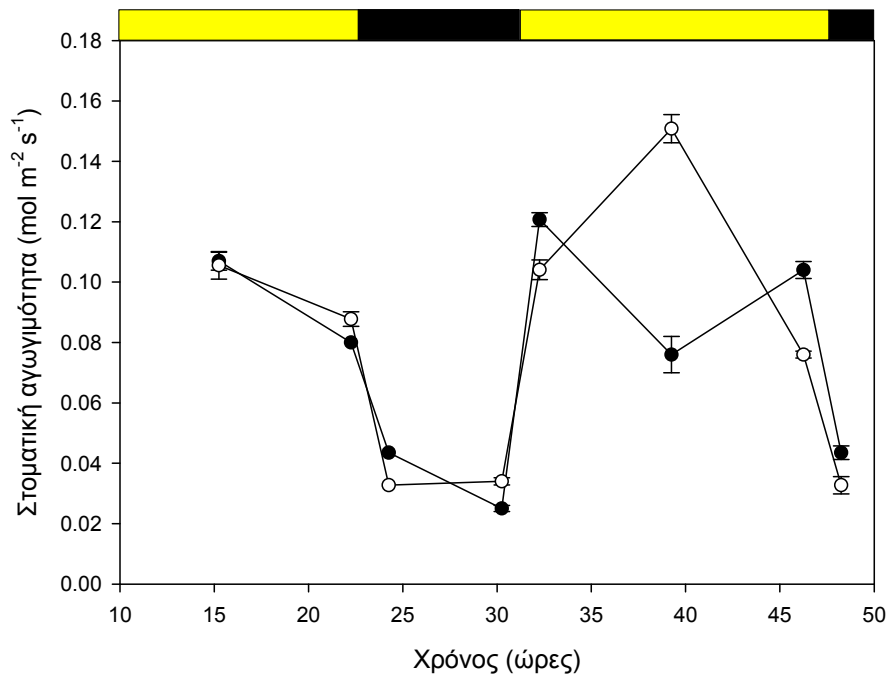
Παρατηρούμε ότι στο μέσο της δεύτερης φωτοπεριόδου (στις 40 ώρες) ο όγκος των κρυστάλλων στον χειρισμό (-r/+a) είναι πολύ μεγαλύτερος από τον όγκο των κρυστάλλων των φυτών μαρτύρων. Την ίδια ώρα παρατηρείται αυξημένη η στοματική αγωγιμότητα των φυτών του χειρισμού (-r/+a) έναντι των φυτών μαρτύρων.



## Αποτελέσματα



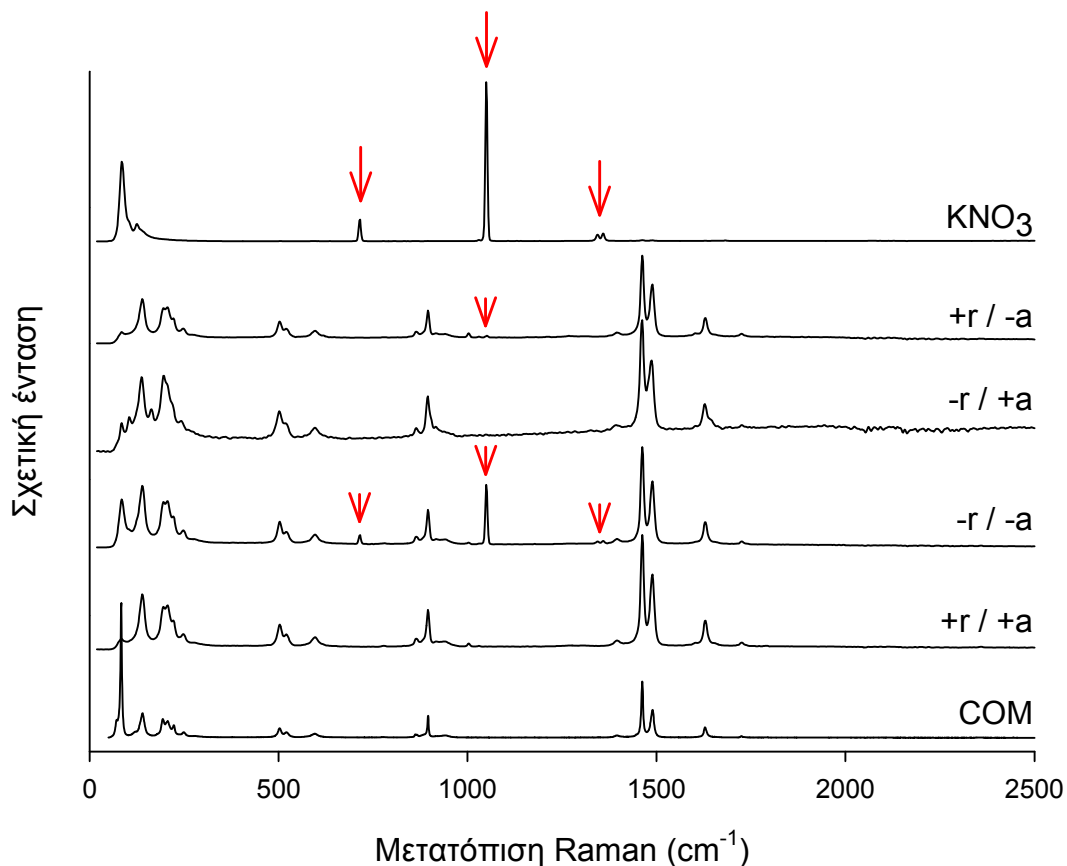
**Εικόνα IV.6.** Η φωτοσυνθετική ταχύτητα των φυτών συναρτήσει του χρόνου στους δύο χειρισμούς. Με μαύρους κύκλους απεικονίζονται τα φυτά-μάρτυρες ενώ με άσπρους κύκλους ο χειρισμός (-r/+a).



**Εικόνα IV.7.** Η στοματική αγωγιμότητα των φυτών συναρτήσει του χρόνου στους δύο χειρισμούς. Με μαύρους κύκλους απεικονίζονται τα φυτά-μάρτυρες ενώ με άσπρους κύκλους ο χειρισμός (-r/+a).

#### IV.5. Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός των κρυστάλλων με τη μέθοδο FT-Raman.

Απομονωμένοι κρύσταλλοι από όλους τους πειραματικούς χειρισμούς μελετήθηκαν με φασματοσκοπία FT-Raman. Τα φάσματα FT-Raman παρουσιάζονται στην εικόνα IV.8.



**Εικόνα IV.8.** Φάσματα FT-Raman των τεσσάρων πειραματικών χειρισμών και φάσματα των δειγμάτων αναφοράς του Μονοένυδρου οξαλικού ασβεστίου (COM) και KNO<sub>3</sub>. Τα βέλη δείχνουν τρεις χαρακτηριστικές κορυφές του KNO<sub>3</sub> ενώ οι κεφαλές των βελών κορυφές οι οποίες συμπίπτουν με αυτές του δείγματος αναφοράς KNO<sub>3</sub>.

Σε όλα τα φάσματα που ελήφθησαν κυρίαρχη ήταν η παρουσία του Μονοένυδρου Οξαλικού Ασβεστίου (COM). Στους κρυστάλλους που απομονώθηκαν από τα φυτά στα οποία χορηγήθηκε αέρας χωρίς CO<sub>2</sub> τόσο στο υπέργειο μέρος όσο και στην ρίζα (-r/-a) ανιχνεύθηκε, εκτός από Μονοένυδρο Οξαλικό Ασβέστιο, και έντονη παρουσία νιτρικού καλίου (KNO<sub>3</sub>).

## **Αποτελέσματα**

Όπως φαίνεται στην εικόνα IV.8. στην περιοχή  $800-1400\text{ cm}^{-1}$  του φάσματος εντοπίζεται η κύρια κορυφή του δείγματος αναφοράς  $\text{KNO}_3$  καθώς και μια ισχυρή κορυφή  $\text{KNO}_3$  στους κρυστάλλους των φυτών (-r/-a).

Παρουσία νιτρικού καλίου παρατηρήθηκε επίσης, αλλά σε μικρότερες ποσότητες στους κρυστάλλους από τα φυτά στα οποία χορηγήθηκε  $\text{CO}_2$  μόνο στη ρίζα (+r/-a).

Κορυφή που να υποδηλώνει την παρουσία  $\text{KNO}_3$  δεν παρατηρήθηκε στους κρυστάλλους από φυτά-μάρτυρες και από φυτά στα οποία χορηγήθηκε στη ρίζα αέρας χωρίς  $\text{CO}_2$  (-r/+a).

Συμπερασματικά οι κορυφές του  $\text{KNO}_3$  εμφανίζονται στα δείγματα των κρυστάλλων που προέρχονται από φυτά στα οποία το υπέργειο μέρος τους αέρας χωρίς  $\text{CO}_2$ . Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι πιθανόν σε περίπτωση που στο περιβάλλον των φυτών δεν υπάρχουν επαρκείς ποσότητες  $\text{CO}_2$ , όχι μόνο αποδομούνται οι κρύσταλλοι αλλά εναποτίθεται σ' αυτούς  $\text{KNO}_3$ .

### **IV.6. Μετρήσεις με Isotope Ratio Mass Spectrometer (IRMS).**

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων από στοιχειακό αναλυτή σε ιστούς φυτών και σε κρυστάλλους των πειραματικών χειρισμών παρουσιάζονται στον Πίνακα IV.1.

Οι τιμές του  $\delta^{13}\text{C}$  των φυτικών ιστών είναι χαρακτηριστικές για  $\text{C}_4$  φυτό ενώ παρατηρούμε ότι μεταξύ των πειραματικών χειρισμών οι τιμές δεν διαφέρουν σημαντικά. Σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των τιμών του  $\delta^{13}\text{C}$  στην ρίζα όπου παρουσιάζεται το  $\delta^{13}\text{C}$  της ρίζας στο χειρισμό (-r/-a)

## **Αποτελέσματα**

Πίνακας IV.1. Μετρήσεις από Isotope Ratio Mass Spectrometer της εκατοστιαίας σύστασης δειγμάτων σε άζωτο (N), σε άνθρακα (C) καθώς και η σύσταση φυτικών ιστών στο <sup>13</sup>C ισότοπο ( $\delta^{13}\text{C}$ ). Όλες οι μετρήσεις αποτελούν μέσο όρο τριών επαναλήψεων εκτός από την τελευταία των κρυστάλλων (+r/-a) που είναι μια και μόνο μέτρηση.

Δείγματα	Χειρισμός	% N	% C	$\delta^{13}\text{C}$
	Control	4.80	39.68	-16.98
Φύλλα	-r/+a	4.98	41.98	-16.17
	-r/-a	6.89	40.97	-16.36
	control	3.52	37.64	-16.87
Βλαστός	-r/+a	2.61	34.82	-16.39
	-r/-a	3.88	30.30	-16.87
	Control	3.77	40.28	-16.29
Ρίζα	-r/+a	3.32	41.64	-16.25
	-r/-a	3.18	38.96	-17.26
	Control	-	16.54	-7.22
Κρυστάλλοι	-r/+a	-	15.60	-8.35
	-r/-a	-	14.06	-8.95
	+r/-a	-	16.16	-4.55

### ***Αποτελέσματα***

περισσότερο αρνητικό. Η διαφορά αυτή δείχνει ότι η ρίζα χάνει πιθανόν το CO<sub>2</sub> από την λειτουργία της αναπνοής το οποίο είναι εμπλουτισμένο σε <sup>13</sup>C.

Σημαντική διαφορά υπάρχει και μεταξύ των τιμών του δ<sup>13</sup>C της βιομάζας και των κρυστάλλων. Οι κρύσταλλοι έχουν λιγότερο αρνητικές τιμές γεγονός που υποδηλώνει την διαφορετική προέλευση του άνθρακα των κρυστάλλων.



## *V. Συζήτηση*





## Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να μελετηθούν ανατομικά οι ιδιοβλάστες στο είδος *Amaranthus sp.* και να διερευνηθεί ο φυσιολογικός τους ρόλος. Οι κρύσταλλοι αποτελούν οργανικά χυμοτοπιακά έγκλειστα και σχηματίζονται εντός εξειδικευμένων κυττάρων, των ιδιοβλαστών. Από μορφολογική άποψη οι κρύσταλλοι χαρακτηρίζονται ως βοτρυόμορφοι και εντοπίζονται σε ιδιόβλαστα κύτταρα στο μεσόφυλλο σε επαφή με τους κολεούς της δέσμης, διαπίστωση που έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές [23,105]. Οι παρατηρήσεις μας επιβεβαίωσαν επίσης την παρουσία κρυσταλλικής άμμου και μοναδιαίων κρυστάλλων εντός της ηθμαγγειώδους δεσμίδας [16,80,105].

Επιχειρήθηκε επίσης να δοθεί απάντηση στην υπόθεση εργασίας σύμφωνα με την οποία οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου, και πιθανόν συναφείς δομές όπως οι κυστόλιθοι, αποτελούν δυναμικά συστήματα που εξυπηρετούν πρωτίστως τη διαχείριση των αποθεμάτων οργανικού άνθρακα, και όχι του ασβεστίου. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, τα αποθέματα οργανικού άνθρακα των κρυστάλλων μπορούν να αποτελέσουν ένα εν δυνάμει υπόστρωμα για τη φωτοσυνθετική αφομοίωση άνθρακα. Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκαν δεδομένα τα οποία σχετίζονται με τη δομή, τη θέση και τη συμπεριφορά των ιδιοβλαστών που συσσωρεύουν κρυστάλλους στο μεσόφυλλο του βλήτου. Λόγω θέσης, θα μπορούσαν κάλλιστα να επιτελέσουν το ρόλο των εναλλακτικών πηγών άνθρακα για τη φωτοσυνθετική λειτουργία.

Περαιτέρω, επιχειρήθηκε να διερευνηθεί το βάσιμο της υπόθεσης εργασίας σύμφωνα με την οποία η απόδοση των αποθεμάτων άνθρακα των κρυστάλλων πραγματοποιείται υπό συνθήκες αδυναμίας τροφοδοσίας με CO<sub>2</sub> από το εξωτερικό εναέριο περιβάλλον και ανθρακικών ανιόντων από το θρεπτικό μέσο. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα τα οποία είχαν ως στόχο να αποκλειστεί η τροφοδοσία άνθρακα προς τα φωτοσυνθετικά κύτταρα, χορηγώντας αέρα μηδενικής συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> είτε στη ρίζα (-r/+a) είτε στην ατμόσφαιρα. Εφαρμόστηκε επίσης πλήρης πενία άνθρακα (-r/-a). Σε

## Συζήτηση

όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε ελάττωση του μεγέθους των κρυστάλλων η οποία ήταν μεγαλύτερη στα φυτά (-r/-a) και (+r/-a) στα φυτά δηλαδή των οποίων η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα ήταν μηδενική. Ορισμένοι ερευνητές είχαν διαπιστώσει κατά το παρελθόν ότι οι ήδη σχηματισμένοι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου μπορεί να αποδομηθούν και να μην είναι ορατοί στο μικροσκόπιο σε ορισμένα στάδια του βιολογικού κύκλου ορισμένων φυτικών ειδών [27,80 και η συναφής βιβλιογραφία που αναφέρεται στα άρθρα αυτά]. Η διαπίστωση ότι οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου αποτελούν ένα δυναμικό σύστημα, ικανό να αποδώσει σκελετούς άνθρακα (και ιόντα ασβεστίου) στα φωτοσυνθετικά κύτταρα, έχει αναφερθεί και για ανάλογες δομές, όπως οι κυστόλιθοι [30,127]. Ο Freisleben (1933) είχε διαπιστώσει ότι εάν τα φυτά *Ficus* αναπτυχθούν σε ατμόσφαιρα με μηδενική συγκέντρωση, μόνο υποτυπώδεις κυστόλιθοι σχηματίζονται. Η Λουρίδα (2005) παρατήρησε ότι οι ήδη σχηματισμένοι κυστόλιθοι αποδομούνται μέσα σύντομο χρονικό διάστημα εάν τα φυτά εγκλειστούν σε ατμόσφαιρα μηδενικής συγκέντρωσης CO<sub>2</sub>. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι κρύσταλλοι, όπως και οι κυστόλιθοι, δεν αποτελούν μια στατική δεξαμενή αποθήκευσης ιόντων ασβεστίου τα οποία βρίσκονται σε περίσσεια, αλλά ένα δυναμικό σύστημα, το οποίο έχει τη δυνατότητα να αποδώσει εκ νέου τα αποθηκευμένα ιόντα στο κυτταρικό περιβάλλον (αφομοίωση μέσω της φωτοσυνθετικής οδού), όταν αυτό το επιβάλλουν οι συνθήκες.

Η δυνατότητα αποδόμησης των κυστολίθων σε συνθήκες μηδενικής συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα [30,127] ενισχύει την υπόθεση σύμφωνα με την οποία τα είδη φυτών που διαθέτουν κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου ή κυστόλιθους είναι δυνατή η αφομοίωση CO<sub>2</sub> ανεξάρτητα από την ταχύτητα διάχυσης του CO<sub>2</sub> από την ατμόσφαιρα προς τα φωτοσυνθετικά κύτταρα μέσω των στοματίων (δηλ. ανεξάρτητα από το άνοιγμα των στοματίων), για ένα τουλάχιστον περιορισμένο χρονικό διάστημα. Με τον τρόπο αυτό ελαχιστοποιούνται οι απώλειες νερού και παρέχεται προσαρμοστικό πλεονέκτημα σε συνθήκες που ευνοούν τις έντονες απώλειες νερού σε συνδυασμό με ξηρασία. Επιπλέον η αποδόμηση των κρυστάλλων οξαλικού

## Συζήτηση

ασβεστίου (ή των κυστολίθων ) είναι δυνατό να αντιπροσωπεύει τη μοναδική οδό χορήγησης CO<sub>2</sub> για φωτοσυνθετικούς ιστούς οι οποίοι δεν διαθέτουν στομάτια (π.χ. νεαρά αναπτυσσόμενα φύλλα, καρποί ή βλαστοί). Η απόδοση στο αέριο περιβάλλον των φωτοσυνθετικών κυττάρων ακόμη και περιορισμένων ποσοτήτων CO<sub>2</sub> σε συνθήκες αδυναμίας ανταλλαγής αερίων με την περιβάλλουσα ατμόσφαιρα παρέχει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα:

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

2. Αποτρέπεται η φωτοπαρεμπόδιση. Το φαινόμενο της φωτοπαρεμπόδισης μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες για τη φωτοσυνθετική συσκευή όταν σε συνθήκες άπλετου φωτισμού (δηλ. πλήρους ενεργειακής παροχής) η διαθεσιμότητα CO<sub>2</sub> είναι περιορισμένη (όταν δηλ. τα στομάτια παραμένουν κλειστά) [125].

3. Δίδεται η δυνατότητα ανάκτησης του CO<sub>2</sub> το οποίο απελευθερώνεται μέσω της αναπνοής (του υπέργειου, αλλά και του υπόγειου τμήματος του φυτού) και επομένως εξοικονομούνται σκελετοί άνθρακα. Το φαινόμενο αυτό θα πρέπει να έχει ιδιαίτερη σημασία στους καρπούς.

4. Αποτρέπεται η άνοδος της συγκέντρωσης του CO<sub>2</sub> σε τοξικά επίπεδα στα κύτταρα, τουλάχιστον στη διάρκεια της νύκτας, όταν τα στόματα παραμένουν κλειστά και δεν υπάρχει δυνατότητα φωτοσυνθετικής αφομοίωσης του εκλυόμενου αναπνευστικού CO<sub>2</sub>.

5. Γίνεται πιθανή η τροφοδοσία με ανόργανο άνθρακα από το υπόγειο τμήμα του φυτού ή από το έδαφος. Με τον τρόπο αυτό δίδεται η δυνατότητα πλήρους ανεξαρτητοποίησης της φωτοσυνθετική λειτουργίας από τη παροχή CO<sub>2</sub> μέσω της ατμόσφαιρας. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι έχει αναφερθεί τουλάχιστον μία περίπτωση φυτικού είδους το οποίο δεν διαθέτει στομάτια στα υπέργεια όργανα και η τροφοδοσία με ανόργανο άνθρακα γίνεται αποκλειστικά από το έδαφος [48]. Εκτός αυτού, πρόσφατα δεδομένα

## Συζήτηση

υποστηρίζουν ότι η τροφοδοσία των φωτοσυνθετικών κυττάρων του βλαστού με ανόργανο άνθρακα επιτελείται και μέσω της ρίζας [14,40,110].

Όπως είναι φυσικό, το προτεινόμενο μοντέλο προσφέρει τα πλεονεκτήματα που προαναφέρθηκαν κάτω από ορισμένες μόνο συνθήκες. Και αυτό γιατί η σύνθεση και η διάσπαση των κρυστάλλων, καθώς και η δημιουργία και συντήρηση εξαιρετικά εξειδικευμένων κυττάρων όπως οι ιδιοβλαστες, συνεπάγεται υψηλό μεταβολικό κόστος. Ανάλογο μεταβολικό κόστος απαιτεί και η λειτουργία των εναλλακτικών βιοχημικών οδών αφομοίωσης CO<sub>2</sub> που λειτουργούν στα C<sub>4</sub> και CAM φυτά, ωστόσο παρέχουν προσαρμοστικό πλεονέκτημα κάτω από ορισμένες συνθήκες.

Τα πειράματα επίσης της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι το μέγεθος των κρυστάλλων παρουσιάζει ημερονύκτιες διακυμάνσεις. Οι Seal and Sen (1970) είχαν παρατηρήσει ημερονύκτιες διακυμάνσεις στο περιεχόμενο σε οξαλικό οξύ στο φυτό *Oxalis corniculata*. Σύμφωνα με τα δικά μας αποτελέσματα το μέγεθος των κρυστάλλων ελαττώνεται κατά τη διάρκεια της ημέρας και αυξάνεται κατά τη διάρκεια της νύκτας. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι η ποσότητα οξαλικού ασβεστίου που εναποτίθεται στους κρυστάλλους βρίσκεται υπό συνεχή έλεγχο. Κατά τη διάρκεια της ημέρας ένα ποσοστό του οξαλικού ασβεστίου διασπάται και τα ανθρακικά ανιόντα που προκύπτουν χρησιμοποιούνται για τη φωτοσύνθεση ενώ κατά τη διάρκεια της νύκτας οι κρυστάλλοι ανακτούν τις διαστάσεις τους πιθανόν μέσω εναπόθεσης οξαλικού ασβεστίου του οποίου ο άνθρακας προέρχεται από την αναπνοή. Οι μετρήσεις της διαπνοής και της στοματικής αγωγιμότητας επιβεβαίωσαν ότι τα στομάτια παρέμεναν κλειστά, συνεπώς η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> έφθανε πιθανόν σε πολύ υψηλά επίπεδα στο εσωτερικό του φύλλου. Η κατάλληλη τοποθέτηση των ιδιοβλαστών στο μεσόφυλλο του βλήτου, μεταξύ των κυττάρων του μεσοφύλλου αλλά και των δεσμικών κολεών επιτρέπει την παγίδευση του εκλυόμενου αναπνευστικού CO<sub>2</sub> το οποίο μπορεί να προέρχεται, τόσο από το υπέργειο, όσο και από το υπόγειο τμήμα του φυτού. Η ύπαρξη κρυστάλλων και στην περιοχή των ηθμαγγειωδών δεσμιδίων

## Συζήτηση

υποδεικνύει ότι είναι πιθανή η μεταφορά αναπνευστικού CO<sub>2</sub> από το υπόγειο τμήμα και εναπόθεση του με τη μορφή κρυστάλλων, αρχικά στην περιοχή των δεσμίδων. Είναι χαρακτηριστικό ότι σε ορισμένα τουλάχιστον δείγματα ότι οι κρύσταλλοι αυτοί δεν αποδομήθηκαν παρά την εφαρμογή πενίας άνθρακα στα πειραματόφυτα (Εικόνα IV.3.2.α. και δ.). Οι Zindler-Frank *et al.* (2000) αναφέρουν την παρουσία κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου κυρίως στην περιοχή της ηθμαγγειώδους δεσμίδας στο φυτό *Phaseolus vulgaris*. Θεωρείται πιθανό ότι η αποδόμηση των κρυστάλλων εντείνεται σε περιόδους κατά τις οποίες τα στομάτια είναι κλειστά και επομένως δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί ανταλλαγή αερίων. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και για τους κυστόλιθους [127].

Στα φάσματα Raman που ελήφθησαν από τους διαφορετικούς πειραματικούς χειρισμούς κυρίαρχη ήταν η παρουσία του Μονοένυδρου Οξαλικού Ασβεστίου (COM). Επομένως επιβεβαιώθηκε και φασματοσκοπικά ότι οι κρύσταλλοι στο βλήτο αποτελούνται από μονοένυδρο οξαλικό ασβέστιο. Η φασματοσκοπία FT-Raman αποτελεί τα τελευταία χρόνια ένα σημαντικό εργαλείο για τον χαρακτηρισμό τέτοιων κρυσταλλικών δομών τόσο στην φυσιολογία φυτών όσο και στην ιατρική [7,52,53,54]. Στους κρυστάλλους που απομονώθηκαν από τα φυτά στα οποία χορηγήθηκε αέρας χωρίς CO<sub>2</sub> τόσο στο υπέργειο μέρος όσο και στην ρίζα (-r/-a) ανιχνεύθηκε, εκτός από Μονοένυδρο Οξαλικό Ασβέστιο, και έντονη παρουσία νιτρικού καλίου (KNO<sub>3</sub>). Παρουσία νιτρικού καλίου παρατηρήθηκε επίσης, αλλά σε μικρότερες ποσότητες στους κρυστάλλους από τα φυτά στα οποία χορηγήθηκε CO<sub>2</sub> μόνο στο υπέργειο μέρος (+r/-a). Είναι πιθανόν σε συνθήκες πενίας άνθρακα η μεταβολική πορεία προς τη βιοσύνθεση υδατανθράκων να διαταράσσεται. Στις συνθήκες αυτές αφενός μεν οι κρύσταλλοι αποδομούνται, ώστε να προμηθεύσουν τον κύκλο του Calvin με τον αναγκαίο άνθρακα για την απρόσκοπτη λειτουργία του αφετέρου εναποτίθεται στους κρυστάλλους άζωτο υπό μορφή KNO<sub>3</sub>. Το άζωτο βρίσκεται σε περίσσεια στους χειρισμούς αυτούς λόγω μειωμένης μεταβολικής δραστηριότητας και αδυναμίας ενσωμάτωσης του σε πρωτεΐνες ή άλλα μόρια του πρωτογενούς

## Συζήτηση

μεταβολισμού. Συνεπώς στους ιδιοβλαστες θα πρέπει να υπάρχουν μηχανισμοί μεταφοράς και απόθεσης νιτρικών ανιόντων και  $K^+$ . έχει ήδη αναφερθεί ότι σχηματισμός των κρυστάλλων επηρεάζεται από τα διαθέσιμα νιτρικά (80 και συναφής βιβλιογραφία) και από την αναλογία αμμωνιακών/νιτρικών στο θρεπτικό μέσο [2,90]. Άλλωστε οι Al-ais *et al.* (1971) έδειξαν ότι όταν το ασβέστιο δεν είναι διαθέσιμο σε επαρκείς ποσότητες στο φυτό για το σχηματισμό των κρυστάλλων, μπορεί να αντικατασταθεί από στρόντιο, μαγνήσιο ή βάριο. Επίσης το οξαλικό ασβέστιο από το οποίο αποτελούνται οι κρύσταλλοι μπορεί να περιέχει και ποσότητες άλλων συστατικών (π.χ εσπεριδίνης, μυροσύνης) [80].

Οι τιμές του  $\delta^{13}C$  που μετρήθηκε σε δείγματα φυτικών του φυτού *Amaranthus sp.* είναι χαρακτηριστικές για  $C_4$  φυτό [11,20,21,62] ενώ δεν παρατηρούνται ουσιαστικές διαφορές μεταξύ των ιστών (φύλλα, βλαστός, ρίζα), γεγονός που υποδηλώνει ότι ο άνθρακας της βιομάζας έχει παρόμοια προέλευση. Αντίθετα οι τιμές του  $\delta^{13}C$  των κρυστάλλων διαφοροποιούνται έντονα από εκείνες της βιομάζας (λιγότερο αρνητικές) γεγονός που υποδηλώνει διαφορετική προέλευση του άνθρακα των κρυστάλλων από αυτόν της βιομάζας. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για απομονωμένους κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου από CAM φυτά [99]. Οι κρύσταλλοι παρουσιάζονται περισσότερο εμπλουτισμένοι σε  $^{13}C$  σε σχέση με τη βιομάζα εύρημα που ενισχύει την υπόθεση ότι το  $CO_2$  που προέρχεται από την αναπνοή χρησιμοποιείται για το σχηματισμό των κρυστάλλων. Σύμφωνα με νεότερες μελέτες το  $CO_2$  που αποβάλλεται διαμέσου της λειτουργία της αναπνοής είναι περισσότερο εμπλουτισμένο σε  $^{13}C$  [35,36,117].

Το ποσοστό του άνθρακα που ανιχνεύεται στους κρυστάλλους συμφωνεί με την στοιχειακή σύσταση των κρυστάλλων σε μονοένυδρο οξαλικό ασβέστιο με το ποσοστό να παρουσιάζεται μειωμένο στο χειρισμό (-r/-a). Ταυτόχρονα δεν ανιχνεύθηκε άζωτο στους κρυστάλλους από όλους τους πειραματικούς χειρισμούς γεγονός που έρχεται σε αντιπαράθεση με τα αποτελέσματα των φασμάτων FT-RAMAN. Πιθανόν το  $KNO_3$  να βρίσκεται

## Συζήτηση

στους κρυστάλλους των φυτών (-r/-a) σε μη ανιχνεύσιμες ποσότητες ή στα όρια ευαισθησίας του IRMS. Το ποσοστό του αζώτου στα φύλλα των φυτών (-r/-a) παρουσιάζεται αυξημένο σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες και τα φυτά (-r/+a).

Συμπερασματικά θα μπορούσε να ειπωθεί ότι προέκυψαν σημαντικές πειραματικές ενδείξεις για την ενίσχυση της υπόθεσης εργασίας χωρίς ωστόσο να είναι δυνατόν να επαληθευτεί πλήρως. Οι μηχανισμοί οι οποίοι εμπλέκονται στη δημιουργία και αποδόμηση των κρυστάλλων θα πρέπει να είναι εξαιρετικά πολύπλοκοι, επομένως η πειραματική προσέγγιση καθίσταται δυσχερής. Πρόκειται ωστόσο για ένα θέμα ενδιαφέρον το οποίο αξίζει να διερευνηθεί σε βάθος χρόνου, αξιοποιώντας το σύνολο των σύγχρονων τεχνικών οι οποίες είναι ή θα γίνουν διαθέσιμες στο προσεχές μέλλον στην έρευνα της φυσιολογίας των φυτών.





## ***VI. Βιβλιογραφία***



## Βιβλιογραφία

- 1. Adams, M.A. and Grierson, P.F. 2001.** Stable isotopes at natural abundance in terrestrial plant ecology and ecophysiology: an update. *Plant Biology* 3: 299-310. 523
- 2. Ahmed, A.K. and Johnson, K.A. 2000.** The effect of the ammonium: nitrate nitrogen ratio, total nitrogen, salinity (NaCl) and calcium on the oxalate levels of *Tetragonia tetragonioides* Pallas. Kunz. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 75: 533-538.
- 3. Al-Rais, A.H., Myers, A. and Watson, L. 1971.** The isolation and properties of oxalate crystals from plants. *Annals of Botany* 35: 1213-1218.
- 4. Arnott, H.J. 1982.** Three systems of biomineralization in plants with comments on the associated organic matrix. In: *Biological Mineralization and Demineralization*, GH Nancollas (ed.) Berlin: Springer Veriag, 199-218.
- 5. Arnott, H.J. and Pautard, F.G.E. 1970.** Calcification in plants. In: *Biological Calcification: Cellular and Molecular Aspects*, ed. H Schraer, New York: Appleton-Centuty-Crofts, 375-446.
- 6. Aschan, G. and Pfanz, H. 2003.** Non-foliar photosynthesis—a strategy of additional carbon acquisition. *Flora Review* 198: 81-97
- 7. Baran, E.J. 2005.** Applications of vibrational spectroscopy to the investication of plant material. In: *Advances in Plant Physiology*, Hemantaranjan, A. (ed), Scientific publishers (India) 8: 365-392.
- 8. Blanke, M.M. and Lenz, F. 1989.** Fruit photosynthesis-a review. *Plant Cell & Environment* 12: 31-46.
- 9. Bouropoulos, N., Weiner, S. and Addadi, L. 2001.** Calcium oxalate crystals in tomato and tobacco plants: morphology and in vitro interactions of crystal associated macromoles. *Chemistry* 9: 1881-1888
- 10. Brownlee, C. and Taylor, A.R. 2002.** Algal Calcification and Silification in *Encyclopedia of Life Sciences*, <http://www.els.net>, London: Nature Publishing Group.

- 11. Brugnoli, E. and Farquhar, G.D. 2000.** Photosynthetic fractionation of carbon isotopes. In: *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*, Leegood RC, Sharkey TD & von Caemmerer (eds) Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, 399- 434.
- 12. Chen, C.L., Fang, H.C., Chou, K.J., Wang, J.S. and Chung, H.M. 2001.** Acute oxalate nephropathy after ingestion of star fruit. *American Journal of Kidney Diseases* 37: 418-422.
- 13. Craig, H. 1957.** Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochemica and Cosmochemica Acta* 12: 133-149.
- 14. Cramer, M.D. and Richards, M.B. 1999.** The effect of rhizosphere dissolved inorganic carbon on gas exchange characteristics and growth rates of tomato seedlings. *Journal of Experimental Botany* 50: 79-87.
- 15. Damesin, C., Rambal, S., and Joffre, R. 1998.** Seasonal and annual changes in leaf  $\delta^{13}\text{C}$  in two co-occurring Mediterranean oaks: relations to leaf growth and drought progression. *Functional Ecology* 12: 778-785.
- 16. Dickison, W.C. 2000.** *Integrative Plant Anatomy*. Academic Press. San Diego.
- 17. Dixon, D.C., Cut, J.R. and Klessig, D.F. 1991.** Differential targeting of the tobacco PR-1 pathogenesis-related proteins to the extracellular space and vacuoles of crystal idioblasts. *The EMBO Journal* **10**: 1317-1324.
- 18. Evans, J.R. and Loreto, F. 2000.** Acquisition and Diffusion of  $\text{CO}_2$  in Higher Plant Leaves. In *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*, Leegood R.C., Sharkey, T.D. and von Caemmerer, S. Kluwer Academic Publishers (eds) 322-351
- 19. Fahn, A. 1990.** *Plant anatomy*. 4<sup>th</sup> Edition. Oxford: Pergamon Press.

- 20.** Farquhar, G.D. On the nature of carbon isotope discrimination in C<sub>4</sub> species. 1983. *Australian Journal of Plant Physiology* 10: 205-226
- 21.** Farquhar, G.D., Ehleringer, J.R. and Hubick, K.T. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 503-537.
- 22.** Finley, D.S. Patterns of calcium oxalate crystals in young tropical leaves: a possible role as an anti-herbivory defense. *Revista de Biología Tropical* 47: 27-31.
- 23.** Fisher, D.G. and Evert, R.F. 1982. Studies on the leaf of *Amaranthus retroflexus* (Amaranthaceae): morphology and anatomy. *American Journal of Botany* 69: 1133-1147.
- 24.** Fotelli, M.N., Geßler, A., Peuke, A.D. and Rennenberg, H. 2001. Drought affects the competitive interactions between *Fagus sylvatica* seedlings and an early successional species, *Rubus fruticosus*: responses of growth, water status and δ<sup>13</sup>C composition. *New Phytologist* 151: 427-435.
- 25.** Fotelli, M.N., Rennenberg, H., Holst, T., Mayer, H., and Geßler, A. 2003. Carbon isotope composition of various tissues of beech (*Fagus sylvatica*) regeneration is indicative of recent environmental conditions within the forest understorey. *New Phytologist* 159: 229-244
- 26.** Franceschi, V.R. 2001. Calcium oxalate in plants. *Trends in Plant Science* 6: 331
- 27.** Franceschi, V.R. and Horner, H.T. 1980. Calcium oxalate crystals in plants. *The Botanical Review* 46: 360-427.
- 28.** Franceschi, V.R. and Loewus, F.A. 1995. Oxalate biosynthesis and function in plants and fungi. In: *Calcium Oxalate in Biological Systems*, ed. SR Khan, Boca Raton, FL: CRC 113-130.
- 29.** Franceschi, V.R. and Nakata, P.N. 2005. Calcium oxalate in plants: Formation and Function. *Annual Review of Plant Biology* 56: 41-71.

- 30. Freisleben, R. 1933.** Untersuchungen über Bildung und Auflösung von Cystolithen beiden Urticales. *Flora* 27: 1-45.
- 31. Gattuso, J.P. and Buddemeier, R.W. 2000.** Calcification and CO<sub>2</sub>. *Nature* 407: 311-312.
- 32. Geßler, A., Schrempp, S., Matzarakis, A., Mayer, H., Rennenberg, H. and Adams, M.A. 2001.** Carbon isotope composition of phloem sap, wood and foliage of beech (*Fagus sylvatica* L.): effects of water availability and radiation during the growing season. *New Phytologist* 150: 653 -664.
- 33. Giachetti, E., Pinzuati, G., Bonaccorsi, R., Vincenzini, M.T. and Vanni, P. 1987.** Isocitrate lyase from higher plants. *Phytochemistry* 26: 2439-2446
- 34. Gleixner, G., Danier, H.J., Werner, R.A. and Schmidt, H.L. 1993.** Correlation between the <sup>13</sup>C content of primary and secondary plant products in different cell compartments and that in decomposing basidiomycetes. *Plant Physiology* 102: 1287-1290.
- 35. Ghashghaie, J., Badeck, F-W., Lanigan, G., Nogués, S., Tcherkez, G., Deleéns, E., Cornic, G. and Griffiths, H. 2003.** Carbon isotope fractionation during dark respiration and photorespiration in C<sub>3</sub> plants. *Phytochemistry Reviews* 2: 145-161.
- 36. Ghashghaie, J., Duranceau, M., Badeck, F., Cornic, G., Adeline, M.T. and Deleens, E. 2001.** δ<sup>13</sup>C of CO<sub>2</sub> respired in the dark in relation to leaf metabolites: comparisons between *Nicotiana sylvestris* and *Helianthus annuus* under drought. *Plant Cell & Environment* 24: 505-515.
- 37. Grasselli, J.G. and Bulkin, B.J. 1991.** *Analytical Raman Spectroscopy*. Wiley-Interscience publication. John Wiley and sons, INC.
- 38. Gutter, E.G. 1969.** *Plant anatomy: Experiment and interpretation*. Part 1. Edward Arnold.

- 39.** Herfort, L., Thake, B. and Roberts, J. 2002. Acquisition and use of bicarbonate by *Emiliana huxleyi*. *New Phytologist* 156: 427-436.
- 40.** Hibberd, J.M. and Quick, W.P. 2002. Characteristics of C<sub>4</sub> photosynthesis in stems and petioles of C<sub>3</sub> flowering plants. *Nature* 415: 451-453.
- 41.** Horner, H.T., Kausch A.P., and Wagner, B.L. 2000. Ascorbic acid: a precursor of oxalate in crystal idioblasts of *Yucca torreyi* in liquid root culture. *International Journal of Plant Sciences* 161: 861-868.
- 42.** Horner, H.T. and Wagner, B.L. 1995. Calcium oxalate formation in higher plants. In: *Calcium Oxalate in Biological Systems*, Kahn, S.R. (ed) , Boca Raton, FL: CRC Press, 53-72.
- 43.** Hudgins, J.W., Krekling, T. and Franceschi, V.R. 2003. Distribution of calcium oxalate crystals in the secondary phloem of conifers: a constitutive defense mechanism? *New Phytologist* 159: 677-690.
- 44.** Ilarslan, H., Palmer, R.G. and Horner, H.T. 2001. Calcium oxalate crystals in developing seeds of soybean. *Annals of Botany* 88: 243-257.
- 45.** Jauregui-Zuniga, D., Ferrer M.A., Calderon A.A., Munoz R. and Morenó A. 2005. Heavy metal stress reduces the deposition of calcium oxalate crystals in leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Plant Physiology* 162: 1183-1187.
- 46.** Jeffrey, S.W. and Anderson, J.M. 2000. *Emiliana huxleyi* (Haptophyta) holds promising insights for photosynthesis. *Journal of Phycology* 36: 449-452.
- 47.** Keates, S.A., Tarlyn, N., Loewus, F.A. and Franceschi, V.R. 2000. L-ascorbic acid and L-galactose are source of oxalic acid and calcium oxalate in *Pistia stratiotes*. *Phytochemistry* 53: 433-440
- 48.** Keeley, J.E., Osmond, C.B., and Raven, J.A. 1984. Stylites, a vascular land plant without stomata absorbs CO<sub>2</sub> via its roots. *Nature* 310: 694-695.

- 49.** Keitel, C., Adams, M.A., Holst, T., Matzarakis, A., Mayer, H., Rennenberg, H. and Geßler, A. 2003. Carbon and oxygen isotope composition of organic matter in the phloem sap provides a short-term measure for stomatal conductance of European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Plant, Cell & Environment* 26: 1157-1168.
- 50.** Kitaya, Y., Yabuki, K., Kiyota, M., Tani, A., Hirano, T. and Aiga, I. 2002. Gas exchange and oxygen concentration in pneumatophores and prop roots of four mangrove species. *Trees* 16: 155-158.
- 51.** Knight, A.P. and Walter, R.G. 2003. Plants Causing Kidney Failure. In: A guide to plant poisoning of animals in North America., Knight, A. P. and Walter, R. G. (eds).
- 52.** Kontoyannis, C.G., Bouropoulos, N.CH. and Koutsoukos, P.G. 1997. Use of Raman spectroscopy for the quantitative analysis of calcium oxalate hydrates: Application for the analysis of urinary stones. *Applied Spectroscopy* 51: 64-67
- 53.** Kontoyannis, C.G., Bouropoulos, N.C. and Koutsoukos, P.G. 1997. Raman spectroscopy: A tool for the quantitative analysis of mineral components of solid mixtures. The case of calcium oxalate monohydrate and hydroxyapatite. *Vibrational Spectroscopy* 15: 53-60(8)
- 54.** Kontoyannis, C.G. and Vagenas, N.V. 2000. Calcium carbonate phase analysis using XRD and FT-Raman spectroscopy. *Analyst* 125: 251-255.
- 55.** Korol, R.L., Kirschbaum, M.U.F., Farquhar, G.D. and Jeffreys, M. 1999. Effects of water status and soil fertility on the C-isotope signature in *Pinus radiata*. *Tree Physiology* 19: 551-562.
- 56.** Kostman, T.A. and Francesci, V.R. 2000. Cell and calcium oxalate crystal growth is coordinated to achieve high-capacity calcium regulation in plants. *Protoplasma* 214: 166-179
- 57.** Kostman, T.A., Francesci, V.R. and Nakata, P.A. 2003. Endoplasmic reticulum sub-compartments are involved in calcium sequestration



- within raphide crystals idioblasts of *Pistia stratiotes* L. *Plant Science* 165: 205-212
- 58. Kostman, T.A. and Koscher, J.R. 2003.** L-galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase is present in calcium oxalate crystal idioblasts of two plant species. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 201-206
- 59. Kostman, T.A., Tarlyn, N.M., Loewus, F.A. and Francesci, V.R. 2001.** Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbon 1 and 2 of L-ascorbic acid to oxalic acid occurs within individual calcium oxalate crystal idioblasts. *Plant Physiology* 125: 634-640.
- 60. Kuo-Huang, L-L., Chen, S-H. and Chen, S-J. 2000.** Ultrastructural study on the formation of sclereids in the floating leaves of *Nymphoides coreana* and *Nuphar schimadai*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 41: 283-291.
- 61. Lavid, N., Barkay, Z. and Tel-Or, E. 2000.** Accumulation of heavy metals in epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). *Planta* 212: 313-322.
- 62. Lawlor, D.W. 2001.** *Photosynthesis*. Oxford: BIOS Scientific Publishers.
- 63. Levi-Kalisman, Y., Raz, S., Weiner, S., Addadi, L. and Sagi, I. 2000.** X-ray absorption spectroscopy studies on the structure of a biogenic "amorphous" calcium carbonate phase. *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions* 21: 3977-3982.
- 64. Li, X.X. and Francesci, V.R. 1990.** Distribution of peroxisomes and glycolate metabolism in relation to calcium oxalate formation in *Lemna minor* L. *European Journal of Cell Biology* 51: 9-16.
- 65. Li, X.X., Zhang, D.Z., Lynch-Holm, V.J. and Okita, T.W. 2003.** Isolation of a crystal matrix protein associated with calcium oxalate precipitation in vacuoles of specialized cells. *Plant Physiology* 133: 549-559.
- 66. Libert, B. and Francesci, V.R. 1987.** Oxalate in crop plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35: 926- 938

- 67. Lin, G. and Ehleringer, J.R. 1997.** Carbon isotopic fractionation does not occur during dark respiration of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. *Plant Physiology* 114: 191-194.
- 68. Livingston, N.J., Spittlehouse, D.L. 1996.** Carbon isotope fractionation in tree ring early and late wood in relation to intra-growing season water balance. *Plant, Cell & Environment* 19: 768-774.
- 69. Loewus, F. 1999.** Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochemistry* 52: 193-210.
- 70. Lucas, P.W., Turner, I.M., Dominy, N.J. and Yamashita, N. 2000.** Mechanical defences to herbivory. *Annals of Botany* 86: 913-920.
- 71. Ma, J.F. Ryan, P.R. and Delhaize, E. 2001.** Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science* 6: 273-278.
- 72. Macnish, A.J, Irving, D.E., Joyce, D.C, Vinthanage, V., Wearing, A.H, Webb, R.I., and Frost, R.L. 2003.** Identification of intracellular calcium oxalate crystals in *Chamelaucium uncinatum* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* 51: 565-572.
- 73. Marsh, M.E. 1999.** Coccolith crystals of *Pleurochrysis carterae*: crystallographic faces, organization, and development. *Protoplasma* 207: 54-66.
- 74. Marsh, M.E., Ridall, A.L., Azadi, P., and Duke, P.J. 2002.** Galacturonomannan and Golgi-derived membrane linked to growth and shaping of biogenic calcite. *Journal of Structural Biology* 139: 39-45.
- 75. Massey, L.K. 2003.** Dietary influences on urinary oxalate and risk of kidney stones. *Frontiers in Bioscience* 8: s584- 594.
- 76. Mazen, A.M.A. 2004.** Calcium Oxalate Deposits in Leaves of *Corchorus olitorius* as Related to Accumulation of Toxic Metals. *Russian Journal of Plant Physiology* 51: 281 - 285.

- 77. Mazen, A.M.A. and El Maghraby, O.M.O. 1998.** Accumulation of cadmium, lead and strontium, and a role of calcium oxalate in water hyacinth tolerance. *Biologia Plantarum*. 40: 411 – 417.
- 78. Mazen, A.M.A, Zhang, D.Z. and Francesci, V.R. 2004.** Calcium oxalate formation in *Lemna minor*: physiological and ultrastructural aspects of high capacity calcium sequestration. *New Phytologist* 161: 435-448.
- 79. McConn, M.M. and Nakata, P.A. 2002.** Calcium oxalate crystal morphology mutants from *Medicago truncatula*. *Planta* 215: 380-386.
- 80. Metcalfe C.R. 1985.** Secreted mineral substances In: *Anatomy of the Dicotyledons- Volume II Wood structure and conclusion of the general introduction*, Metcalfe, C.R. and Chalk, L. (ed), 2<sup>nd</sup> Edition. Oxford, 82-91.
- 81. Metcalfe, C.R. 1985.** Calcareous deposits, calcified cell walls, cystoliths and similar structures. In: *Anatomy of the Dicotyledons- Volume II Wood structure and conclusion of the general introduction*, Metcalfe, C.R. and Chalk, L. (ed), 2<sup>nd</sup> Edition. Oxford, 94-97.
- 82. Nakata, P.A. 2002.** Calcium oxalate crystal morphology. *Trends in Plant Science* 7: 324
- 83. Nakata, P.A. 2003.** Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science* 164: 901-909.
- 84. Nakata, P.A., Kostman, T.A. and Franceschi, V.R. 2003.** Calreticulin is enriched in the crystal idioblasts of *Pistia stratiotes*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 425-430.
- 85. Nakata, P.A. and McConn, M.M. 2000.** Isolation of *Medicago truncatula* mutants defective in calcium oxalate crystal formation. *Plant Physiology* 124: 1097-1104.
- 86. Nakata, P.A. and McConn, M.M. 2003.** Calcium oxalate crystal formation is not essential for growth of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 325-329.

- 87.** O'Realy, M.H. 1981. Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry* 20: 553-567
- 88.** Paasche, E. 2001. A review of the coccolithophorid *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae), with particular reference to growth, coccolith formation and calcification-photosynthesis interactions. *Phycologia* 40: 503-529.
- 89.** Paiva, E.A.S., Machado, S.R., Gregório, E.A. and Basso, N.A. 2003. A simplified method to extract and isolate calcium oxalate crystals in plant tissues for SEM studies. *Acta Microscopica*, XIX Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalysis 12: 1-2
- 90.** Palaniswamy, P.U., Bible, B. and McAvoy, R.J. 2004. Oxalic acid concentrations in purslane (*Portulaca oleraceae* L.) is altered by the stage of harvest and the nitrate to ammonium ratios in hydroponics. *Scientia Horticulturae* 102: 267-275.
- 91.** Pennisi, S.V., McConnell, D.B., Gower, L.B., Kane, M.E. and Lucansky, T. 2001. Intracellular calcium oxalate crystal structure in *Dracaena sandariana*. *New Phytologist* 150: 111- 120.
- 92.** Pfanz, H. and Aschan, G. 2001. The existence of bark and stem photosynthesis in woody plants and its significance for the overall carbon gain. An eco-physiological and ecological approach. *Progress in Botany* 62: 477-509
- 93.** Prychid, C.J. and Rudall, P.J. 1999. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematic. *Annals of Botany* 84: 725-739
- 94.** Raven, J.A. and Smith, F.A. 1976. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytologist* 76: 415-431.
- 95.** Raus, Th. 1997. *Amaranthus* L. In: *Flora hellenica*, Arne, S. & Tan, K. (eds), 1: 138-146.

- 96. Richardson, K.E. and Tolbert, N.E. 1961.** Oxidation of glyoxylic acid to oxalic acid by glycolic acid oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 236:1280-1284
- 97. Ridge, I. 2002.** *Plants*. Oxford University Press. Oxford, UK.
- 98. Riebesell, U., Zondervan, I., Rost, B., Tortell, P.D., Zeebe, R.E. and Morel, F.M.M. 2000.** Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO<sub>2</sub>. *Nature* **407**: 364-367.
- 99. Rivera, E.R. and Smith, B.N. 1979.** Crystal morphology and <sup>13</sup>Carbon/<sup>12</sup>Carbon composition of solid oxalate in cacti. *Plant Physiology* 64: 966-970
- 100. Ruiz, N., Ward, D. and Saltz, D. 2002.** Calcium oxalate crystals in leaves of *Pancratium sickenbergeri*: Constitutive or induced defence?. *Functional Ecology* 16: 99-105.
- 101. Sage, R.F. and Monson, R.K. 1999.** *C<sub>4</sub> plant biology*. Academic press.
- 102. Seal, S.N. and Sen, S.P. 1970.** The photosynthetic production of oxalic acid in *Oxalis corniculata*. *Plant and Cell Physiology* 11: 119-128.
- 103. Siener, R., Hönow, R., Seidler, A., Voss, S. and Hesse A. 2005.** Oxalate contents of species of the Polygonaceae, Amaranthaceae and Chenopodiaceae families (in press).
- 104. Smirnoff, N., Conklin, P.L and Loewus, F.A. 2001.** Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 437-467.
- 105. Solereder, H. 1908.** *Systematic anatomy of the dicotyledons*. English edition, translated by Boodle, L.A and Fritsch, F.E., Clarendon press, Oxford.
- 106. Stryer, L. 1994.** *Βιοχημεία-Τόμος Πρώτος*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- 107. Sugimura, Y., Mori, T., Nitta, I., Kotani, E., Furusava, T., Tatsumi, M., Kusakari, S.-I., Wada, M. and Morita, Y. 1999.** Calcium deposition in idioblasts of mulberry leaves. *Annals of Botany* **83**: 543-550.

- 108.** Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. *Plant Physiology*. 2nd edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company.
- 109.** Thurston, E.L 1976. Morphology, fine structure and ontogeny of the stinging emergence of *Tragia ramosa* and *T.saxicola* (Euphorbiaceae). *American Journal of Botany* 63: 710-718.
- 110.** Viktor, A. and Cramer, M. D. 2003. Variation in root-zone CO<sub>2</sub> concentration modifies isotopic fractionation of carbon and nitrogen in tomato seedlings. *New Phytologist* 157: 45-54.
- 111.** Volk, G., Goos, L.J. and Franceschi V. R. 2004. Calcium Channels are Involved in Calcium Oxalate Crystal Formation in Specialized Cells of *Pistia stratiotes* L. *Annals of Botany* 93: 741-753.
- 112.** Volk, G.M., Lynch-Holm, V.J., Kostman, T.A., Goss, L. J. and Franceschi V.R. 2002. The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves. *Plant Biology* 4: 34-45.
- 113.** Ward, D. and Spiegel, M. 1997. Gazelle herbivory and interpopulation differences in calcium oxalate content of leaves of a desert lily. *Journal of Chemical Ecology*. 23: 333-346.
- 114.** Warren, C.R., McGrath, J.F. and Adams, M.A. 2001. Water availability and carbon isotope discrimination in conifers. *Oecologia* 127: 476-486.
- 115.** Webb, M.A., Cavaletto, J.M., Carpita, N.C., Lopez, L.E. and Arnott, H.J. 1995. The intravacuolar organic matrix associated with calcium oxalate crystals in leaves of *Vitis*. *Plant Journal* 7: 633-648.
- 116.** Winter, K., Aranda, J. and Holtum, J.A.M. 2005. Carbon isotope composition and water use efficiency in plants with crassulacean acid metabolism. *Functional Plant Biology* 32: 381-388.
- 117.** Xu, C-Y., Lin, G-H., Griffin, K.L. and Sambrotto, R.N. 2004. Leaf respiratory CO<sub>2</sub> is <sup>13</sup>C-enriched relative to leaf organic components in five species of C<sub>3</sub> plants. *New Phytologist* 163: 499-505.

- 118.** Zindler-Frank, E., Hönow, R. and Hesse, A. 2001. Calcium and oxalate content of the leaves of *Phaseolus vulgaris* at different calcium supply in relation to calcium oxalate crystal formation. *Journal of Plant Physiology* 158: 139-144.
- 119.** Αϊβαλάκης, Γ., Καραμπουρνιώτης, Γ. και Φασσέας, Κ. 2005. *Γενική Βοτανική*. Εκδόσεις Έμβρυο. Αθήνα.
- 120.** Βαρδαβάκης, Μ. και Ζούζουλας, Δ. 2003. *Μορφολογία & Ανατομία των φυτών*. Εκδόσεις Ζήτη.
- 121.** Γαβαλάς, Ν.Α. 2003. Φωτοσύνθεση II: βιοχημικές αντιδράσεις. *Φυσιολογία φυτών*. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Κ.Α. (επ.). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 191-226.
- 122.** Γαλάτης, Β., Κατσαρός, Χ. και Αποστολάκος, Π. 1998. *Εισαγωγή στη Βοτανική*. Εκδόσεις Α.Σταμούλης. Αθήνα.
- 123.** Γανωτάκης, Δ. και Κοτζαμπασής, Κ. 2003. Φωτοσύνθεση I: μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε χημική. *Φυσιολογία φυτών*. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Κ.Α. (επ.). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 145-189.
- 124.** Δροσόπουλος, Ι. 1998. *Φυσιολογία φυτών*. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα
- 125.** Καραμπουρνιώτης, Γ. 2003. *Φυσιολογία Καταπονήσεων των φυτών*. Εκδόσεις Έμβρυο. Αθήνα.
- 126.** Καρατάγλης, Σ. 1999. *Φυσιολογία Φυτών*. Art of Text. Θεσσαλονίκη.
- 127.** Λουριδά, Β. 2005. *Πιθανοί φυσιολογικοί ρόλοι των λιθοκόστεων σε αντιπροσωπευτικά είδη*. Μεταπτυχιακή εργασία. Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- 128.** Μανέτας, Ι. Αναπνοή και αναερόβιωση. *Φυσιολογία φυτών* Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Κ.Α. (επ.). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 227-257.
- 129.** Μανέτας, Ι. (επ.). 2005. *Φυσιολογία φυτών*. Εκδόσεις Ίων.
- 130.** Μποζαμπαλίδης, Α. 2003. *Βοτανική. Μορφολογία & ανατομία φυτών*. Β' έκδοση. Θεσσαλονίκη.
- 131.** Σαρλής, Γ. Π. 1999. *Συστηματική βοτανική*. Εκδόσεις Α.Σταμούλης. Αθήνα.

*Βιβλιογραφία*

- 132.Φιλίππου, Ε. 2005.** *Ανατομικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά του φωτοσυνθετικού ιστού του βλαστού της ελιάς.* Διδακτορική διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα