

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ**

**Η Δομή και η Λειτουργία των Ιδιοβλαστών
που Σχηματίζουν Εναποθέσεις Οξαλικού και
Ανθρακικού Ασβεστίου και ο Ρόλος τους
στη Φωτοσύνθεση Κινδύνου**

Ανδρέας Π. Γιαννόπουλος

Διδακτορική Διατριβή

Γεώργιος Α. Καραμπουρνιώτης (επιβλέπων καθηγητής)

ΑΘΗΝΑ 2014

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ**

**Η Δομή και η Λειτουργία των Ιδιοβλαστών
που Σχηματίζουν Εναποθέσεις Οξαλικού και
Ανθρακικού Ασβεστίου και ο Ρόλος τους
στη Φωτοσύνθεση Κινδύνου**

Ανδρέας Π. Γιαννόπουλος

Διδακτορική Διατριβή

Γεώργιος Α. Καραμπουρνιώτης (επιβλέπων καθηγητής)

ΑΘΗΝΑ 2014

"Η έγκρισις της παρούσης διδακτορικής διατριβής υπό του
Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει
αποδοχή των γνώμεων του συγγραφέως."
(Νόμος 5343/1932, άρθρο 202)

Το θέμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής εγκρίθηκε (Συνεδρία 7η/10-02-2010) και τροποποιήθηκε (Συνεδρία 9η/02-04-2013) με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύθεσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (ΓΣΕΣ). Η επταμελής εξεταστική επιτροπή εγκρίθηκε με απόφαση της ΓΣΕΣ (Συνεδρία 22-10-2014 του Τμήματος Επίστημης Φυτικής Παραγωγής).

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Γ. Καραμπουρνιώτης, Καθηγητής, ΓΠΑ (επιβλέπων)

Γ. Αϊβαλάκις, Αν. Καθηγητής, ΓΠΑ (μέλος)

Κ. Φασσέας, Καθηγητής, ΓΠΑ (μέλος)

Επταμελής εξεταστική επιτροπή

Γ. Καραμπουρνιώτης, Καθηγητής (επιβλέπων)

Κ. Φασσέας, Καθηγητής, ΓΠΑ (μέλος)

Γ. Αϊβαλάκις, Αν. Καθηγητής, ΓΠΑ (μέλος)

Κ. Σταματάκης, Εντεταλμένος Ερευνητής (Β), ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος"

Κ. Μπινιάρη, Επ. Καθηγήτρια, ΓΠΑ

Γ. Λιακόπουλος, Επ. Καθηγητής, ΓΠΑ

Σ. Χωριανοπούλου, Λέκτορας, ΓΠΑ

Στους γονείς μου,

Πέτρο και Ευγενία

Ευχαριστίες

Ο θεμέλιος λίθος αυτής της εργασίας μπήκε το καλοκαίρι του 2006. Εκείνη την περίοδο βρισκόμουν στα τελευταία στάδια της συγγραφής της μεταπτυχιακής διατριβής μου στον τομέα της Αμπελουργίας, ενός τομέα που με ενθουσίαζε ήδη από τις προπτυχιακές σπουδές μου. Έχοντας αγαπήσει το αμπέλι ως φυτικό είδος και τη φυσιολογία θρέψης του ως ερευνητικό αντικείμενο, θέλησα να προχωρήσω ένα βήμα παρακάτω. Μετά από μερικά τυχαία γεγονότα μου προτάθηκε να αναζητήσω και να συνομιλήσω με τον κ. Καραμπουρνιώτη στο εργαστήριο Μορφολογίας και Φυσιολογίας Φυτών, αφού η ερευνητική ομάδα του είχε ασχοληθεί με τη φυσιολογία μεσογειακών ειδών και μεταξύ αυτών και με το αμπέλι. Από την πρώτη στιγμή με κέρδισε ως άνθρωπος ενώ στη συνέχεια της συνεργασίας μας κατανόησα και το υψηλό του επίπεδο ως επιστήμονας. Γι αυτό θα ήθελα πρώτον απ' όλους όσους συνέβαλλαν στην διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας να ευχαριστήσω:

Τον κ. Καραμπουρνιώτη Γεώργιο, Καθηγητή, μέλος της τριμελούς επιτροπής και επιβλέποντά μου. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου από την πρώτη κιόλας στιγμή. Θεωρώ πως η απόφασή του αυτή δεν ήταν εύκολη αφού προερχόμουν από άλλο τμήμα του ΓΠΑ (εκείνη την περίοδο το εργαστήριο υπάγονταν στο τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας) και γι αυτό δε με γνώριζε αλλά ούτε είχα συνεργαστεί ποτέ με κάποιο μέλος της ερευνητικής του ομάδας. Παρ' όλα αυτά συζητήσαμε για τα ερευνητικά θέματα με τα οποία ασχολούνταν και αφού εξέφρασα το ενδιαφέρον μου, μου πρότεινε να δουλέψουμε μαζί για την μελέτη του ρόλου των κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου του αμπελιού, θέμα το οποίο στη συνέχεια τροποποιήθηκε ώστε να καταστεί δυνατή η μελέτη και άλλων φυτών. Τον ευχαριστώ για την σημαντικότερη συμβολή στον σχεδιασμό των πειραματικών αλληλουχιών αυτής της εργασίας καθώς και για τις συμβουλές του και ιδέες του για να ξεπεραστούν οι όποιες δυσκολίες και αδιέξοδα προέκυπταν κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Επίσης τον ευχαριστώ βαθύτατα για τις υποδείξεις και συμβουλές του κατά την συγγραφή της παρούσας διδακτορικής διατριβής και κυρίως για τις "πατρικές" συμβουλές του σε διάφορα θέματα που με απασχόλησαν κατά τη διάρκεια των οχτώ σχεδόν αυτών χρόνων.

Τον κ. Φασσέα Κωνσταντίνο, Καθηγητή, μέλος της τριμελούς επιτροπής, ο οποίος, ήδη από την περίοδο της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας, με έκανε να νιώσω ευπρόσδεκτος στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας. Οι γνώσεις του σε θέματα γύρω από την προετοιμασία και την παρατήρηση φυτικών δειγμάτων στο ηλεκτρονικό και οπτικό μικροσκόπιο και η προθυμία του να τις μεταδώσει έπαιξαν σημαντικότατο ρόλο στον σχεδιασμό ορισμένων εκ των πειραμάτων της παρούσας διατριβής και στην εξαγωγή συμπερασμάτων από αυτά. Μαζί θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Κ. Ψαρωκοστόπουλο Ιωάννη Ε.Δ.Τ.Π. ο οποίος με συμβούλεψε και επίβλεψε στη σωστή χρήση των μηχανημάτων του Εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας.

Τον κ. Αϊβαλάκι Γεώργιο, Αν. Καθηγητή, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για τις συμβουλές του και τις υποδείξεις του τόσο κατά τη διαδικασία των πειραμάτων όσο και στη συγγραφή και διόρθωση της διατριβής αυτής.

Τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, κ. Σταματάκη Κωνσταντίνο, Εντεταλμένο Ερευνητή (B), την κα. Μπινιάρη Αικατερίνη, Επίκουρη Καθηγήτρια, και την κα.

Χωριανοπούλου Στυλιανή, Λέκτορα, για τη διόρθωση και εξέταση της παρούσας εργασίας.

Τον κ. Λιακόπουλο Γεώργιο, Επίκουρο Καθηγητή και μέλος της εξεταστικής επιτροπής, θα μου επιτρέψετε να τον ευχαριστήσω ξεχωριστά, αφού ένα μεγάλο μέρος αυτής της εργασίας δεν θα είχε πραγματοποιηθεί αν δεν υπήρχαν οι συμβουλές του τόσο σε σχεδιαστικό όσο και σε πειραματικό επίπεδο.

Τον Δρ. Δημοσθένη Νικολόπουλο, μέλος ΕΙΔΙΠ ο οποίος αποτελεί τη φωνή της λογικής όταν όλα τα υπόλοιπα μέλη της ερευνητικής ομάδας πάσχουν από το σύνδρομο του "τρελού επιστήμονα". Χωρίς την εφευρετικότητά του και τις ιδέες του σε πρακτικό επίπεδο, πολλά πειράματα θα είχαν μείνει στα χαρτιά.

Τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου και ειδικότερα: την κα. Αντριάννα Σιψά ΕΤΕΠ, την Δρ. Τουλάκου Γεωργία, την Δρ. Μπρέστα Παναγιώτα, την υποψήφια διδάκτορα Σταυρουλάκη Βασιλική, την κα. Κοργιοπούλου Χριστίνα και όλους του μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές που συνέβαλλαν λίγο ή πολύ στην πραγματοποίηση της εργασίας αυτής, αλλά και για την άψογη συνεργασία μας στο εργαστήριο όλα αυτά τα χρόνια. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Ρέππα Χρυσανγή, η οποία αποτέλεσε το δεξί μου χέρι κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, ενώ η γνώμη της ήταν πάντα παράγοντας συζήτησης σε βάθος των θεμάτων που άπτονταν του θέματος της διατριβής.

Τον κ. Κατινάκη Παναγιώτη, Καθηγητή και την κ. Δήμου Μαρία ΕΙΔΙΠ του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας για τις συμβουλές τους και την βοήθειά τους στην πραγματοποίηση των πειραμάτων ανίχνευσης των πρωτεϊνών του matrix του αμπελιού, αλλά και για την υλικοτεχνική υποστήριξη που μου παρείχαν σε διάφορες χρονικές στιγμές της εκπόνησης της διατριβής.

Τον κ. Μανέτα Ιωάννη, Καθηγητή και την κα. Πετροπούλου Γιόλα, Επ. Καθηγήτρια του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών, για την ευγενική τους παραχώρηση του φθορισμόμετρου Microscopy PAM για την πραγματοποίηση των πειραμάτων μέτρησης των παραμέτρων του φθορισμού χλωροφύλλης.

Τον κ. Μπουράνη Δημήτριο, για τις συμβουλές του αλλά και για την διάθεση μέσω και υλικών του εργαστηρίου του για την πραγματοποίηση ορισμένων εκ των πειραμάτων της παρούσας διατριβής.

Τον Δρ. Συμινή Χαράλαμπο, γεωπόνο, Μ.Δ.Ε. ΠΕΓΕΑΛ Κρήτης, για τις συμβουλές του σε θέματα σχετικά με την καλλιέργεια του αμπελιού αλλά και επειδή με τον τρόπο διδασκαλίας του με έκανε να αγαπήσω την φυσιολογία της αμπέλου ως επιστημονικό τομέα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Κ. Μπακασιέτα Κωνσταντίνο MSc. για την προσφορά του πολλαπλασιαστικού υλικού αμπέλου που χρησιμοποίησα κατά τη διάρκεια των προκαταρκτικών πειραμάτων αλλά και για τις συμβουλές του σε θέματα πολλαπλασιασμού της αμπέλου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Πρωτονοτάριο Βασίλειο. Η τυχαία γνωριμία μας μέσω διαδικτύου λόγω της κοινής μας αγάπης για την φωτογραφία ήταν το σημείο εκκίνησης αυτής της διαδρομής. Με δική του προτροπή αναζήτησα και συνάντησα τον κ. Καραμπουρνιώτη αφού ο ίδιος εκείνη την περίοδο εκπονούσε την διδακτορική του διατριβή υπό την επίβλεψη του κ. Μπουράνη.

Όλοι όσοι έχουν ασχοληθεί με την πρωτογενή έρευνα γνωρίζουν καλά πως απαιτεί θυσίες από τον ερευνητή αλλά ακόμα μεγαλύτερες θυσίες από τους δικούς του ανθρώπους. Στις ιδιαίτερες αντίξοες οικονομικές και κοινωνικές συνθήκες αυτής της

περιόδου, οι θυσίες αυτές γιγαντώνονται. Γι αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Πέτρο Γιαννόπουλο και Ευγενία Μποτή-Γιαννοπούλου και τον αδερφό μου Νικόλαο Γιαννόπουλο οι οποίοι με στήριξαν οικονομικά και ψυχολογικά καθ' όλη τη διάρκεια αυτού του ταξιδιού. Χωρίς την επιμονή τους και τη συνεχόμενη στήριξη και βοήθειά τους η πραγματοποίηση της εργασίας αυτής δε θα ήταν δυνατή. Μάλιστα σε περιόδους που η δική μου υπομονή έφτανε στα όρια της εγκατάληψης, η δική τους ήταν αστείρευτη και αποτελούσε δεξαμενή μέσα από την οποία μπορούσα να απορροφήσω δυνάμεις για να συνεχίσω. Στο ίδιο πλαίσιο θα ήθελα να ευχαριστήσω την αρραβωνιστικιά μου Πέγκυ για την δυνατότητα της να έχει δίπλα της έναν "τρελό επιστήμονα", για την υπομονή της αλλά και για τις συμβουλές της κατά την συγγραφή της διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου για τη στήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια και ιδιαίτερα τον Αλέξανδρο Βελαώρα, φιλόλογο, για την φιλολογική επιμέλεια της διατριβής.

Περιεχόμενα

Περίληψη	13
Abstract	16
1. Εισαγωγή.....	20
1.1. Η φωτοσύνθεση	20
1.1.1. Ο χλωροπλάστης.....	21
1.1.2. Η φωτεινή φάση.....	23
1.1.2.1. Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές.....	23
1.1.2.2. Τα Πρωτεϊνικά σύμπλοκα των φωτεινών αντιδράσεων.....	25
1.1.2.3. Χωροταξία των Πρωτεϊνών στα θυλακοειδή.....	26
1.1.2.4. Οι Φωτεινές Αντιδράσεις.....	28
1.1.2.4.1. Μη Κυκλική Φωτοχημική Ροή.....	28
1.1.2.4.2. Κυκλική Φωτοχημική ροή	31
1.1.3. Σκοτεινή Φάση	31
1.1.3.1. C ₃ Φωτοσύνθεση.....	32
1.1.3.2. Φωτοαναπνοή.....	34
1.1.3.3. C ₄ Φωτοσύνθεση	36
1.1.3.4. CAM Φωτοσύνθεση	40
1.1.4. Οι παράγοντες του περιβάλλοντος που επηρεάζουν τη φωτοσύνθεση	42
1.1.4.1. Φωτεινή ακτινοβολία.....	42
1.1.4.2. Θερμοκρασία	43
1.1.4.3. Η διαθεσιμότητα του νερού	44
1.1.4.4. Το διοξείδιο του άνθρακα (CO ₂)	45
1.1.4.5. Άλλοι παράγοντες	46
1.1.5. Το φαινόμενο της φωτοαναστολής	46
1.1.5.1. Μη-φωτοχημικοί μηχανισμοί απόσβεσης.....	48
1.1.5.2. Φωτοχημικοί (μη-φωτοσυνθετικοί) μηχανισμοί απόσβεσης.....	51
1.1.6. Υπολογισμός του φωτοσυνθετικού ρυθμού με τη χρήση φθορισμομετρίας	53
1.2. Η Διαπνοή	61
1.2.1. Ο ρόλος του αμπισικού οξέως (ABA) στη διαπνοή.....	64
1.3. Τα κυτταρικά έγκλειστα	65
1.3.1. Κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου.....	65
1.3.1.1. Σχηματισμός Κρυστάλλων σε ιδιόβλαστα κύτταρα.....	70

1.3.1.1.1.	Τα χαρακτηριστικά των ιδιοβλαστών	70
1.3.1.1.2.	Η βιοσύνθεση του οξαλικού οξέως.....	72
1.3.1.1.3.	Η συνολική εικόνα του σχηματισμού των κρυστάλλων στους ιδιοβλάστες ..	74
1.3.1.2.	Πιθανή φυσιολογική σημασία των κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου	75
1.3.1.2.1.	Αποθήκευση και ρύθμιση κατιόντων ασβεστίου	75
1.3.1.2.2.	Φυτοπροστασία	76
1.3.1.2.3.	Αποτοξίνωση βαρέων μετάλλων	77
1.3.1.2.4.	Άλλοι ρόλοι	77
1.3.2.	Άμορφο ανθρακικό ασβέστιο (κυστόλιθοι).....	78
1.3.3.	Άμορφες εναποθέσεις πυριτίου (φυτόλιθοι)	82
1.3.4.	Κοκκολιθοφόρα.....	82
1.4.	Βοτανικοί χαρακτήρες των πειραματόφυτων	83
1.4.1.	Η Άμπελος (<i>Vitis vinifera</i> L.)	83
1.4.2.	Το Βλήτο (<i>Amaranthus hybridus</i>).....	84
1.4.3.	Το Περδικάκι (<i>Parietaria judaica</i> L.)	86
1.5.	Σκοπός της εργασίας	88
2.	Υλικά και μέθοδοι	93
2.1.	Προέλευση του φυτικού υλικού	93
2.1.1.	<i>Parietaria judaica</i> (Περδικάκι).....	93
2.1.2.	<i>Amaranthus hybridus</i> (Βλήτο).....	93
2.1.3.	<i>Vitis vinifera</i> (Αμπέλι).....	94
2.2.	Η οντογένεση των κυτταρικών εγκλείστων σε σχέση με τις λειτουργικές παραμέτρους των φύλλων.....	95
2.3.	Εφαρμογή σημείου Αντιστάθμισης CO ₂ (Πειράματα Π0 και Β0)	96
2.4.	Αλλαγές στο μέγεθος των κυτταρικών εγκλείστων σε συνθήκες πενίας άνθρακα.....	97
2.4.1.	Αλλαγές στο μέγεθος των κυστόλιθων σε συνθήκες πενίας άνθρακα σε φύλλα του <i>Parietaria judaica</i> (Περδικάκι)	97
2.4.2.	Αλλαγές στο μέγεθος των κρυστάλλων σε συνθήκες πενίας άνθρακα σε φύλλα του <i>Amaranthus hybridus</i> (Βλήτο)	99
2.5.	Ιστοχημικός εντοπισμός της Οξαλικής Οξειδάσης και της καταλάσης και υπολογισμός της δραστηριότητας της Οξαλικής Οξειδάσης στο <i>Amaranthus hybridus</i> (Βλήτο).....	100
2.6.	Ιστοχημικός εντοπισμός των κατιόντων Ca ⁺² σε τομές του <i>Parietaria judaica</i> και <i>Amaranthus hybridus</i> με τη χρωστική alizarine red-s.....	105
2.7.	Ανίχνευση πρωτεϊνών στο matrix των απομονωμένων ιδιοβλαστών στο <i>Vitis vinifera</i> (Πείραμα Α1).....	106

2.8.	Χαρακτηριστικά του Φθορισμού της Χλωροφύλλης.....	107
2.9.	Στατιστική ανάλυση	110
3.	Αποτελέσματα.....	112
3.1.	Η οντογένεση των κυτταρικών εγκλείστων σε σχέση με τις λειτουργικές παραμέτρους των φύλλων.....	112
3.1.1.	Η οντογένεση των ραφίδων και των δρουσών κατά τη διάρκεια έκπτυξης των φύλλων του <i>Vitis vinifera</i> L. (αμπέλι).....	112
3.1.2.	Η οντογένεση των κυστόλιθων σε κατά τη διάρκεια έκπτυξης των φύλλων του <i>Parietaria judaica</i> (περδικάκι).....	117
3.1.3.	Η οντογένεση των κρυστάλλων σε σχέση με το αναπτυξιακό στάδιο του φύλλου του φυτού <i>Amaranthus hybridus</i> (βλήτο).....	122
3.2.	Αλλαγές στο μέγεθος των κυτταρικών εγκλείστων σε συνθήκες πενίας άνθρακα.....	126
3.2.1.	Οι μεταβολές στο μέγεθος των κυστόλιθων σε φύλλα του <i>Parietaria judaica</i> σε συνθήκες πενίας άνθρακα.	126
3.2.2.	Οι μεταβολές στο μέγεθος των δρουσών σε φύλλα του <i>Amaranthus hybridus</i> (βλήτο) σε συνθήκες πενίας άνθρακα.	128
3.3.	Ιστοχημικός εντοπισμός της οξαλικής οξειδάσης και της καταλάσης στο <i>Amaranthus hybridus</i>	130
3.4.	Ιστοχημικός εντοπισμός των κατιόντων Ca^{+2} σε τομές του <i>Parietaria judaica</i> και του <i>Amaranthus hybridus</i> με την χρωστική alizarine red-s.	134
3.4.1.	Ιστοχημικός εντοπισμός των κατιόντων Ca^{+2} στο <i>Parietaria judaica</i> (περδικάκι) (Πείραμα Π3).....	134
3.4.2.	Ιστοχημικός εντοπισμός των κατιόντων Ca^{+2} στο <i>Amaranthus hybridus</i> (βλήτο) (Πείραμα Β5).	135
3.5.	Ανίχνευση πρωτεϊνών στο matrix των απομονωμένων ιδιοβλαστών στο <i>Vitis vinifera</i> (αμπέλι) (Πείραμα Α1).	137
3.6.	Τα χαρακτηριστικά του φθορισμού χλωροφύλλης σε διαφορετικές συνθήκες ατμόσφαιρας και φωτισμού παρουσία ή απουσία ABA	138
3.6.1.	Τα χαρακτηριστικά του φθορισμού της χλωροφύλλης σε διαφορετικές συνθήκες ατμόσφαιρας και φωτισμού παρουσία η απουσία ABA στο <i>Parietaria judaica</i> (Πείραμα Π4).	139
3.6.2.	Τα χαρακτηριστικά του φθορισμού της χλωροφύλλης σε διαφορετικές συνθήκες ατμόσφαιρας και φωτισμού παρουσία ή απουσία ABA στο <i>Amaranthus hybridus</i> (βλήτο) (Πείραμα Β6).....	141
3.6.3.	Τα χαρακτηριστικά του φθορισμού της χλωροφύλλης σε διαφορετικές συνθήκες ατμόσφαιρας και φωτισμού παρουσία ή απουσία ABA στο <i>Vitis vinifera</i> (Πείραμα Α2)....	144
3.7.	Υπολογισμός της χρονικής διάρκειας που δύναται να υποστηριχθεί η φωτοσύνθεση από την αποδόμηση των κυτταρικών εγκλείστων.	147

3.7.1. Υπολογισμός της χρονικής διάρκειας που δύναται να υποστηριχθεί η φωτοσύνθεση από την αποδόμηση των κρυστάλλων στο <i>Amaranthus hybridus</i> (Βλήτο)..	147
4. Συζήτηση	150
5. Βιβλιογραφία	160
6. Παράρτημα	173
6.1. Διαγραμματική Απεικόνιση των πειραμάτων.....	173
6.1.1. Πειράματα συσχέτισης της οντογένεσης των κυτταρικών εγκλείστων με τις λειτουργικές παραμέτρους των φύλλων (και για τα τρία πειραματόφυτα)	173
6.1.2. Εφαρμογή σημείου Αντιστάθμισης CO ₂ (Πειράματα Π0 και Β0).....	174
6.1.3. Αλλαγές στο μέγεθος των κυτταρικών εγκλείστων σε συνθήκες πενίας άνθρακα....	174
6.1.3.1. Πείραμα Π1	174
6.1.3.2. Πείραμα Π2	175
6.1.3.3. Πείραμα Β1	175
6.1.4. Τα στάδια των πειραμάτων των χαρακτηριστικών φθορισμού της χλωροφύλλης ...	176

Περίληψη

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή έγινε η προσπάθεια να διασαφηνιστεί η δομή και ο ρόλος των ιδιοβλαστών που σχηματίζουν κυτταρικά έγκλειστα οξαλικού και ανθρακικού ασβεστίου στα φυτά *Vitis vinifera* (αμπέλι), *Amaranthus hybridus* (βλήτο) και *Parietaria judaica* (περδικάκι) και η πιθανή συμβολή τους στη φωτοσύνθεση. Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν επαρκή πειραματικά δεδομένα σχετικά με το ρόλο των εγκλείστων αυτών. Η αποθήκευση και η ρύθμιση του Ca, η φυτοπροστασία και η αποτοξίνωση βαρέων μετάλλων είναι μερικοί από τους ρόλους που έχουν προταθεί. Ωστόσο, πειραματικά δεδομένα της ερευνητικής μας ομάδας έχουν δείξει ότι τα κυτταρικά έγκλειστα αποτελούν δυναμικές δομές και όχι τελικά προϊόντα του μεταβολισμού. Ως εκ τούτου διατυπώθηκε η υπόθεση εργασίας σύμφωνα με την οποία τα κυτταρικά έγκλειστα πιθανόν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαχείριση του άνθρακα των φωτοσυνθετικών ιστών και στη απόδοση CO₂ για την πραγματοποίηση της φωτοσύνθεσης σε συνθήκες πενίας άνθρακα ("φωτοσύνθεση κινδύνου"). Επίσης διατυπώθηκε η υπόθεση ότι τα έγκλειστα σχηματίζονται κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των φύλλων, όταν τα στομάτια δεν είναι πλήρως λειτουργικά

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω πραγματοποιήθηκε πείραμα κατά οποίο συλλέχθηκαν φύλλα και από τα τρία πειραματόφυτα, διαφορετικής ηλικίας, εκφραζόμενης από την επιφάνειά τους, και στη συνέχεια μετρήθηκαν και συσχετίστηκαν οι παράμετροι: ρυθμός φωτοσύνθεσης, ρυθμός διαπνόης, υποστοματική συγκέντρωση CO₂, στοματική αγωγιμότητα, πυκνότητα κυτταρικών εγκλείστων και συνολικός αριθμός κυτταρικών εγκλείστων ανά φύλλο. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα κυτταρικά έγκλειστα σχηματίζονται από τα πρώτα κιάλας στάδια έκπτυξης των φύλλων. Η πυκνότητά τους είναι αρχικά υψηλή και στη συνέχεια μειώνεται και σταθεροποιείται. Αντίθετη πορεία ακολουθεί ο συνολικός αριθμός τους ο οποίος αυξάνεται αλλά φτάνει σύντομα σε μέγιστη τιμή όπου και σταθεροποιείται. Παράλληλα, τα φύλλα φωτοσυνθέτουν σε μικρό βαθμό από τα πρώτα κιάλας στάδια της έκπτυξης τους χωρίς ωστόσο να έχουν τη δυνατότητα ανταλλαγής αερίων.

Σε επόμενο πείραμα ελέγχθηκε η μεταβολή του όγκου των κυτταρικών εγκλείστων στο βλήτο και το περδικάκι σε συνθήκες πενίας άνθρακα. Συνθήκες πενίας άνθρακα επικρατούν *in planta* όταν τα στομάτια κλείνουν είτε λόγω υδατικής καταπόνησης είτε λόγω επικράτησης δυσμενών καιρικών συνθηκών. Ένας αριθμός φύλλων κατηγοριοποιήθηκε σε δύο ομάδες χειρισμών: φύλλα control και φύλλα που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες πενίας άνθρακα (υδατική καταπόνηση, εφαρμογή ABA

ή/και παραμονή στο σημείο αντιστάθμισης για το CO₂). Μετά από παραμονή του κάθε χειρισμού κάτω από συνθήκες συνεχούς φωτισμού για 24 και 48 ώρες μετρήθηκε ο όγκος των κυτταρικών εγκλείστων. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα φύλλα στα οποία εφαρμόστηκε πενία άνθρακα εμφάνισαν σημαντικά μικρότερο όγκο κυτταρικών εγκλείστων (40-50 %) σε σχέση με τα φύλλα control. Στο περδικάκι, η προσθήκη ανθρακικών στο θρεπτικό διάλυμα των φύλλων της πενίας άνθρακα αντέστρεψε το φαινόμενο και οι κυστόλιθοι επανέκτησαν τις αρχικές τιμές του όγκου τους σε μικρό χρονικό διάστημα.

Το ανθρακικό ασβέστιο διαλύεται ελεύθερα στο υδατικό περιβάλλον, ενώ το οξαλικό οξύ εικάζεται πως οξειδώνεται ενζυμικά προς CO₂ και H₂O₂ με τη δράση του ενζύμου οξαλική οξειδάση. Για την επιβεβαίωση της λειτουργίας του μηχανισμού αυτού πραγματοποιήθηκε πείραμα ιστοχημικού εντοπισμού της οξαλικής οξειδάσης αλλά και της καταλάσης σε φύλλα control και φύλλα στα οποία εφαρμόστηκε πενία άνθρακα. Η οξαλική οξειδάση εντοπίστηκε στα κύτταρα του σπογγώδους παρεγχύματος των φύλλων και κυρίως στις κυτταρικές μεμβράνες ή τα κυτταρικά τοιχώματα. Μάλιστα σε κάθε χειρισμό δεν εμφανίστηκε χρώση στα κύτταρα του κολεού της δέσμης. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα σχετικά με την θέση της καταλάσης στους ιστούς των φύλλων. Ο βαθμός κατά τον οποίο αυξήθηκε η δραστηριότητα της οξαλικής οξειδάσης ελέγχθηκε με ενζυμική δοκιμή. Τα αποτελέσματα, αφενός επιβεβαίωσαν τον ιστοχημικό εντοπισμό αφού δραστηριότητα εμφανίστηκε μόνο στο κλάσμα των μεμβρανών-κυτταρικών τοιχωμάτων, αφετέρου έδειξαν πως η δραστηριότητα του ενζύμου στα φύλλα της πενίας άνθρακα ήταν 2 με 3 φορές υψηλότερη από ότι στα φύλλα control.

Στους ίδιους χειρισμούς πραγματοποιήθηκε ιστοχημικός εντοπισμός των ελεύθερων κατιόντων ασβεστίου. Το ασβέστιο, τόσο στο περδικάκι όσο και στο βλήτο, εντοπίστηκε στους ιδιοβλάστες και στα γειτονικά τους κύτταρα. Στο περδικάκι χρώση εμφανίστηκε και στους δύο χειρισμούς, ενώ αντιθέτως στο βλήτο μόνο στα φυτά της πενίας άνθρακα.

Στα φύλλα του αμπελιού πραγματοποιήθηκε ανάλυση SDS-PAGE στο matrix που περιβάλλει τις ραφίδες. Ανιχνεύτηκαν πρωτεΐνες που πιθανόν να παίζουν ρόλο στη διαχείριση του ασβεστίου, χωρίς ωστόσο να είναι γνωστή η ταυτότητά τους.

Συνοψίζοντας, το μέγεθος των κυτταρικών εγκλείστων μεταβάλλεται σε συνθήκες πενίας άνθρακα. Για τον έλεγχο του βαθμού στον οποίο συμβάλλουν στη φωτοσύνθεση πραγματοποιήθηκε, και στα τρία φυτικά είδη, μέτρηση των παραμέτρων φθορισμού της χλωροφύλλης σε μεταβαλλόμενες συνθήκες φωτισμού και σύστασης της

ατμόσφαιρας, τόσο σε φύλλα control όσο και σε φύλλα πενίας άνθρακα. Από τα αποτελέσματα προέκυψε πως, αφενός τα φύλλα της πενίας άνθρακα διατηρούν έναν ικανοποιητικό φωτοσυνθετικό ρυθμό ακόμα και στις συνθήκες αυτές, αφετέρου, όταν παύσουν οι συνθήκες που προκαλούν την πενία άνθρακα, είναι σε θέση να αποκτήσουν υψηλό ρυθμό φωτοσυνθετικής δραστηριότητας πολύ συντομότερα από ότι τα control φύλλα.

Υπάρχουν συνεπώς σαφείς ενδείξεις πως τα κυτταρικά έγκλειστα συμβάλλουν στη φωτοσυνθετική διαδικασία. Εκτιμάται πως στην περίπτωση του *P. judaica* οι κυστόλιθοι έχουν τη δυνατότητα να υποστηρίξουν ρυθμό φωτοσύνθεσης $14,27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για 30 min περίπου, και στο *A. hybridus* ρυθμό φωτοσύνθεσης $13,01 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για 70 min.

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την υπόθεση εργασίας για τη λειτουργία των κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου ως αποθεμάτων φωτοσυνθετικού άνθρακα. Η λειτουργία αυτή θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως «φωτοσύνθεση κινδύνου» η οποία επάγεται από το ABA και είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση σε συνθήκες έλλειψης νερού. Εκτός αυτού, η φωτοσύνθεση κινδύνου δίδει τη δυνατότητα ανάκτησης του CO₂ το οποίο απελευθερώνεται μέσω της νυκτερινής αναπνοής (του υπέργειου, αλλά και του υπόγειου τμήματος του φυτού) και επομένως εξοικονομούνται σκελετοί άνθρακα. Αποτρέπει την άνοδο της συγκέντρωσης του CO₂ σε τοξικά επίπεδα στα κύτταρα, τουλάχιστον στη διάρκεια της νύκτας, όταν τα στόματα παραμένουν κλειστά και δεν υπάρχει δυνατότητα φωτοσυνθετικής αφομοίωσης του εκλυόμενου αναπνευστικού CO₂. Επίσης δίδει τη δυνατότητα τροφοδοσίας των φύλλων με ανόργανο άνθρακα από το υπόγειο τμήμα του φυτού ή από το έδαφος, με ενδιάμεσο σταθμό ελέγχου της διάθεσής του τα κύτταρα που σχηματίζουν τους κρυστάλλους.

Abstract

This thesis focuses on the study of the structure and role of the idioblasts that produce calcium carbonate and calcium oxalate crystals in three plant species (*Vitis vinifera*, *Amaranthus hybridus* and *Parietaria judaica*) and their possible positive effect on photosynthetic activity. To-date there have been limited experimental data concerning their role in plant physiology. Some of the physiological roles attributed to them include calcium storage and calcium tissue concentration adjustment, plant protection against herbivorous animals and chewing insects, and the sequestration of excess heavy metal ions by means of crystal binding. Recent data of our research team have shown that the calcium carbonate and calcium oxalate crystals constitute dynamic systems rather than end-products of plant metabolism. Therefore, it is proposed that calcium carbonate and calcium oxalate crystals may constitute carbon rather than calcium deposits in plants and that they may provide CO₂ to the continuation of photosynthesis during carbon starvation conditions (“alarm photosynthesis”). It is also proposed that these crystals are formed during the early stages of leaf development when the stomata are not functional.

In this context, an experiment was designed for all three species during which leaves of different ages (as it was expressed by their surface area) were collected and the values of the parameters: photosynthetic rate, transpiration rate, substomatal CO₂ concentration, stomatal conductance, crystal density and total crystals per leaf were measured and correlated. The results showed that the crystals are formed during the first stages of leaf development. At this stage, their density is high but it reduces by leaf age and stabilizes to a specific value. Total crystal number per leaf follows the opposite course, as it is low at first and then increases by leaf age until it stabilizes to a specific value. At the same time, it was shown that even young leaves demonstrate low photosynthetic rate even though their stomata are not functional and are therefore unable to allow gas exchange with the atmosphere.

In another experiment, the effect of carbon starvation on crystal size was tested in leaves of plants of *P. judaica* and *A. hybridus*. Carbon starvation conditions occur *in planta* when stomata remain closed due to water stress or the occurrence of high wind speed. The leaves were categorized into two groups: control leaves and leaves that

remained under carbon starvation conditions (by imposing water stress, by applying ABA, and by allowing to photosynthesize in airtight chambers at the CO₂ compensation point). After 24 and 48 hours under constant illumination crystal size was measured. The results showed that the group of leaves that were subjected to the carbon starvation conditions contained crystals of significantly smaller size than the control leaves (50-60% smaller). The addition of carbonates in the nutrient solution of carbon starvation treated leaves of *P. judaica* led to a complete reversal of the phenomena as the crystal size regained its pre-treatment size.

Calcium carbonate is freely dissolved in aqueous solutions. Oxalic acid, however, is considered to be oxidized to CO₂ and H₂O₂ by the effect of the enzyme oxalic oxidase. In order to verify this assumption an experiment of oxalic oxidase and catalase histochemical detection in control and carbon starvation treated leaves of *A. hybridus* was designed. Oxalic oxidase was detected in the membranes or cell wall of the spongy cells. Furthermore, no staining appeared in the bundle sheath cells in any case. Catalase staining gave similar results. Oxalic oxidase specific activity was measured by means of enzymic assay. The results on one hand, confirmed the histochemical detection results (only the cell membrane and cell wall fraction of the leaf extract showed activity of the enzyme), and on the other hand showed that the enzyme's specific activity was 2 to 3 times higher in carbon starvation treated leaves than in control leaves.

An experiment of histochemical detection of free calcium cations was performed to control and carbon starvation treated leaves of *P. judaica* and *A. hybridus*. The results showed that free calcium cations are present to the idioblasts and some of the surrounding cells in both species. In *P. judaica* the staining solution reacted in both treatments. In *A. hybridus*, however, only the carbon starvation treated leaves were stained.

An SDS-PAGE analysis of the matrix that envelops the raphide crystals of *V. vinifera*, led to the detection of a number of proteins of variable molecular weights. These proteins may be involved with calcium management, their identity however remains unknown.

To sum up then, carbon starvation leads to the alteration of the size of the calcium carbonate and calcium oxalate crystals. The chlorophyll fluorescence parameters of control and carbon starvation treated leaves under various lighting conditions and atmospheric composition, of all three species, were measured in order to test the assumption that these crystals contribute to the photosynthesis. The results showed that carbon starvation treated leaves, are not only able to maintain a considerable photosynthetic rate even under these conditions, but also have the capacity to regain high photosynthetic rate when the carbon starvation conditions are lifted faster than the control leaves.

Consequently, there are many indications that calcium carbonate and calcium oxalate crystals contribute to the photosynthetic procedure. It is estimated that, in the case of *P. judaica*, the cystoliths are able to support a mean photosynthetic rate of 14,27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 30 min, and in the case of *A. hybridus* a mean photosynthetic rate of 13,01 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 70 min.

Combined, the results of the experiments confirmed our initial working hypothesis that the calcium carbonate and calcium oxalate crystals can provide the substrate for the photosynthetic carbon fixation under adverse conditions. This function could be described as an “alarm photosynthesis” biochemical path and is vital for the survival of the plants under water stress conditions. Moreover, it enables the use of CO_2 that is released through dark respiration, thus avoiding carbon losses, while preventing the increase in the CO_2 concentration at toxic levels inside the cells. Finally, it enables the supply of the leaves with inorganic carbon from the root and the soil, using the cells in which the calcium oxalate crystals are formed as an intermediate control node.

Εισαγωγή

1. Εισαγωγή

1.1. Η φωτοσύνθεση

Η επιβίωση όλων των ειδών που ζουν πάνω στον πλανήτη προϋποθέτει την κατανάλωση ενέργειας. Η ενέργεια ωστόσο δεν παράγεται εκ του μηδενός αλλά μετατρέπεται από τη μια μορφή στην άλλη. Η σημαντικότερη περίπτωση μιας τέτοιας μετατροπής σε πλανητικό επίπεδο είναι η μετατροπή της ενέργειας ακτινοβολίας σε βιοχημική (Μανέτας, 2005; Taiz and Zeiger, 2010).

Οι οργανισμοί που έχουν τη δυνατότητα να φωτοσυνθέσουν είναι κυρίως τα φυτά, τα φύκη και τα κυανοβακτήρια και ονομάζονται φωτοσυνθετικοί ή φωτοαυτότροφοι οργανισμοί (Purve et al, 2003; Αϊβαλάκις και άλλοι, 2005; Alberts et al, 2008). Διαθέτουν τους κατάλληλους βιοχημικούς και φυσιολογικούς μηχανισμούς που τους επιτρέπουν να ενσωματώνουν την ενέργεια της φωτεινής ακτινοβολίας, που προσλαμβάνουν από τον ήλιο, σε μόρια οργανικών ενώσεων, με πρώτες ύλες ανόργανα συστατικά και νερό (Purve et al, 2003; Αϊβαλάκις και άλλοι, 2005). Οι υπόλοιποι οργανισμοί στον πλανήτη εξαρτώνται από την κατανάλωση φωτοαυτότροφων οργανισμών για να προσλάβουν την απαραίτητη ενέργεια για τις βιοχημικές διεργασίες τους.

Εκτός από την επιβίωση, σχεδόν όλες οι ανθρώπινες δραστηριότητες εξαρτώνται από την χρήση ενέργειας που έχει προκύψει από τη φωτοσύνθεση. Οι κύριες πηγές ενέργειας για την τροφοδοσία των μηχανών, τουλάχιστον προς το παρόν, είναι τα ορυκτά καύσιμα, το πετρέλαιο και το φυσικό αέριο. Η ενέργεια που βρίσκεται εγκλωβισμένη στα καύσιμα αυτά προήλθε από την φωτοσύνθεση οργανισμών πολλά εκατομμύρια χρόνια πριν (Καράταγλης, 1999; Stern et al, 2008; Taiz and Zeiger, 2010).

Η φωτοσύνθεση στα ανώτερα φυτά πραγματοποιείται στους χλωροπλάστες και περιλαμβάνει δύο φάσεις (Purve et al, 2003; Μανέτας, 2005; Alberts et al, 2008; Stern et al, 2008; Taiz and Zeiger, 2010). Η πρώτη φάση ονομάζεται φωτεινή φάση ή φάση των φωτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης επειδή για την ολοκλήρωσή της είναι απαραίτητη η ύπαρξη φωτεινής ακτινοβολίας. Κατά τη διάρκειά της φάσης αυτής, η φωτεινή ενέργεια χρησιμοποιείται για τη φωτόλυση του νερού και τη λειτουργία μιας ηλεκτροχημικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων που έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή του NADP^+ σε NADPH και την μετατροπή του ADP σε ATP . Η δεύτερη φάση ονομάζεται σκοτεινή φάση ή φάση των σκοτεινών αντιδράσεων. Η ονομασία της φάσης αυτής υποδηλώνει ότι η ύπαρξη φωτεινής ακτινοβολίας δεν είναι αναγκαία. Ωστόσο,

είναι άμεσα συνδεδεμένη και εξαρτημένη από τη φωτεινή φάση, γιατί σε αυτή γίνεται η χρήση των NADPH και ATP για την αναγωγή του ατμοσφαιρικού CO₂ σε υδατανθρακικές μονάδες [CH₂O] και κατ' επέκταση σε σάκχαρα (Purve et al, 2003; Μανέτας, 2005; Stern et al, 2008; Taiz and Zeiger, 2010).

Η απλοποιημένη εξίσωση της φωτοσύνθεσης είναι (Purve et al, 2003; Stern et al, 2008):



Κατά τη διάρκεια της φωτόλυσης του νερού στις φωτεινές αντιδράσεις, προκύπτει ως παραπροϊόν μοριακό οξυγόνο, το οποίο εμπλουτίζει συνεχώς την ατμόσφαιρα και είναι απαραίτητο για την επιβίωση των αερόβιων οργανισμών. Επομένως, η χλωρίδα του πλανήτη, εκτός από ενέργεια, προμηθεύει οξυγόνο στη βιόσφαιρα.

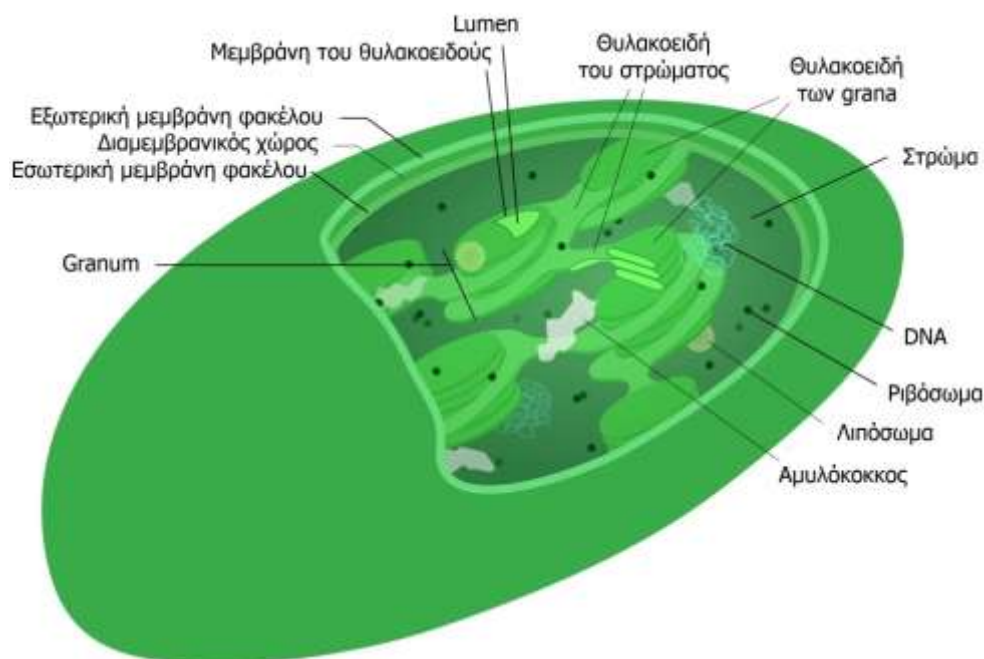
1.1.1. Ο χλωροπλάστης

Στους ευκαρυωτικούς φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, και οι δύο φάσεις της φωτοσύνθεσης πραγματοποιούνται σε εξειδικευμένα οργανίδια, τους χλωροπλάστες. Εκεί λαμβάνουν μέρος τόσο οι φωτεινές όσο και οι σκοτεινές αντιδράσεις.

Οι χλωροπλάστες ανήκουν σε μια κατηγορία κυτταρικών οργανιδίων, τα πλαστίδια. Αντίθετα προς τα υπόλοιπα πλαστίδια, οι χλωροπλάστες έχουν χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα λόγω της παρουσίας χλωροφύλλης (Μανέτας, 2005; Wayne, 2009). Υπάρχουν βάσιμες ενδείξεις ότι οι χλωροπλάστες προέρχονται από φωτοσυνθετικά βακτήρια τα οποία μέσω ενδοκύττωσης δημιούργησαν ενδοσυμβιωτική σχέση με ευκαρυωτικά κύτταρα κατά το απώτερο γεωλογικό παρελθόν (Καράταγλης, 1999; Alberts et al, 2008; Taiz and Zeiger, 2010).

Για να επιτελέσουν την πολύπλοκη φωτοσυνθετική διαδικασία, οι χλωροπλάστες παρουσιάζουν ιδιαίτερη σχέση δομής - λειτουργίας. Το σχήμα τους είναι δισκοειδές με διάμετρο από 3 μm ως 10 μm και εξωτερικά περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη (φάκελος χλωροπλάστη). Οι δύο μονές μεμβράνες, πάχους 6 nm ως 8 nm απέχουν μεταξύ τους 10 nm ως 20 nm. Η διπλή αυτή μεμβράνη ελέγχει την είσοδο – έξοδο μορίων και σε αυτή εντοπίζονται πρωτεΐνες μεταφορείς μεταβολιτών (Αϊβαλάκης και άλλοι, 2005; Alberts et al, 2008; Wayne, 2009). Εσωτερικά του φακέλου περικλείεται ένα άμορφο ζελατινώδες υλικό, το στρώμα, στο οποίο εντοπίζονται τα υδατοδιαλυτά ένζυμα τα οποία

καταλύουν τις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης. Εντός του στρώματος αναπτύσσεται ένα δίκτυο μεμβρανών, πάχους 7 nm με 9 nm, που σχηματίζει δισκοειδείς ασκούς, τα θυλακοειδή του στρώματος. Σε ορισμένες θέσεις 10 με 20 θυλακοειδή συγκροτούν συστοιχίες που ονομάζονται grana. Τα θυλακοειδή που συμμετέχουν στη συστοιχία ονομάζονται θυλακοειδή των grana. Ο εσωτερικός χώρος που περιβάλλεται από τα θυλακοειδή καλείται lumen. Θεωρείται μάλιστα πως τα lumen των θυλακοειδών επικοινωνούν μεταξύ τους σχηματίζοντας έναν ενιαίο χώρο (Alberts et al, 2008; Wayne, 2009). Στο λιπόφιλο περιβάλλον των μεμβρανών των θυλακοειδών εντοπίζονται οι πρωτεΐνες και οι φωτοσυνθετικές χρωστικές που είναι υπεύθυνες για τις φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης.



Εικόνα 1.1 Η δομή του χλωροπλάστη.
Πηγή: <http://en.wikipedia.org/wiki/Chloroplast>

Οι χλωροπλάστες περιέχουν DNA, RNA και ριβοσώματα. Το χαρακτηριστικό αυτό τους δίνει την δυνατότητα αυτόνομης σύνθεσης πρωτεϊνών (Μανέτας, 2005; Taiz and Zeiger, 2010). Επομένως οι χλωροπλάστες παρουσιάζουν σχετική αυτονομία σε σχέση με τον πυρήνα. Υπάρχουν μάλιστα περιπτώσεις που το DNA του χλωροπλάστη κωδικοποιεί ορισμένες υπομονάδες μιας πρωτεΐνης η οποία συντίθενται στα ριβοσώματα του χλωροπλάστη, ενώ άλλες υπομονάδες της ίδιας πρωτεΐνης συντίθενται στα

ριβοσώματα του κυττοπλάσματος και κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA (Taiz and Zeiger, 2010).

Οι χλωροπλάστες, εκτός από την κύρια λειτουργία τους που είναι η παραγωγή ενέργειας μέσω της φωτοσύνθεσης, είναι επιφορτισμένοι και με τη διαχείριση της ενέργειας αυτής μέσω ενδόθερμων αντιδράσεων όπως η αφομοίωση του αζώτου και των θεικών, η σύνθεση ορισμένων αμινοξέων, λιπαρών οξέων, λιπιδίων, φυτοορμονών και δευτερογενών μεταβολιτών. Εκτός αυτών, στους χλωροπλάστες πραγματοποιείται και αποθησαυρισμός διαφόρων ενώσεων (κυρίως υδατανθράκων και λιπιδίων) (Αϊβαλάκις και άλλοι, 2005; Stern et al, 2008; Alberts et al, 2008).

1.1.2. Η φωτεινή φάση

1.1.2.1. Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές

Στις μεμβράνες των θυλακοειδών του χλωροπλάστη εντοπίζεται μεγάλος αριθμός μορίων λιπόφιλων χρωστικών. Αυτές συμμετέχουν στη φωτοσυνθετική λειτουργία είτε άμεσα, μέσω της απορρόφησης της ενέργειας της ηλιακής ακτινοβολίας, είτε έμμεσα προστατεύοντας τη φωτοσυνθετική συσκευή (Καράταγλης, 1999; Taiz and Zeiger, 2010). Οι κυριώτερες ομάδες φωτοσυνθετικών χρωστικών στα πράσινα φυτά είναι οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή ενώ στα βακτήρια και τα κυανοφύκη απαντώνται επίσης βακτηριοχλωροφύλλες και φυκοβιλίνες (Αϊβαλάκις και άλλοι, 2005; Stern et al, 2008; Taiz and Zeiger, 2010).

Οι χλωροφύλλες διαθέτουν πράσινο χρώμα το οποίο οφείλεται στο φάσμα απορρόφησής τους, το οποίο εμφανίζει δύο μέγιστα, ένα στην μπλε περιοχή (440-480 nm) και ένα στην ερυθρή (650-700 nm) (Purve et al, 2003; Taiz and Zeiger, 2010). Το μόριο της χλωροφύλλης αποτελείται από έναν πορφυρινικό δακτύλιο και από ένα λιπόφιλο γραμμικό μόριο, τη φυτόλη. Ο πορφυρινικός δακτύλιος σχηματίζεται από την σύνδεση τεσσάρων πυρολικών δακτυλίων με δεσμούς άνθρακα-άνθρακα. Τα άζωτα των πυρολικών δακτυλίων συγκρατούν στο κέντρο του πορφυρινικού δακτυλίου ένα μόριο μαγνησίου, ενώ ανάμεσα στους δακτυλίους III και IV σχηματίζεται ένας δακτύλιος κυκλοπεντανόνης. Ο υποκαταστάτης του δακτυλίου II ορίζει τον τύπο της χλωροφύλλης (a,b,c,d,e). Στα πράσινα φυτά απαντώνται η a και η b, συνήθως σε αναλογία 3:1, ενώ οι άλλοι τύποι χλωροφυλλών απαντώνται σε φωτοσυνθετικά βακτήρια. Στη χλωροφύλλη a ο υποκαταστάτης του δακτυλίου II είναι ένα μεθύλιο ενώ στην b μια αλδεϋομάδα (Καράταγλης, 1999; Purve et al, 2003; Stern et al, 2008; Taiz and Zeiger, 2010). Ο

πορφυρινικός δακτύλιος αποτελεί τη χρωμοφόρο ομάδα της χλωροφύλλης και κατά συνέπεια το τμήμα του μορίου που ευθύνεται για την απορρόφηση της ενέργειας της φωτεινής ακτινοβολίας μέσω διέγερσης. Η ιδιότητα αυτή οφείλεται στην ύπαρξη μεγάλου αριθμού εναλλασσόμενων διπλών δεσμών και χαλαρά συνδεδεμένων ηλεκτρονίων (Αϊβαλάκις και άλλοι, 2005; Taiz and Zeiger, 2010). Η φυτόλη αποτελεί το λιπόφιλο τμήμα του μορίου (διαθέτει χαρακτηριστικά λιπιδίου) και συνδέει το μόριο της χλωροφύλλης στις στοιβάδες των λιπιδίων των θυλακοειδών (Purve et al, 2003; Μανέτας, 2005; Stern et al, 2008; Taiz and Zeiger, 2010).

Η άλλη μεγάλη ομάδα χρωστικών, η οποία απαντάται σε όλους τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, είναι τα καροτενοειδή. Παρουσιάζουν κίτρινο - πορτοκαλί χρωματισμό και το φάσμα απορρόφησής τους εμφανίζει μέγιστο στην μπλε περιοχή. Από άποψη χημικής δομής ανήκουν στα τερπένια, αφού αποτελούνται από ευθύγραμμη αλυσίδα 40 ατόμων άνθρακα στην οποία εναλλάσσονται μονοί και διπλοί δεσμοί. Τα καροτενοειδή με χαρακτηριστική δομή υδρογονάνθρακα ονομάζονται καροτένια (πέντε τύποι: α,β,γ,δ και ε με σημαντικότερα το α και κυρίως το β καροτένιο), ενώ τα οξυγονωμένα παράγωγά τους ονομάζονται ξανθοφύλλες (Αϊβαλάκις και άλλοι, 2005). Τα καροτένια και οι ξανθοφύλλες είτε συμβάλλουν στην απορρόφηση φωτεινής ενέργειας για την πραγματοποίηση της φωτοσύνθεσης, είτε παρέχουν προστασία στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό, γι' αυτό χαρακτηρίζονται ως βοηθητικές φωτοσυνθετικές χρωστικές (Καράταγλης, 1999; Purve et al, 2003; Taiz and Zeiger, 2010).

Το ηλιακό “φως” αποτελεί ουσιαστικά μια συνεχή εκπομπή φωτονίων διαφορετικού μήκους κύματος. Όταν φωτόνιο κατάλληλου μήκους κύματος απορροφηθεί από ένα μόριο χλωροφύλλης τότε ένα ηλεκτρόνιο στον πορφυρινικό δακτύλιο μεταπηδά από ένα χαμηλότερο ενεργειακά μοριακό τροχιακό σε ένα υψηλότερο. Συνεπώς το μόριο της χλωροφύλλης από τη θεμελιώδη κατάσταση μεταπίπτει στη διεγερμένη.

Το διεγερμένο μόριο έχει την τάση να αποβάλλει την πλεονάζουσα ενέργεια και να επιστρέψει στην θεμελιώδη κατάσταση. Η αποδιέγερση αυτή μπορεί να συμβεί με τέσσερις τρόπους:

- α. με την μορφή θερμότητας
- β. με την εκπομπή φωτονίου μεγαλύτερου μήκους κύματος από αυτό που απορροφήθηκε (φθορισμός).
- γ. με τη μεταφορά της ενέργειας σε ένα ηλεκτρόνιο διπλανού μορίου (μεταφορά διέγερσης).

δ. με την απόδοση του διηγημένου ηλεκτρονίου σε ένα γειτονικό μόριο δέκτη και την ταυτόχρονη πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου από κάποιο μόριο δότη (διαχωρισμός φορτίου).

Και οι τέσσερις τρόποι λαμβάνουν μέρος κατά τη διάρκεια της λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, αλλά μόνο οι δύο τελευταίοι δημιουργούν τις προϋποθέσεις αξιοποίησης των φωτονίων για παραγωγή χημικού έργου (δηλαδή σύνθεση σταθερών μορίων) (Purve et al, 2003; Μανέτας, 2005; Alberts et al, 2008; Wayne, 2009; Taiz and Zeiger, 2010).

1.1.2.2. Τα Πρωτεϊνικά σύμπλοκα των φωτεινών αντιδράσεων

Οι φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης πραγματοποιούνται σε μεγαλομοριακά σύμπλοκα πρωτεϊνών – χρωστικών τα οποία εντοπίζονται στις μεμβράνες των θυλακοειδών. Τέσσερα σημαντικά είδη συμπλόκων συμμετέχουν στις αντιδράσεις αυτές:

- α. το φωτοσύστημα II (PSII)
- β. το σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων (cyt_{b_6-f})
- γ. το φωτοσύστημα I (PSI)
- δ. η συνθετάση του ATP (ATPase)

Τα φωτοσυστήματα I και II αποτελούν μεγαλομοριακά σύμπλοκα πρωτεϊνών με μόρια φωτοσυνθετικών χρωστικών. Το PS II μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις μεγάλες λειτουργικές μονάδες: τη φωτοσυλλεκτική κεραία (LHCII), το σύμπλοκο του φωτοχημικού κέντρου (RC), και το σύμπλοκο της φωτόλυσης του νερού (OEC). Η φωτοσυλλεκτική κεραία αποτελείται από μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία συνδέεται με 15 μόρια χλωροφύλλης a και b και μόρια καροτενοειδών (Alberts et al, 2008; Taiz and Zeiger, 2010). Το σύμπλοκο του φωτοχημικού κέντρου αποτελείται από δύο μονομερή στα οποία εντοπίζονται 18 περίπου μόρια χλωροφύλλης a, εκ των οποίων τα δύο αποτελούν το φωτοχημικό κέντρο της αντίδρασης (ονομάζεται P_{680} επειδή παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 680 nm), ορισμένα μόρια β-καροτενίου, ένα μόριο φαιοφυτίνης, δύο πλαστοκινόνες, ένα μόριο αίμης με ένα ιόν Fe^{2+} και 2 ιόντα Ca^{2+} (Rutherford and Faller, 2003; Alberts et al, 2008; Stern et al, 2008; Guskov et al, 2009; Wayne, 2009; Taiz and Zeiger, 2010). Το σύμπλοκο φωτόλυσης του νερού παίζει σημαντικό ρόλο στην οξείδωση του νερού και περιέχει 4 ιόντα μαγγανίου και ιόντα Cl^- . Για την σταθεροποίηση του μαγγανίου, στο σύμπλοκο συμμετέχει και μια πρωτεΐνη

σταθεροποίησης (PsbO) (Stern et al, 2008; Alberts et al, 2008; Wayne, 2009; Taiz and Zeiger, 2010).

Το PS I, σε αντίθεση με το PS II, περιλαμβάνει μια κεραία φωτοσυλλογής η οποία αποτελεί μέρος του κέντρου αντίδρασης και η οποία απαρτίζεται από εκατοντάδες μόρια χλωροφύλλης a και b, καθώς και από καροτενοειδή (Stern et al, 2008; Alberts et al, 2008; Wayne, 2009; Taiz and Zeiger, 2010). Εκτός από την κεραία αυτή, εικάζεται ότι στη μεταφορά διέγερσης στο PSI συνδράμουν φωτοσυλλεκτικές κεραίες με δομή παρόμοια με των LHCII που ονομάζονται LHCI (Wayne, 2009; Taiz and Zeiger, 2010). Το φωτοχημικό κέντρο της αντίδρασης απαρτίζεται από δύο μόρια χλωροφύλλης a, όπως και στο PSII, και ονομάζεται P₇₀₀ επειδή εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 700 nm (Stern et al, 2008; Alberts et al, 2008; Wayne, 2009; Taiz and Zeiger, 2010).

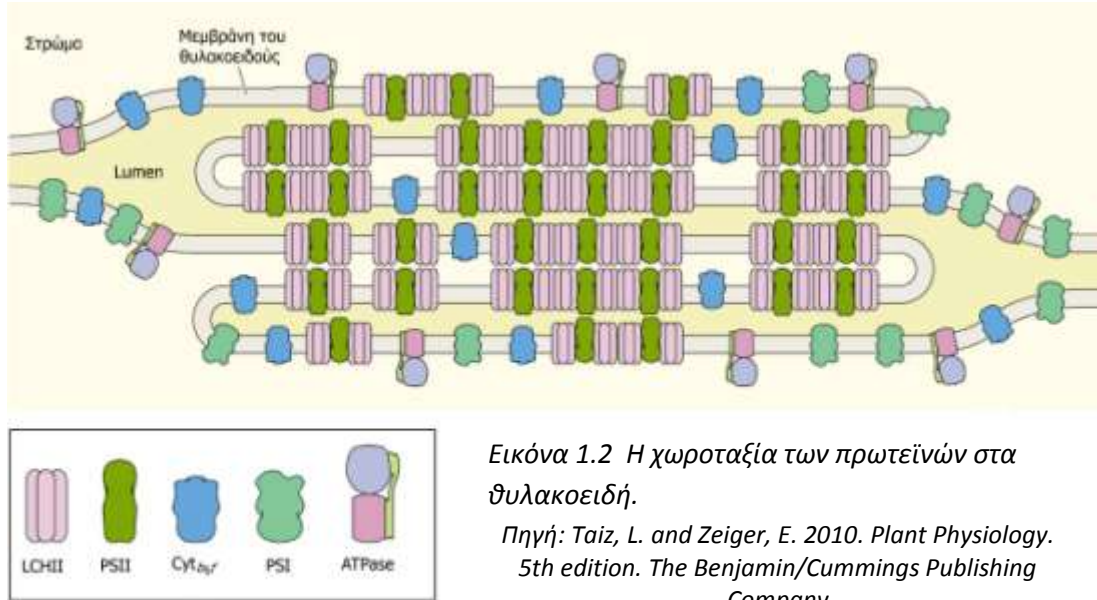
Το σύμπλοκο των κυττοχρωμάτων cyt_{b6-f} απαρτίζεται από μόρια πρωτεϊνών που περιέχουν ως προσθετικές ομάδες δύο ομάδες αίμης τύπου β και μια τύπου γ. Λειτουργεί ως ενδιάμεσος φορέας ηλεκτρονίων κατά μήκος των θυλακοειδών αλλά και ως αντλία η οποία μεταφέρει πρωτόνα από το στρώμα προς το lumen (Stern et al, 2008; Alberts et al, 2008; Wayne, 2009; Taiz and Zeiger, 2010).

Τέλος, η συνθετάση του ATP είναι ένα διαμεμβρανικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο αποτελείται από δύο μεγάλες υποομάδες. Η μία είναι υδρόφοβη και είναι προσδεδεμένη στο θυλακοειδές ενώ η δεύτερη προεξέχει προς τη μεριά του στρώματος. Η συνθετάση του ATP λειτουργεί και αυτή ως αντλία πρωτονίων από το lumen προς το στρώμα με την ταυτόχρονη χρήση της ενέργειας που απελευθερώνεται για τη φωσφορυλίωση του ADP σε ATP (Αϊβαλάκης και άλλοι, 2005; Stern et al, 2008; Alberts et al, 2008; Wayne, 2009; Taiz and Zeiger, 2010).

1.1.2.3. Χωροταξία των Πρωτεϊνών στα Θυλακοειδή

Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα δεν είναι τυχαία τοποθετημένα στη διπλοστοιβάδα των θυλακοειδών. Τα σύμπλοκα του PS II εντοπίζονται κυρίως σε περιοχές όπου τα θυλακοειδή στοιβάζονται σε grana. Μάλιστα έχει υπολογιστεί ότι στα grana εντοπίζονται 1200 με 1700 PSII ανά μm^2 μεμβράνης ενώ στα θυλακοειδή του στρώματος 300 με 700 PSII ανά μm^2 . Σύμπλοκα του PSI εντοπίζονται κυρίως στα θυλακοειδή του στρώματος καθώς και στα θυλακοειδή των grana που έρχονται σε άμεση επαφή με το στρώμα. Στα θυλακοειδή του στρώματος εντοπίζονται 2100 με 3300 σύμπλοκα PSI ανά μm^2 και στα θυλακοειδή των grana 250-400 σύμπλοκα PSI ανά μm^2 . Το cyt_{b6-f} είναι κατανεμημένο ομοιόμορφα ανάμεσα στα θυλακοειδή των grana και του στρώματος και με μια πυκνότητα

που κυμαίνεται μεταξύ 850 και 1300 σύμπλοκα ανά μm^2 . Η ATPase ακολουθεί την κατανομή του PSII και γι αυτό εντοπίζεται κυρίως στα θυλακοειδή του στρώματος σε πυκνότητα 1000 με 1600 σύμπλοκα ανά μm^2 (Wayne, 2009; Taiz and Zeiger, 2010).



Εικόνα 1.2 Η χωροταξία των πρωτεϊνών στα θυλακοειδή.

Πηγή: Taiz, L. and Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*. 5th edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company

Η αναλογία μεταξύ των PSII και PSI ανέρχεται συνήθως σε 1,5:1. Ωστόσο, δεν παραμένει σταθερή αφού εξαρτάται από τις συνθήκες φωτισμού και το είδος του φυτού. Σε ορισμένες περιπτώσεις διαφέρει ανάμεσα στους χλωροπλάστες διαφορετικών κυττάρων του ίδιου φυτού (Taiz and Zeiger, 2010). Για παράδειγμα οι χλωροπλάστες των κυττάρων του κολεού της δέσμης σε ορισμένα C4 φυτά διαθέτουν μικρό αριθμό grana και συνεπώς περιορισμένα σύμπλοκα PSII με αποτέλεσμα η αναλογία PSII να ανατρέπεται προς όφελος του PSI (Polya and Osmond, 1972; Andersen et al, 1972; Bishop et al, 1972; Wrisher, 1989).

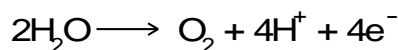
1.1.2.4. Οι Φωτεινές Αντιδράσεις

1.1.2.4.1. Μη Κυκλική Φωτοχημική Ροή

Όταν ο χλωροπλάστης δέχεται φως τότε τα μόρια των χρωστικών στις φωτοσυλλεκτικές κεραίες του PSII απορροφούν φωτόνια κατάλληλου μήκους κύματος και μεταπίπτουν σε κατάσταση διέγερσης. Η διέγερση αυτή μεταδίδεται μέσω κατάλληλων μορίων διευθετημένων με συγκεκριμένη σειρά προς το φωτοχημικό κέντρο της αντίδρασης:



Κατά τη διαδικασία αυτή παρατηρούνται ενεργειακές απώλειες γιατί ένα μέρος της ενέργειας διέγερσης χάνεται υπό τη μορφή θερμότητας κατά τη μεταφορά. Η χλωροφύλλη *a* του κέντρου της αντίδρασης διεγείρεται ($\text{Chl} \rightarrow \text{Chl}^*$) και αποκτά έντονο αναγωγικό χαρακτήρα. Το ηλεκτρόνιο που έχει μεταπηδήσει σε υψηλότερη ενεργειακή στάθμη αποσπάται εύκολα και αποδίδεται στο μόριο της φαιοφυτίνης η οποία ανάγεται ενώ η χλωροφύλλη *a* οξειδώνεται ($\text{Chl}^* \rightarrow \text{Chl}^+$). Ταυτόχρονα το νερό που βρίσκεται στο lumen οξειδώνεται από το σύμπλοκο φωτόλυσης του νερού και διασπάται σε O_2 , H^+ και e^- .



Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα τα ηλεκτρόνια που παράγονται από τη φωτόλυση του νερού να αντικαθιστούν ταχέως τα ηλεκτρόνια που έχουν αποσπαστεί από τη Chl του φωτοχημικού κέντρου με τελικό αποτέλεσμα την επαναφορά της χρωστικής στη βασική κατάσταση διέγερσης.

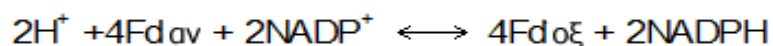
Η φαιοφυτίνη αποδίδει το ηλεκτρόνιο που παρέλαβε από το κέντρο της αντίδρασης στην πρώτη από τις δύο πλαστοκινόνες, την Q_A . Η Q_A είναι συνδεδεμένη ισχυρά με το σύμπλοκο του PSII και έτσι δεν μετακινείται. Ωστόσο, όταν δεχτεί το ηλεκτρόνιο από την φαιοφυτίνη προκαλεί με τη σειρά της αναγωγή της δεύτερης πλαστοκινόνης, της Q_B . Αυτή, μόλις δεχτεί δύο ηλεκτρόνια από την Q_A , και βρεθεί στην πλέον ανηγμένη μορφή Q_B^{2-} , αποσπά δύο πρωτόνια από το στρώμα και μετατρέπεται σε πλαστοϋδροκινόνη (QH_2). Τότε αποσυνδέεται από το PSII και κινείται ελεύθερα στο υδατανθρακικό μέρος της μεμβράνης του θυλακοειδούς προς το σύμπλοκο του

κυτοχρώματος cyt_{b_6-f} . Εκεί πραγματοποιείται η αναγωγή του κυτοχρώματος cyt_{b_6-f} σε δύο φάσεις.

Στην πρώτη φάση η QH_2 δίνει τα δύο ηλεκτρόνια στο κυτόχρωμα και ταυτόχρονα απελευθερώνει τα δύο πρωτόνια στο lumen. Το ένα από τα δύο ηλεκτρόνια μεταφέρεται από το κυτόχρωμα στον επόμενο μεταφορέα, την πλαστοκυανίνη, ενώ το άλλο ανάγει ξανά την Q_B σε ημικινόνη ($\text{Q}^- \cdot$). Η δεύτερη φάση γίνεται όπως και η πρώτη με τη διαφορά ότι το ηλεκτρόνιο που μένει στο κυτόχρωμα ανάγει την ημικινόνη σε υδροκινόνη. Συνεπώς, για κάθε δύο ηλεκτρόνια που μεταφέρονται από την πλαστοκινόνη στο κυτόχρωμα, τέσσερα πρωτόνια μεταπηδούν από το στρώμα στο lumen.

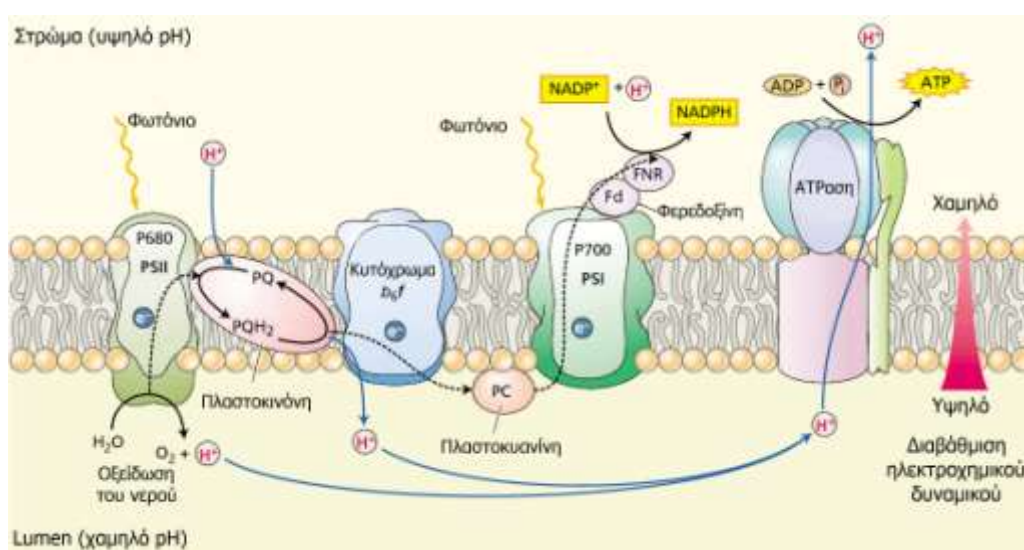
Το κυτόχρωμα στη συνέχεια ανάγει την πλαστοκυανίνη, μια υδατοδιαλυτή χαλκούχο πρωτεΐνη χαμηλού μοριακού βάρους, η οποία αφού αναχθεί κινείται στο lumen και μεταφέρει το ηλεκτρόνιο που έχει αποσπάσει από το κυτόχρωμα στο φωτοχημικό κέντρο της αντίδρασης του PSI. Η φωτοσυλλεκτική κεραία του PSI απορροφά φωτόνια κατά τον ίδιο τρόπο με το PSII και έτσι ένα ηλεκτρόνιο της χλωροφύλλης a του φωτοχημικού του κέντρου διεγείρεται. Η ισχυρά αναγωγική χλωροφύλλη μεταφέρει το διεγερμένο ηλεκτρόνιο στην πρωτεΐνη φερρεδοξίνη μέσω ενδιάμεσων φορέων που αποτελούν μέρος του PSI. Το ηλεκτρόνιο που αποσπάται από το μόριο της χλωροφύλλης a του κέντρου αντίδρασης του PSI αναπληρώνεται από το ηλεκτρόνιο που φέρει η ανηγμένη πλαστοκυανίνη.

Η φερρεδοξίνη είναι μια υδατοδιαλυτή σιδηροθειο πρωτεΐνη που περιέχει θειούχο σίδηρο. Στην ανηγμένη μορφή της κινείται ελεύθερα στο στρώμα και μεταφέρει το ηλεκτρόνιό της στο NADP^+ το οποίο μετατρέπεται σε NADPH με την απόσπαση και ενός πρωτονίου από το στρώμα. Την αντίδραση καταλύει η ρεδουκτάση φερρεδοξίνης - NADP (FNR) που εντοπίζεται στα θυλακοειδή από τη μεριά του στρώματος (Καράταγλης, 1999; Purve et al, 2003; Stern et al, 2008; Alberts et al, 2008; Wayne, 2009; Taiz and Zeiger, 2010).



Όπως προαναφέρθηκε, όταν ανάγεται το σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων cyt_{b_6-f} , δύο πρωτόνια από το στρώμα μεταφέρονται στο lumen για κάθε ηλεκτρόνιο που κινείται στην φωτοχημική αλυσίδα. Επίσης από την φωτόλυση του νερού απελευθερώνονται δύο πρωτόνια στο lumen από κάθε μόριο νερού που οξειδώνεται. Λαμβάνοντας επίσης υπόψη

ότι κατά την αναγωγή του NADP^+ αφαιρούνται πρωτόνια από το στρώμα, γίνεται κατανοητό πως δημιουργείται μια μεγάλη διαφορά στη συγκέντρωση των πρωτονίων ανάμεσα στο στρώμα και το lumen (Purve et al, 2003; Αϊβαλάκης και άλλοι, 2005; Stern et al, 2008; Alberts et al, 2008; Wayne, 2009; Taiz and Zeiger, 2010). Μάλιστα σε συνθήκες έντονου φωτισμού η διαφορά στη συγκέντρωση εντείνεται, με αποτέλεσμα να δημιουργείται διαφορά ακόμα και τεσσάρων μονάδων pH. Η διαφορά αυτή του pH σημαίνει και μια μεγάλη διαφορά ηλεκτροχημικού δυναμικού ανάμεσα στις δύο πλευρές του θυλακοειδούς (Purve et al, 2003). Τα πρωτόνια του lumen έχουν την τάση να επιστρέψουν αυθόρμητα στο στρώμα ώστε να εξισορροπηθεί η διαφορά δυναμικού. Δεδομένου ότι η διπλοστοιβάδα του θυλακοειδούς είναι αδιαπέραστη από τα πρωτόνια, τη μόνη διέξοδο αποτελεί το κανάλι της συνθετάσης του ATP. Τα πρωτόνια διέρχονται αυθόρμητα από τον πόρο που σχηματίζει το σύμπλοκο της ATPάσης και η ενέργεια που απελευθερώνεται από την μετακίνηση αυτή χρησιμοποιείται για την φωσφορυλίωση του ADP σε ATP με την προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας. Επειδή η διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού που διαμορφώνεται ανάμεσα στο lumen και το στρώμα προϋποθέτει την ύπαρξη φωτεινής ακτινοβολίας, η φωσφορυλίωση αυτή ονομάζεται φωτοφωσφορυλίωση και η διαδικασία χημειοσμωτικός μηχανισμός (Purve et al, 2003; Μανέτας, 2005; Stern et al, 2008; Alberts et al, 2008; Wayne, 2009; Taiz and Zeiger, 2010). Επειδή κατά τη διάρκεια της φωτοχημικής ροής η ενεργειακή κατάσταση των ηλεκτρονίων αυξομειώνεται, η μετακίνησή τους στη φωτοχημική αλυσίδα σε σχέση με το ενεργειακό τους περιεχόμενο σχηματίζει το σχήμα Z (Taiz and Zeiger, 2010).

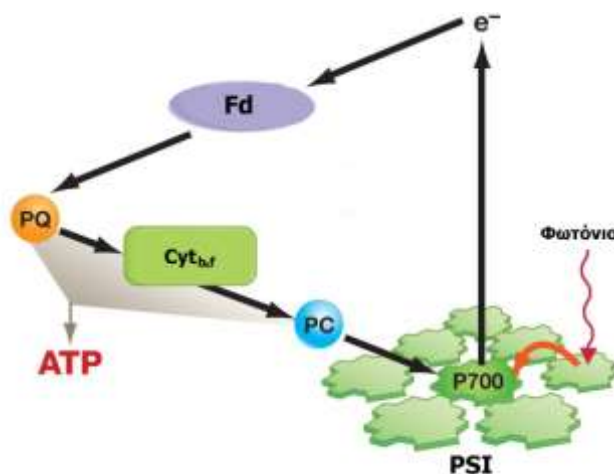


Εικόνα 1.3 Οι αντιδράσεις της μη-κυκλικής φωτοχημικής ροής των ηλεκτρονίων.

Πηγή: Taiz, L. and Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*. 5th edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company

1.1.2.4.2. Κυκλική Φωτοχημική ροή

Η σειρά αντιδράσεων που προαναφέρθηκε αποτελεί τη μη κυκλική φωτοχημική ροή ηλεκτρονίων. Ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις η φωτοχημική ροή ακολουθεί κυκλική πορεία: Η ανηγμένη φερρεδοξίνη δεν προσφέρει το ηλεκτρόνιο της στο NADP^+ αλλά στην πλαστοκινόνη. Στη συνέχεια ακολουθείται η ίδια πορεία με την μη κυκλική ροή ($\text{PQ} \rightarrow \text{cyt}_{b_6-f} \rightarrow \text{PC} \rightarrow \text{P}_{700}$) και το ηλεκτρόνιο καταλήγει ξανά στο κέντρο της αντίδρασης του PSI. Σε αυτή την περίπτωση δεν πραγματοποιείται η αναγωγή του NADP^+ σε NADPH και η φωτόλυση του νερού, αφού παρακάμπτεται το PSII. Συνεπώς, το μόνο προϊόν που παράγεται από την απορρόφηση της ενέργειας της φωτεινής ακτινοβολίας είναι το ATP (Purve et al, 2003; Stern et al, 2008; Alberts et al, 2008; Wayne, 2009; Taiz and Zeiger, 2010). Έντονη κυκλική φωτοχημική ροή των ηλεκτρονίων συμβαίνει στους χλωροπλάστες των κυττάρων του κολεού της δέσμης στα C_4 φυτά (Polya and Osmond, 1972; Taiz and Zeiger, 2010).



Εικόνα 1.4 Η κυκλική φωτοχημική ροή των ηλεκτρονίων.
Πηγή: 2011, Pearson Education, Inc. (με προσαρμογή).
<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectures/ps01.htm>

1.1.3. Σκοτεινή Φάση

Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής πραγματοποιείται η αφομοίωση του ατμοσφαιρικού CO_2 και η αναγωγή του μέχρι το επίπεδο του υδατάνθρακα. Η αναγωγή αυτή απαιτεί την συνεχή παροχή ενέργειας η οποία προέρχεται από το ATP και το NADPH που έχουν παραχθεί από τις φωτεινές αντιδράσεις. Οι αντιδράσεις της σκοτεινής φάσης δεν απαιτούν άμεσα την παρουσία φωτός, ωστόσο εξαρτώνται από την απρόσκοπτη τροφοδοσία σε ATP και NADPH , η οποία προϋποθέτει τη συνεχή πραγματοποίηση των φωτεινών αντιδράσεων (Purve et al, 2003; Αϊβαλάκις και άλλοι, 2005; Stern et al, 2008; Alberts et al, 2008; Taiz and Zeiger, 2010). Εκτός από την παροχή της αναγκαίας ενέργειας, το φως επηρεάζει άμεσα τις σκοτεινές αντιδράσεις ρυθμίζοντας την σύνθεση και τη λειτουργία των ενζύμων και των υποστρωμάτων που

συμμετέχουν σε αυτές (Stern et al, 2008; Alberts et al, 2008; Taiz and Zeiger, 2010). Η αφομοίωση του CO₂ λαμβάνει μέρος στο στρώμα όπου εντοπίζονται όλα τα υδατοδιαλυτά ένζυμα που καταλύουν τις επιμέρους αντιδράσεις.

Η διαδικασία αφομοίωσης του CO₂ στα ανώτερα φυτά ακολουθεί τρεις παραλλαγές: Τη C₃ φωτοσύνθεση, τη C₄ φωτοσύνθεση και τη φωτοσύνθεση CAM.

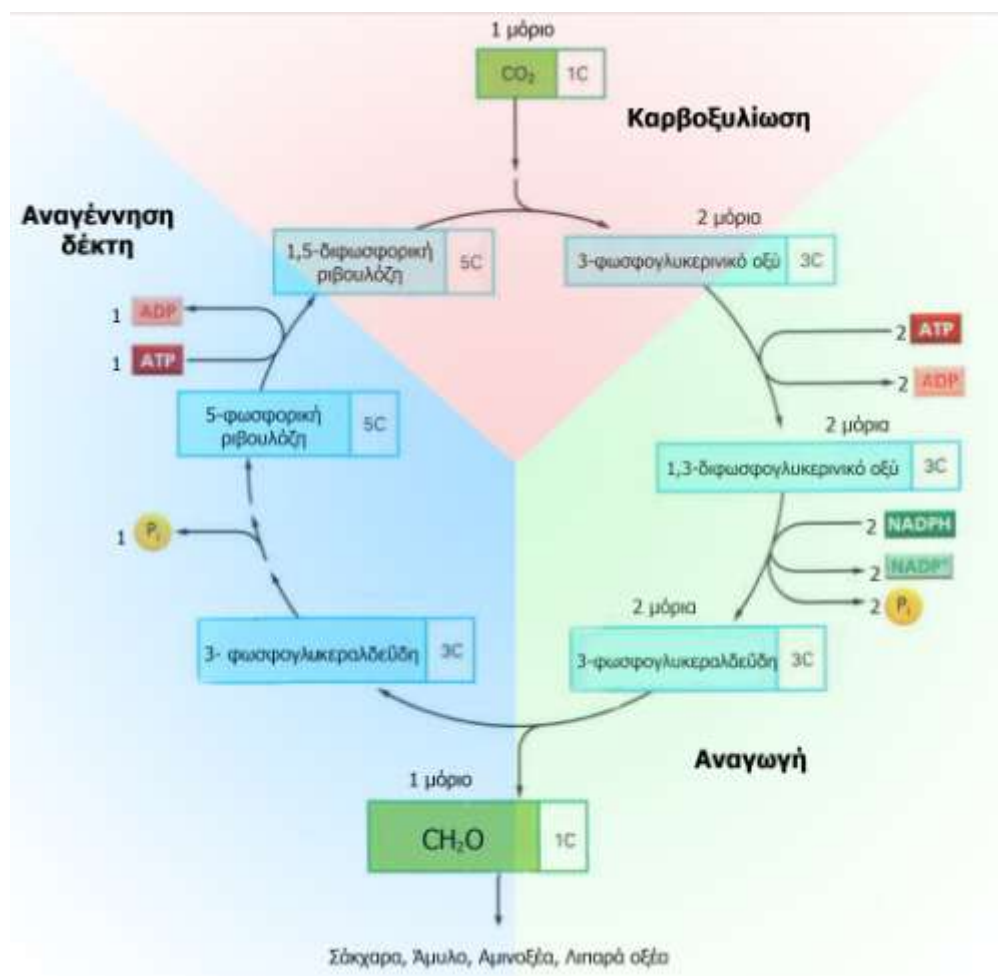
1.1.3.1. C₃ Φωτοσύνθεση

Στη C₃ φωτοσύνθεση το CO₂ αφομοιώνεται και ανάγεται σε υδατάνθρακα μέσω του αναγωγικού κύκλου των φωσφοπεντοζών (Μανέτας, 2005). Ο κύκλος αυτός ονομάζεται επίσης κύκλος Calvin-Benson προς τιμήν των Melvin Calvin και Andrew Benson που τον ανακάλυψαν την δεκαετία του 50 με τη χρήση ραδιενεργά σημασμένου CO₂. Ο χαρακτηρισμός C₃ οφείλεται στο γεγονός ότι το πρώτο προϊόν του τύπου αυτού αφομοίωσης του CO₂ είναι το 3-φωσφογλυκερινικό οξύ, μόριο με 3 άτομα άνθρακα (Purve et al, 2003; Αϊβαλάκις και άλλοι, 2005; Stern et al, 2008).

Ο κύκλος Calvin-Benson περιλαμβάνει τρεις φάσεις: την καρβοξυλίωση της φωσφοπεντόζης 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη, την αναγωγή του αφομοιωθέντος CO₂ σε 3-φωσφογλυκεραλδεΐδη και την αναγέννηση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης.

Κατά την πρώτη φάση ένα μόριο CO₂ ενσωματώνεται με τη μορφή καρβοξυλομάδας σε ένα μόριο 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης, αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο καρβοξυλάση-οξυγενάση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης (RubisCO). Κατ'αυτόν τον τρόπο σχηματίζεται ένα μόριο μιας ενδιάμεσης ασταθούς ένωσης έξι ατόμων άνθρακα η οποία υδρολύεται αμέσως προς δύο μόρια 3-φωσφογλυκερινικού οξέως (3PG). Αυτά στη συνέχεια με κατανάλωση 2 μορίων ATP, φωσφορυλιώνονται σε 2 μόρια 1,3-διφωσφογλυκερινικού οξέως τα οποία εν συνεχεία ανάγονται από 2 μόρια NADPH προς 2 μόρια 3-φωσφογλυκεραλδεΐδης. Στο σημείο αυτό έχει ολοκληρωθεί η αφομοίωση του CO₂ της ατμόσφαιρας στο επίπεδο του υδατάνθρακα, αφού το καθαρό κέρδος είναι μια υδατανθρακική μονάδα (CH₂O). Συνεπώς, για κάθε έξι περιστροφές του κύκλου παράγεται ως καθαρό προϊόν ένα μόριο εξόζης. Ο κύκλος κλείνει με την αναγέννηση του αρχικού υποστρώματος – δέκτη του CO₂ δηλαδή της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης. Στη φάση αυτή απαιτείται η ενέργεια ενός μορίου ATP που παράγεται κατά την φωτεινή φάση της φωτοσύνθεσης. Συνεπώς το αρχικό υπόστρωμα αναγεννάται και μπορεί πλέον να συνεχιστεί η αφομοίωση νέων μορίων CO₂ (Purve et al, 2003; Μανέτας, 2005; Stern et al, 2008; Alberts et al, 2008; Taiz and Zeiger, 2010).

Ο κύκλος Calvin-Benson χαρακτηρίζεται ως αυτοκαταλυτικός, αφού μπορεί και ρυθμίζει την ποσότητα των υποστρωμάτων καθώς και την ενεργότητα των ενζύμων που συμμετέχουν σε αυτόν ανάλογα με τις ανάγκες που διαμορφώνονται κάθε στιγμή. Εκτός αυτού η λειτουργία του κύκλου ρυθμίζεται από την ύπαρξη φωτισμού (δηλαδή την παροχή ενέργειας) μέσω της ενεργοποίησης ενζύμων-κλειδιών. Η ρύθμιση αυτή επιτελείται μέσω ενός συστήματος φερρεδοξίνης-θειορεδοξίνης το οποίο ενεργοποιεί τα ένζυμα μετατρέποντάς τα στην ανηγμένη τους μορφή. Η ενεργότητα της RubisCO επίσης επηρεάζεται από την παρουσία φωτός μέσω της δημιουργίας καρβαμικών παραγόντων του ενζύμου με την ύπαρξη ενεργοποιητών-μορίων CO_2 . Η μεταφορά πρωτονίων από το στρώμα στο lumen προκαλεί επίσης την ταυτόχρονη αύξηση των ιόντων Mg^{2+} στο στρώμα. Η παρουσία των ιόντων Mg^{2+} επηρεάζει θετικά την ενεργότητα ορισμένων ενζύμων του κύκλου Calvin-Benson, ενώ η αύξηση του PH που προκύπτει στο στρώμα συμβάλλει στο ίδιο αποτέλεσμα. (Taiz and Zeiger, 2010).



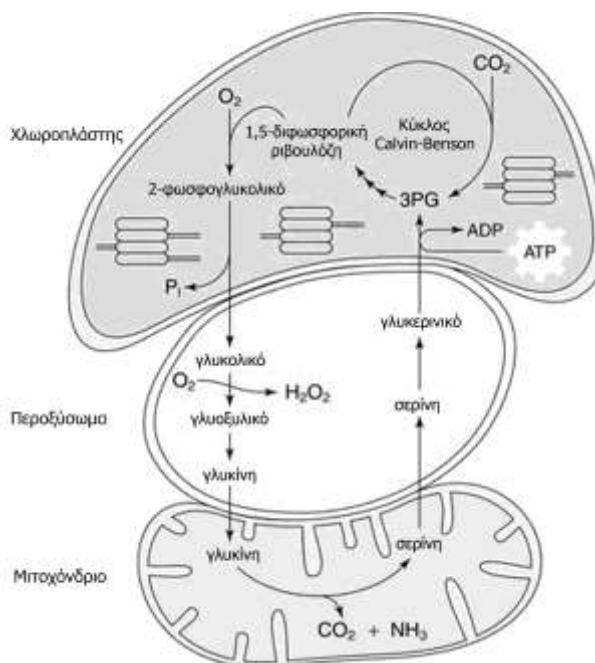
Εικόνα 1.5 Η πορεία των βιοχημικών αντιδράσεων του κύκλου Calvin-Benson.

Πηγή: Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2007. *Molecular Biology of the Cell*, 5th edition. Garland Science. New York. (προσαρμοσμένο)

1.1.3.2. Φωτοαναπνοή

Λόγω της αδυναμίας του ενεργού κέντρου της RubisCO να διακρίνει τις διαφορές ανάμεσα στο CO_2 και το O_2 , το ένζυμο αυτό παρουσιάζει και δράση οξυγενάσης (Καράταγλης, 1999). Η διπλή αυτή καταλυτική δράση χαρακτηρίζει όλες τις RubisCO, ανεξάρτητα από την ταξινομική τους προέλευση (Taiz and Zeiger, 2010).

Όταν η RubisCO δρά ως οξυγενάση προκαλεί την οξειδωση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόξης και τη διάσπαση της σε ένα μόριο 3-φωσφογλυκερικού οξέως και ένα μόριο 2-φωσφογλυκολικού οξέος, μόριο με 2 άτομα άνθρακα. Το 3PG μεταβολίζεται στον κύκλο Calvin-Benson ενώ το 2-φωσφογλυκολικό υδρολύεται προς γλυκολικό στον χλωροπλάστη από το ένζυμο φωσφατάση του φωσφογλυκολικού οξέως. Το γλυκολικό μεταφέρεται από τον χλωροπλάστη στα υπεροξυσώματα μέσω μιας πρωτεΐνης μεταφορέα που εδράζεται στον φάκελο. Εκεί οξειδώνεται προς γλυοξυλικό οξύ και υπεροξειδίο. Το υπεροξειδίο εξουδετερώνεται άμεσα από τη δράση της καταλάσης ενώ το γλυοξυλικό υπόκειται τρανσαμίνωση, με πιθανό δότη της αμινομάδας το γλουταμινικό, και μετατρέπεται σε γλυκίνη. Η γλυκίνη μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια όπου το πολυενζυμικό σύμπλοκο αποκαρβοξυλάση της γλυκίνης καταλύει τη μετατροπή 2 μορίων γλυκίνης και ενός NAD^+ σε ένα μόριο σερίνης, ένα μόριο NADH , μια ομάδα NH_4^+ και ένα μόριο CO_2 . Το ιόν αμμωνίου μεταφέρεται στους χλωροπλάστες όπου και χρησιμοποιείται για την παραγωγή αμινοξέων. Η σερίνη μεταφέρεται εκ νέου στα υπεροξυσώματα και τρανσαμινώνεται σε υδροξυπυροσταφυλικό οξύ το οποίο ανάγεται σε γλυκερικό οξύ με την κατανάλωση NADPH που μεταφέρεται εκεί από τους χλωροπλάστες. Τέλος, το γλυκερικό οξύ μεταφέρεται στους χλωροπλάστες όπου και φωσφορυλιώνεται σε 3-



Εικόνα 1.6 Η πορεία των βιοχημικών αντιδράσεων της φωτοαναπνοής.

Πηγή: <http://www.cliffsnotes.com/sciences/biology/biochemistry-ii/photosynthesis/photorespiration>

φωσφογλυκερινικό και εισέρχεται στον κύκλο Calvin-Benson (Taiz and Zeiger, 2010). Συνεπώς, από 2 μόρια 2-φωσφογλυκολικού οξέως παράγεται ένα μόριο 3GP ενώ ένα άτομο άνθρακα χάνεται υπό μορφή CO_2 . Αυτό σημαίνει πως μόνο το 75% του άνθρακα που εισέρχεται στον κύκλο της φωτοαναπνοής επιστρέφει σε μορφή που μπορεί να μεταβολιστεί στον κύκλο Calvin-Benson (Αϊβαλάκις και άλλοι, 2005; Taiz and Zeiger, 2010).

Επειδή η διαδικασία αυτή ομοιάζει με την αναπνοή, εφόσον αφομοιώνεται O_2 και παράγεται CO_2 , και επειδή προϋποθέτει την ύπαρξη φωτός, τόσο για τη λειτουργικότητα της RubisCo όσο και για τη παραγωγή των ATP, NADPH και των υποστρωμάτων, ονομάζεται φωτοαναπνοή (Μανέτας, 2005; Taiz and Zeiger, 2010; Purve et al, 2003; Stern et al, 2008; Alberts et al, 2008). Επίσης, λόγω του ότι ξεκινά με ένα μόριο που περιέχει δύο μόρια άνθρακα, το 2-φωσφογλυκολικό, ονομάζεται και C2 οξειδωτικός φωτοσυνθετικός κύκλος του άνθρακα (Taiz and Zeiger, 2010).

Η φωτοαναπνοή πραγματοποιείται ταυτόχρονα με τη φωτοσύνθεση σε όλα τα φυτά με C3 φωτοσύνθεση. Συνήθως η εκτροπή του άνθρακα προς τις μεταβολικές διαδικασίες του κύκλου C2 φτάνει το 30% του συνολικού άνθρακα που απορροφάται από την ατμόσφαιρα. Ωστόσο, το ποσοστό αυτό μεταβάλλεται ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν. Οι σημαντικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν το ποσοστό αυτό είναι η αναλογία μερικών πιέσεων CO_2/O_2 και η θερμοκρασία.

Η RubisCO διαθέτει 10 φορές υψηλότερη συγγένεια δέσμευσης με το CO_2 παρά με το O_2 . Όταν όμως η συγκέντρωση του CO_2 στην ατμόσφαιρα μειωθεί σημαντικά το ένζυμο τείνει να δεσμεύσει O_2 οδηγώντας την ισορροπία προς τη πλευρά της φωτοαναπνοής (Purve et al, 2003; Stern et al, 2008). Η συγκέντρωση του CO_2 στο μικροπεριβάλλον των χλωροπλαστών εξαρτάται από το άνοιγμα των στοματίων. Όταν τα στομάτια παραμένουν κλειστά στο περιβάλλον των φωτοσυνθετικών κυττάρων η συγκέντρωση του CO_2 μειώνεται δραστικά ενώ ταυτόχρονα του O_2 αυξάνεται (Purve et al, 2003; Μανέτας, 2005; Taiz and Zeiger, 2010;).

Η θερμοκρασία επηρεάζει το ρυθμό της φωτοαναπνοής έμμεσα με τρεις τρόπους:

α) Η αύξηση της μπορεί να προκαλέσει το κλείσιμο των στοματίων, δημιουργώντας έτσι τις συνθήκες που περιγράφηκαν ανωτέρω.

β) Η συγκέντρωση του διαλυμένου CO_2 σε υδατικά διαλύματα μειώνεται περισσότερο απ' ότι του O_2 με την αύξηση της θερμοκρασίας, οπότε στο υδατικό

περιβάλλον των κυττάρων είναι ευκολότερη η επικράτηση του O_2 έναντι του CO_2 και έτσι η αύξηση του ρυθμού της φωτοαναπνοής.

γ) Η RubisCO παρουσιάζει υψηλότερη συγγένεια δέσμευσης με το O_2 αυξανόμενης της θερμοκρασίας (Καράταγλης, 1999; Purve et al, 2003; Stern et al, 2008; Taiz and Zeiger, 2010).

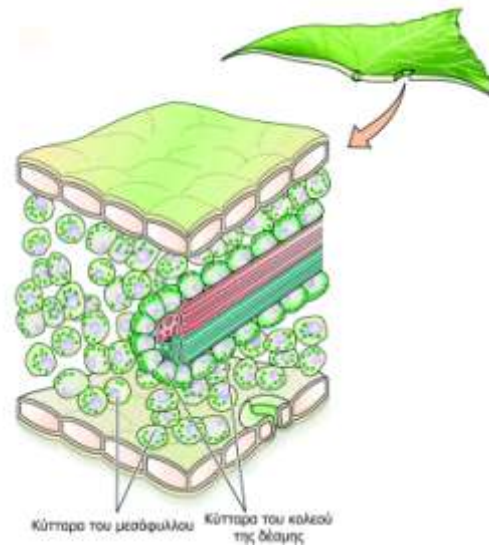
Η φωτοαναπνοή φαινομενικά αποτελεί μια διαδικασία σπατάλης ενέργειας και απωλειών CO_2 . Ωστόσο, συμβάλλει στην προστασία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού έναντι της φωτοαναστολής και της φωτοξείδωσης, καταναλώνοντας την περίσσεια του ATP που συσσωρεύεται στους χλωροπλάστες όταν επικρατούν δυσμενείς συνθήκες για την πραγματοποίηση της φωτοσύνθεσης. (π.χ. όταν τα φυτά έχουν κλείσει τα στοματίά τους σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και χαμηλής υγρασίας, ενώ ταυτόχρονα δέχονται ακτινοβολία υψηλής έντασης) (Taiz and Zeiger, 2010).

1.1.3.3. C4 Φωτοσύνθεση

Ορισμένα φυτικά είδη κατά τη διάρκεια της εξέλιξης ανέπτυξαν πρόσθετους μηχανισμούς που λειτουργούν υποστηρικτικά προς τον κύκλο του Calvin-Benson ώστε να περιορίσουν τις απώλειες του άνθρακα που προκαλεί η φωτοαναπνοή. Ένας από τους μηχανισμούς αυτούς είναι το C4 μονοπάτι μεταβολισμού του άνθρακα και τα φυτά που τον διαθέτουν ονομάζονται C4 φυτά. Πρόκειται για μονοκότυλα ή δικότυλα είδη που αναπτύσσονται σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές. Στη λειτουργική αυτή ομάδα φυτών, εντάσσονται αποδοτικά καλλιεργούμενα φυτά όπως το σόργο, το σακχαροκάλαμο και το καλαμπόκι καθώς και δυσεξόντωτα ζιζάνια όπως αγριάδα, η κύπερη το βλήτο κ.α. Πιθανολογείται πως τα πρώτα μονοκότυλα C4 είδη εμφανίστηκαν στην Ολιγόκενο περίοδο, πριν 30 εκατομμύρια χρόνια, ενώ τα πρώτα δικότυλα πριν 20 εκατομμύρια χρόνια (Ehleringer et al, 1997; Μανέτας, 2005; Gowik and Westhoff, 2011).

Τα φυτά που διαθέτουν την C4 φωτοσυνθετική οδό χαρακτηρίζονται από μια ιδιαίτερη ανατομία σε σχέση με τα C3 φυτά. Η μεγαλύτερη διαφορά έγκειται στα κύτταρα του κολεού της δέσμης. Στα C3 φυτά τα κύτταρα αυτά διαθέτουν περιορισμένο αριθμό οργανιδίων, ενώ οι χλωροπλάστες απουσιάζουν ή είναι μικρού μεγέθους. Ως εκ τούτου, τα κύτταρα αυτά δεν έχουν σημαντική συμβολή στην φωτοσύνθεση των φύλλων. Επίσης, τα κύτταρα του μεσοφύλλου, τα οποία φέρουν φυσιολογικούς χλωροπλάστες, διατάσσονται τυχαία ως προς τα κύτταρα του κολεού της δέσμης. Στα C4 φυτά τα

κύτταρα του κολεού της δέσμης είναι μεγαλύτερα και με παχύτερα κυτταρικά τοιχώματα ενώ διαθέτουν και μεγάλους χλωροπλάστες οι οποίοι περιέχουν αμυλόκοκκους αλλά στερούνται grana. Εντοπίζονται μόνο θυλακοειδή του στρώματος, ενώ σε σπάνιες περιπτώσεις, τα grana, εάν υπάρχουν, είναι υποτυπώδη. Τα κύτταρα του μεσοφύλλου είναι διατεταγμένα σε ομόκεντρους κύκλους γύρω από τα κύτταρα του κολεού της δέσμης και είναι χαλαρά συνδεδεμένα μεταξύ τους. Έχουν μικρότερους χλωροπλάστες από αυτούς των κυττάρων του κολεού της δέσμης, οι οποίοι



Εικόνα 1.7 Η ανατομία τύπου Kranz σε τυπικό C4 φυτό.

Πηγή: Taiz, L. and Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*. 5th edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company

στερούνται αμυλόκοκκων αλλά διαθέτουν πλήρως ανεπτυγμένα grana. Τα κύτταρα του μεσοφύλλου συνδέονται με τα κύτταρα του κολεού με ένα μεγάλο αριθμό πλασμοδεσμών (Αϊβαλάκις και άλλοι, 2005; Stern et al, 2008; Beck, 2010; Taiz and Zeiger, 2010). Τέλος, στα C4 φυτά η πυκνότητα των ηθμαγγειωδών δεσμίδων στα φύλλα είναι μεγάλη και αυτό έχει ως αποτέλεσμα κάθε κύτταρο του μεσοφύλλου να μην απέχει περισσότερο από δύο με τρία κύτταρα από τον πλησιέστερο κολεό της δέσμης (Taiz and Zeiger, 2010; Gowik and Westhoff, 2011). Λόγω της ιδιόμορφης διάταξης των κυττάρων σε ομόκεντρους κύκλους, η ανατομία ονομάστηκε τύπου Kranz (στεφάνη) από τον Γερμανό ανατόμο Haberlandt (Beck, 2010).

Η ιδιότυπη αυτή ανατομία των C4 φυτών συμβάλλει σημαντικά στο συγκεκριμένο βιοχημικό μονοπάτι του μεταβολισμού του άνθρακα γιατί παρατηρείται καταμερισμός των διεργασιών ανάμεσα στα κύτταρα του μεσοφύλλου και τα κύτταρα του κολεού της δέσμης. Ειδικότερα, η αφομοίωση του ατμοσφαιρικού CO₂ διεξάγεται στα κύτταρα του μεσοφύλλου και στη συνέχεια μεταφέρεται, με τη μορφή καρβοξυλομάδας, στα κύτταρα του κολλεού της δέσμης όπου και εισάγεται στον κύκλο Calvin-Benson.

Αναλυτικότερα, το C4 μεταβολικό μονοπάτι, το οποίο ονομάζεται και μονοπάτι Hatch-Slack προς τιμή των ερευνητών που την ανακάλυψαν, επιτελείται σε 4 στάδια:

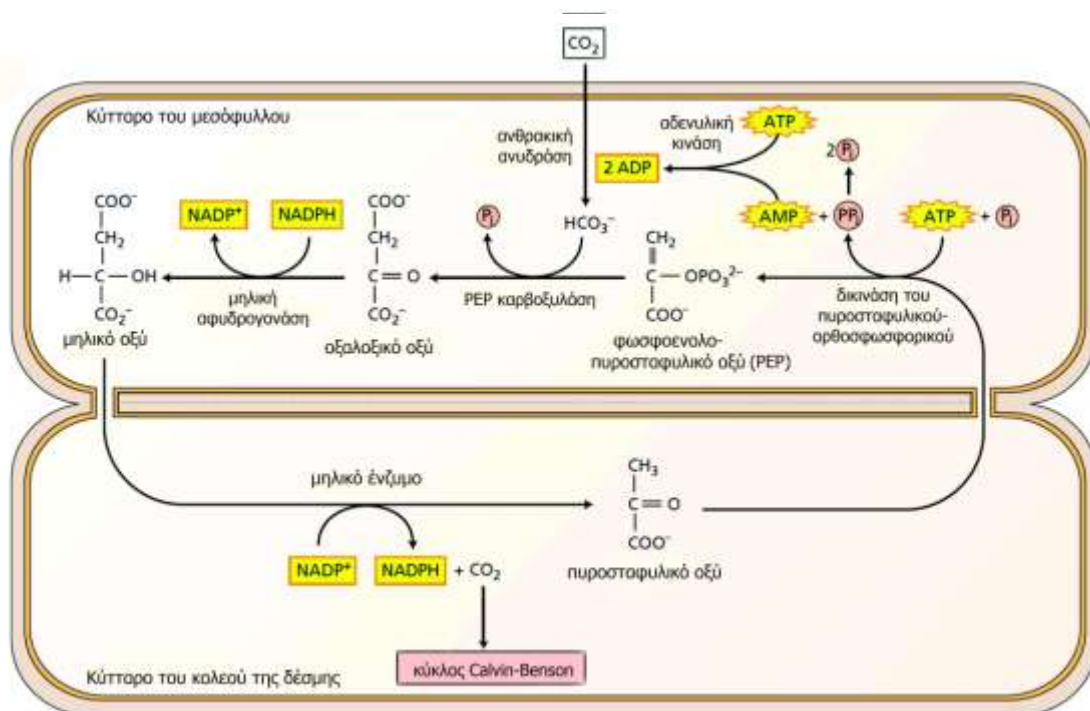
Καρβοξυλίωση: Το CO₂ της ατμόσφαιρας εισάγεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του μεσοφύλλου και με την δράση της αφυδατάσης των ανθρακικών μετατρέπεται σε δισανθρακικά ανιόντα. Υπό αυτή τη μορφή ενσωματώνεται στο φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ (PEP), ένα μόριο τριών ατόμων άνθρακα, και σχηματίζεται ένα μόριο οξαλοξικού οξέως με 4 άτομα άνθρακα (εξ' ου και η ονομασία της μεταβολικής οδού). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο καρβοξυλάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCase), η οποία αφενός παρουσιάζει υψηλή συγγένεια δέσμευσης με τα δισανθρακικά ανιόντα και αφετέρου, σε αντίθεση με την RubisCO, δεν εμφανίζει δράση οξυγενάσης. Το οξαλοξικό οξύ μετατρέπεται ταχέως στα πιο σταθερά C₄ οξέα μηλικό (στους χλωροπλάστες) και ασπαραγινικό (στο κυτταρόπλασμα) ανάλογα με το φυτικό είδος (Μανέτας, 2005; Stern et al, 2008; Taiz and Zeiger, 2010).

Μεταφορά των μεταβολιτών: Οι C₄ μεταβολίτες μεταφέρονται μέσω των πλασμοδεσμών στα κύτταρα του κολεού της δέσμης. Η μεταφορά αυτή οφείλεται τόσο σε διαβαθμίσεις διάχυσης, όσο και στην ύπαρξη πρωτεϊνών μεταφορέων που εδράζονται στις μεμβράνες (Αϊβαλάκις και άλλοι, 2005; Taiz and Zeiger, 2010; Gowik and Westhoff, 2011).

Αποκαρβοξυλίωση: Στα κύτταρα του κολεού της δέσμης οι C₄ μεταβολίτες αποκαρβοξυλιώνονται παράγοντας ένα μόριο CO₂ και ένα μόριο πυροσταφυλικού οξέως. Η αποκαρβοξυλίωση καταλύεται από διαφορετικά ένζυμα, και σε διαφορετικά οργανίδια, ανάλογα με το είδος του C₄ μεταβολίτη. Αν πρόκειται για το μηλικό οξύ, τότε καταλύεται από ένα NADP εξαρτώμενο μηλικό ένζυμο (NADP-ME) στους χλωροπλάστες και αν πρόκειται για το ασπαραγινικό, αυτό μετατρέπεται αρχικά σε μηλικό με απαμίνωση και αναγωγή, και στη συνέχεια αποκαρβοξυλιώνεται στα μιτοχόνδρια, με τη δράση ενός NAD εξαρτώμενου μηλικού ενζύμου (NAD-ME). Υπάρχει ωστόσο και η περίπτωση η αποκαρβοξυλίωση να καταλύεται τόσο από το NAD-ME όσο και από την καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK), επίσης στα μιτοχόνδρια (Gowik and Westhoff, 2011). Το παραγόμενο CO₂ εισάγεται στον κύκλο Calvin-Benson, ενώ το πυροσταφυλικό οξύ μεταφέρεται μέσω των πλασμοδεσμών πίσω στα κύτταρα του μεσοφύλλου (Μανέτας, 2005; Taiz and Zeiger, 2010; Gowik and Westhoff, 2011).

Αναγέννηση του δέκτη: Το πυροσταφυλικό οξύ που εισέρχεται στα κύτταρα του μεσοφύλλου με την δράση του ενζύμου δικινάση του πυροσταφυλικού-ορθοσφωφορικού οξέως και με την κατανάλωση δύο μορίων ATP, μετατρέπεται σε PEP. Ως εκ τούτου, ο δέκτης αναγεννάται και είναι έτοιμος για την αφομοίωση του επόμενου μορίου CO₂ (Αϊβαλάκις και άλλοι, 2005; Taiz and Zeiger, 2010; Gowik and Westhoff, 2011).

Από τα προαναφερθέντα συμπεραίνεται πως το C4 μονοπάτι αποτελεί ένα είδος αντλίας που τροφοδοτεί και εμπλουτίζει με CO₂ τους χλωροπλάστες των κυττάρων του κολεού της δέσμης, στους οποίους λειτουργεί η RubisCO. Ο μηχανισμός αυτός οδηγεί σε σημαντική μεγάλη αύξηση της αναλογίας των συγκεντρώσεων CO₂/O₂ με αποτέλεσμα τον πρακτικό μηδενισμό του ρυθμού της φωτοαναπνοής. Η απουσία grana και κατ' επέκταση PSII στους χλωροπλάστες των C4 φυτών, έχει ως συνέπεια να μην παράγεται εκεί O₂ λόγω της φωτόλυσης του νερού, γεγονός που επίσης συμβάλλει στην αύξηση της αναλογίας CO₂/O₂ και τον περιορισμό της φωτοαναπνοής.



Εικόνα 1.8 Η πορεία της αφομοίωσης του CO₂ διαμέσου του C4 φωτοσυνθετικού μονοπατιού σε NAD-ME φυτά.

Πηγή: Taiz, L. and Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*. 5th edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company

Μολονότι το C4 μονοπάτι δαπανά δύο επιπλέον μόρια ATP για κάθε μόριο CO₂ που αφομοιώνεται, τα φυτά στα οποία λειτουργεί έχουν την δυνατότητα να διατηρούν υψηλό ρυθμό φωτοσύνθεσης ακόμα και σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και ξηρασίας, σε αντίθεση με τα C3 φυτά, τα οποία στις ίδιες συνθήκες, παρουσιάζουν αυξημένη απώλεια άνθρακα και ενέργειας λόγω της φωτοαναπνοής. Ως επί το πλείστον, ακόμα και όταν τα C4 φυτά κλείνουν τα στοματίά τους για κάποιο χρονικό διάστημα, η φωτοσύνθεση συνεχίζει να πραγματοποιείται σε φυσιολογικό ρυθμό αφού το C4 μονοπάτι συνεχίζει να τροφοδοτεί τον κύκλο του Calvin με CO₂ έχοντας ως πηγή άνθρακα τα δισανθρακικά ανιόντα που βρίσκονται ήδη διαλυμένα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων

του μεσοφύλλου (Purve et al, 2003; Αϊβαλάκις και άλλοι, 2005; Stern et al, 2008; Alberts et al, 2008; Taiz and Zeiger, 2010; Gowik and Westhoff, 2011). Αξίζει να αναφερθεί πως λόγω της σπουδαιότητας του ρόλου του C4 μεταβολισμού του άνθρακα σε θερμά και ξηρά περιβάλλοντα, και της παγκόσμιας κλιματικής αλλαγής, γίνονται προσπάθειες να εισαχθεί, με βιοτεχνολογικές μεθόδους, ο C4 μηχανισμός σε καλλιεργούμενα C3 φυτά (Gowik and Westhoff, 2011).

1.1.3.4. CAM Φωτοσύνθεση

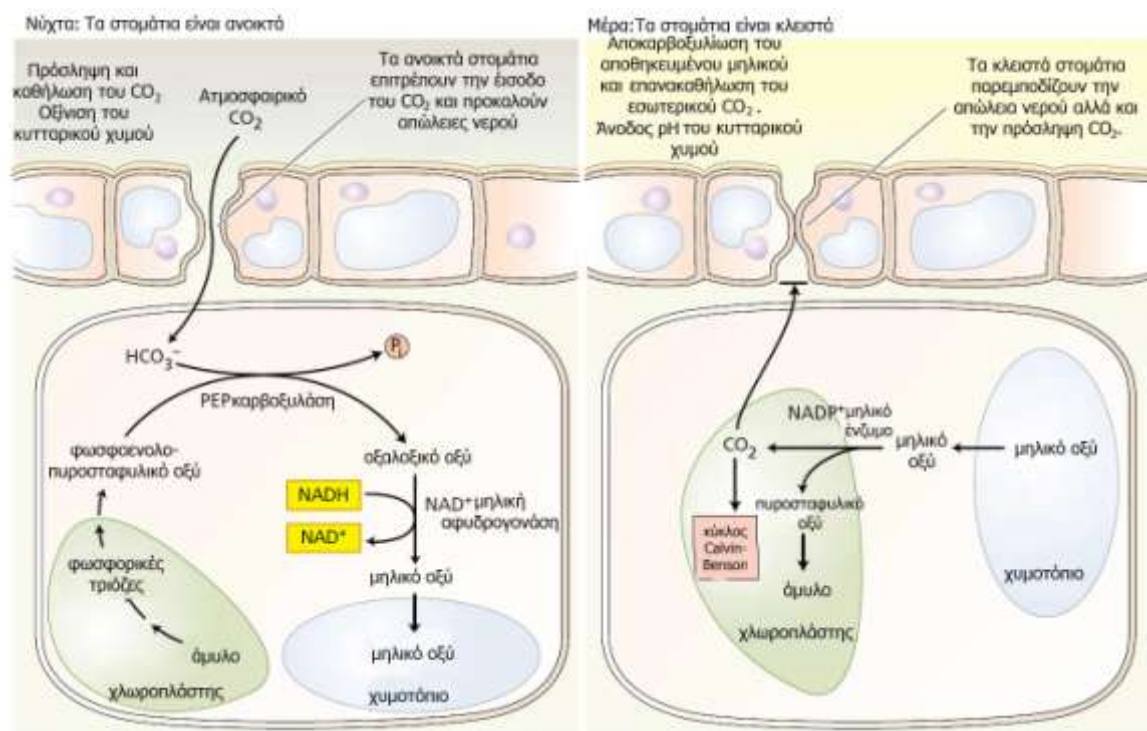
Σε πολύ ξηρά περιβάλλοντα, όπως για παράδειγμα στις ερήμους, τα φυτά δεν έχουν την πολυτέλεια να ανοίγουν τα στοματιά τους κατά τη διάρκεια της ημέρας γιατί αυτό θα οδηγούσε σε ανεξέλεγκτες απώλειες νερού και σε αναπόφευκτο θάνατο. Ένα φυτό με κλειστά στοματία όμως δεν έχει την δυνατότητα ανταλλαγής αερίων οπότε και τη δυνατότητα να φωτοσυνθέσει. Ωστόσο, μια ομάδα φυτών αντιμετώπισε αυτό το πρόβλημα στη διάρκεια της εξέλιξης αναπτύσσοντας ένα ειδικό μονοπάτι φωτοσυνθετικού μεταβολισμού του άνθρακα. Το μονοπάτι αυτό ονομάζεται μεταβολισμός οξέων τύπου Crassulaceae (Crassulaceae Acid Metabolism – CAM), από το όνομα της οικογένειας των φυτών που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά. Τα είδη που χρησιμοποιούν το μεταβολικό αυτό μονοπάτι περιλαμβάνουν κυρίως παχύφυτα, αλλά και ορισμένα καλλιεργούμενα φυτά όπως τον ανανά, τη βανίλια, τον αθάνατο, και ανθοκομικά φυτά όπως οι ορχιδέες (Μανέτας, 2005; Stern et al, 2008; Taiz and Zeiger, 2010).

Ο μηχανισμός της CAM φωτοσύνθεσης παρουσιάζει ομοιότητες με αυτόν της C4, αλλά και μια σημαντική διαφορά. Ενώ στα C4 φυτά η αφομοίωση του CO₂ και ο κύκλος των Calvin-Benson πραγματοποιούνται ταυτόχρονα αλλά σε διαφορετικά κύτταρα, στα CAM φυτά πραγματοποιούνται στο ίδιο κύτταρο αλλά σε διαφορετικές χρονικές στιγμές του ημερονύκτιου κύκλου. Τα φυτά με φωτοσύνθεση τύπου CAM παρουσιάζουν την ιδιομορφία να κλείνουν τα στοματιά τους κατά τη διάρκεια της ημέρας περιορίζοντας στο ελάχιστο τις απώλειες νερού και να τα ανοίγουν τη νύχτα για να γίνει η ανταλλαγή των αερίων.

Το CO₂ προσλαμβάνεται τη νύχτα από τα κύτταρα του μεσοφύλλου και μετατρέπεται σε δισανθρακικά ανιόντα όπως και στα C4 φυτά. Στη συνέχεια πραγματοποιείται καρβοξυλίωση του PEP με την δράση της PEPCase στο κυτταρόπλασμα και ακολουθώντας το ίδιο μεταβολικό μονοπάτι με τον C4 κύκλο, μετατρέπεται σε μηλικό οξύ το οποίο μεταφέρεται και αποθηκεύεται στο χυμοτόπιο. Το

PEP, το οποίο είναι απαραίτητο ώστε να γίνει η αφομοίωση του CO_2 , παράγεται στο κυτταρόπλασμα από τις φωφορικές τριόζες οι οποίες προέρχονται από τη γλυκόλυση του αμύλου που έχει αποθηκευτεί στους χλωροπλάστες κατά τη διάρκεια της ημέρας.

Κατά τη διάρκεια της ημέρας τα στομάτια κλείνουν και το μηλικό μεταφέρεται από το χυμοτόπιο στους χλωροπλάστες όπου με την δράση του NADP-ME αποκαρβοξυλιώνεται σε πυροσταφυλικό οξύ και CO_2 . Το CO_2 εισάγεται στον κύκλο του Calvin-Benson, ενώ το πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται αντίστροφα σε φωσφορικές τριόζες και στη συνέχεια σε άμυλο. (Καράταγλης, 1999; Purve et al, 2003; Stern et al, 2008; Taiz and Zeiger, 2010).



Εικόνα 1.9 Η πορεία των βιοχημικών αντιδράσεων του CAM φωτοσυνθετικού μονοπατιού.

Πηγή: Taiz, L. and Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*. 5th edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company

Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα να παρατηρούνται ημερονύκτιες διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις του μηλικού οξέως και του αμύλου. Το πρώτο αυξάνεται τη νύχτα, προκαλώντας τη πτώση του pH των χυμοτοπίων, και μειώνεται την ημέρα. Το δεύτερο ακολουθεί αντίστροφη πορεία (Μανέτας, 2005; Taiz and Zeiger, 2010). Η ημερονύκτια διακύμανση του μηλικού οξέως αποτελεί και το σήμα για την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση της PEPCase. Είναι αναγκαίο η PEPCase να ενεργοποιείται μόνο την νύχτα και να απενεργοποιείται την ημέρα, διαφορετικά θα

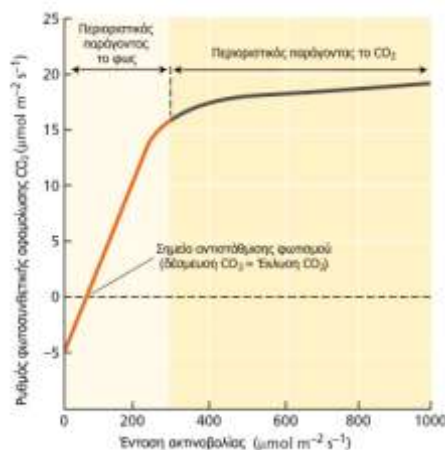
λειτουργούσε συνεχώς ένας φαύλος κύκλος καρβοξυλίωσης και αποκαρβοξυλίωσης κατά τη διάρκεια της ημέρας. Γι αυτό το λόγο στα φυτά CAM η PEPCase αδρανοποιείται την ημέρα μέσω μιας αποφωσφορυλίωσης μιας ομάδας σερίνης του ενζύμου, η οποία για να πραγματοποιηθεί προϋποθέτει την αύξηση της συγκέντρωσης του μηλικού οξέως (Taiz and Zeiger, 2010).

Το κλείσιμο των στοματίων κατά τη διάρκεια της μέρας, εκτός από την απώλεια του νερού, περιορίζει και την φωτοαναπνοή κατά τρόπο αντίστοιχο με αυτόν στα C4 φυτά (Taiz and Zeiger, 2010).

1.1.4. Οι παράγοντες του περιβάλλοντος που επηρεάζουν τη φωτοσύνθεση

1.1.4.1. Φωτεινή ακτινοβολία

Ο ρυθμός φωτοσύνθεσης επηρεάζεται τόσο από την ποιότητα όσο και από την ποσότητα της φωτεινής ακτινοβολίας. Η ποιότητα καθορίζεται από το μήκος κύματος των φωτονίων, παράγοντας ο οποίος μεταβάλλεται συνεχώς στη φύση. Η φασματική σύσταση του φωτός μεταβάλλεται δραματικά κατά την αυγή και το σούρουπο καθώς επίσης και κατά τη διάρκεια της ημέρας από τα καιρικά φαινόμενα (συννεφιά, ομίχλη, αιωρούμενα σωματίδια κλπ.). Επίσης, σε επίπεδο φυτού, τα φύλλα που βρίσκονται στο εσωτερικό της κόμης δέχονται διαφορετική ποιότητα φωτός (μη αποδοτική για τη φωτοσύνθεση) σε σχέση με αυτά της κορυφής και της περιφέρειας της κόμης τα οποία δέχονται το πλήρες φάσμα της φωτεινής ακτινοβολίας.



Εικόνα 1.10 Αντιπροσωπευτική καμπύλη εξάρτησης του φωτοσυνθετικού ρυθμού ενός C3 φυτού από την ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας.

Πηγή: Taiz, L. and Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*. 5th edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company

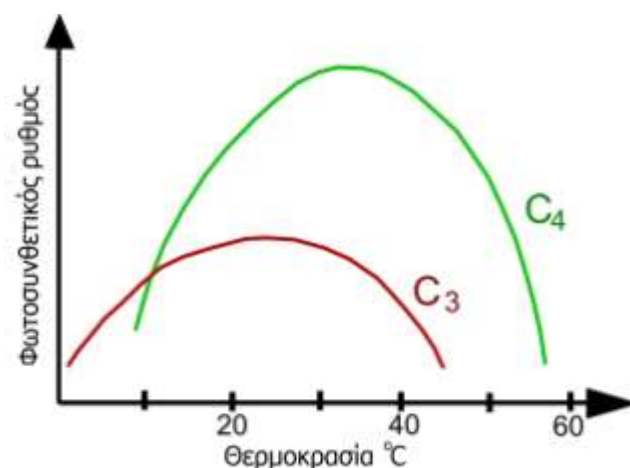
φωτοσύνθεσης. Αυξανόμενης της έντασης φωτεινής ακτινοβολίας, ο ρυθμός

Η ποσότητα της ακτινοβολίας, η οποία καθορίζεται από την ένταση (προσπίπτουσα ενέργεια ανά μονάδα επιφάνειας ανά μονάδα χρόνου) μεταβάλλεται όπως και η ποιότητα τόσο κατά τη διάρκεια της ημέρας όσο και λόγω άλλων παραγόντων όπως εποχή του έτους, συννεφιά, σκίαση φύλλων κλπ. Σε πολύ χαμηλή ένταση φωτισμού ο ρυθμός αναπνοής υπερτερεί έναντι αυτού της

φωτοσύνθεσης αυξάνεται και σε μια ορισμένη τιμή εξισώνεται με τον ρυθμό αναπνοής. Στην ένταση αυτή το κέρδος και οι απώλειες CO_2 εξισορροπούνται και γι αυτό αποκαλείται σημείο αντιστάθμισης φωτισμού. Σε εντάσεις φωτισμού υψηλότερες από το σημείο αντιστάθμισης φωτισμού η καμπύλη του φωτοσυνθετικού ρυθμού παρουσιάζεται με δύο μορφές. Στα αρχικά στάδια παρουσιάζεται γραμμική, αφού ο περιοριστικός παράγοντας για την φωτοσύνθεση είναι η ένταση του φωτισμού. Ωστόσο, σε υψηλότερες τιμές έντασης φωτισμού ο ρυθμός φωτοσύνθεσης τείνει να σταθεροποιηθεί. Στη φάση αυτή ο περιοριστικός παράγοντας αναδεικνύεται η συγκέντρωση του CO_2 και η δραστηριότητα της Rubisco ως οξυγενάσης. Στα C_4 φυτά, πρακτικά δεν εμφανίζεται αντίστοιχη σταθεροποίηση στον ρυθμό φωτοσύνθεσης (κορεσμός) σε υψηλές εντάσεις φωτισμού, και αυτό οφείλεται στην απουσία φωτοαναπνοής καθώς και στη μόνιμη ύπαρξη ικανοποιητικής συγκέντρωσης CO_2 στα κύτταρα του κολεού της δέσμης όπου και λειτουργεί η Rubisco (Hand et al, 1993; Fitter and Hay, 2001; Αϊβαλάκис και άλλοι, 2005; Taiz and Zeiger, 2010).

1.1.4.2. Θερμοκρασία

Η φωτοσύνθεση επηρεάζεται άμεσα από την θερμοκρασία διότι προϋποθέτει τη δραστηριότητα ενζύμων. Η γραφική παράσταση του φωτοσυνθετικού ρυθμού συναρτήσει της θερμοκρασίας παρουσιάζει κωδωνοειδή μορφή. Στα C_3 φυτά η βέλτιστη θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 15-35 °C ενώ σε υψηλότερες ή χαμηλότερες τιμές θερμοκρασίας ο φωτοσυνθετικός ρυθμός μειώνεται. Αυτό οφείλεται στο ότι σε υψηλότερες θερμοκρασίες ευνοείται περισσότερο η αναπνοή και η φωτοαναπνοή (επειδή μειώνεται η συνάφεια της Rubisco με το CO_2), με αποτέλεσμα το ισοζύγιο της ταχύτητας αφομοίωσης - έκλυσης CO_2 να οδηγείται προς τα δεξιά. Επίσης, στις υψηλές θερμοκρασίες δημιουργούνται προβλήματα στις μεμβράνες των χλωροπλαστών



Εικόνα 1.11 Αντιπροσωπευτικές καμπύλες εξάρτησης του φωτοσυνθετικού ρυθμού ενός C_3 και ενός C_4 φυτού από τη θερμοκρασία.

Πηγή: <http://pl.wikipedia.org/wiki/Fotosynthese>

μειώνοντας την απόδοση των φωτοσυνθετικών μηχανισμών. Σε συγκεκριμένη περιοχή θερμοκρασιών ο φωτοσυνθετικός και ο αναπνευστικός ρυθμός εξισώνονται οπότε και επέρχεται το σημείο αντιστάθμισης του CO₂ για τη θερμοκρασία.

Στα C4 φυτά οι τιμές της θερμοκρασίας στις οποίες επέρχεται ο μέγιστος ρυθμός φωτοσύνθεσης είναι υψηλότερες σε σχέση με αυτές των C3 φυτών, απουσίας της φωτοαναπνοής.

Στις χαμηλές θερμοκρασίες περιοριστικός παράγοντας για την φωτοσύνθεση αποτελεί η έλλειψη διαθεσιμότητας φωσφορικών στον χλωροπλάστη από το κυτταρόπλασμα. Πιο συγκεκριμένα, σε χαμηλή θερμοκρασία μειώνεται η παραγωγή σακχάρων και αμύλου στο κυτταρόπλασμα και κατά συνέπεια και η ανάγκη για φωσφορικές τριόζες από τον χλωροπλάστη. Η έξοδος των φωσφορικών τριοζών από τον χλωροπλάστη συνοδεύεται από ισομοριακή είσοδο ανόργανων φωσφορικών. Ωστόσο, στις συνθήκες αυτές η τροφοδοσία είναι δυσχερής, επομένως η φωτοσύνθεση περιορίζεται λόγω έλλειψης των ιόντων αυτών (Καράταγλης, 1999; Taiz and Zeiger, 2010). Εξάλλου, σε χαμηλές θερμοκρασίες περιορίζεται και η δραστηριότητα των φωτοσυνθετικών ενζύμων.

1.1.4.3. Η διαθεσιμότητα του νερού

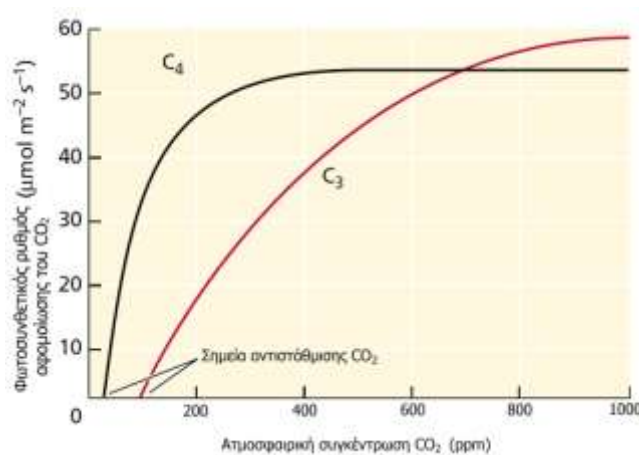
Η ανεπάρκεια νερού στο περιβάλλον και ειδικά στο εδαφικό, επηρεάζει άμεσα αλλά και έμμεσα τη φωτοσύνθεση. Η άμεση επίδραση οφείλεται στην εμφάνιση δυσλειτουργιών στη φωτοφωσφορυλίωση και στην φωτοσυνθετική ροή των ηλεκτρονίων λόγω προβλημάτων στην δομική ακεραιότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού καθώς και λόγω της αύξησης των ιόντων Mg²⁺ στους χλωροπλάστες. Η έμμεση επίδραση οφείλεται στην παρεμπόδιση της ανταλλαγής αερίων και ειδικότερα της εισόδου CO₂ στα φωτοσυνθετικά κύτταρα λόγω του κλεισίματος των στοματίων για τον περιορισμό των απωλειών νερού.

Στα C4 φυτά καθώς και στα CAM η έλλειψη νερού επηρεάζει λιγότερο την φωτοσυνθετική διαδικασία αφού λόγω των ιδιαίτερων ανατομικών και βιοχημικών προσαρμογών τους περιορίζονται οι απώλειες νερού χωρίς την παράλληλη μείωση του διαθέσιμου για φωτοσύνθεση CO₂ (Μανέτας, 2005)

1.1.4.4. Το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂)

Το CO₂ αποτελεί, όπως προαναφέρθηκε, το υπόστρωμα των βιοχημικών αντιδράσεων της σκοτεινής φάσης της φωτοσύνθεσης και γι αυτό η συγκέντρωσή του στο περιβάλλον του φυτού επιδρά σημαντικά στον φωτοσυνθετικό ρυθμό. Ο παγκόσμιος μέσος όρος της συγκέντρωσης του στην ατμόσφαιρα ανέρχεται στα 398ppm ενώ κάθε έτος σημειώνεται αύξησή κατά 2-3ppm. Σε συνθήκες επαρκούς φωτισμού (στο σημείο κορεσμού), η τιμή αυτή της συγκέντρωσης του CO₂ αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα του φωτοσυνθετικού ρυθμού στα C3 φυτά. Αυξανόμενη όμως της συγκέντρωσης του ο ρυθμός της φωτοσύνθεσης αυξάνεται μέχρι κάποιου ορίου. Πέρα από αυτό υπάρχει αδυναμία αναγέννησης της διφωσφορικής ριβουλόζης λόγω περιορισμού των προϊόντων των φωτεινών αντιδράσεων (ο φωτοσυνθετικός ρυθμός πλέον περιορίζεται από την ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας). Σε συγκεντρώσεις CO₂ χαμηλότερες της ατμοσφαιρικής η φωτοσύνθεση στα C3 φυτά περιορίζεται λόγω της περιορισμένης καρβοξυλιωτικής δράσης της Rubisco (εντονότερη δράση οξυγενάσης). Στις πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις CO₂ ο φωτοσυνθετικός ρυθμός εξισώνεται με τον ρυθμό της αναπνοής και της φωτοαναπνοής οπότε το ισοζύγιο στις ανταλλαγές αερίων μηδενίζεται. Η συγκέντρωση του CO₂ στην οποία επιτυγχάνεται η ισορροπία αυτή ονομάζεται σημείο αντιστάθμισης για το CO₂ και για τα C3 φυτά κυμαίνεται από 25 ως και 100 ppm.

Στα C4 φυτά οι αυξομειώσεις της ατμοσφαιρικής συγκέντρωσης του CO₂ δεν επηρεάζουν ιδιαίτερα τον φωτοσυνθετικό ρυθμό παρά μόνο σε πολύ υψηλές εντάσεις φωτεινής ακτινοβολίας, λόγω του μηχανισμού εμπλουτισμού των φωτοσυνθετικών κυττάρων με CO₂.



Εικόνα 1.12 Αντιπροσωπευτικές καμπύλες εξάρτησης του φωτοσυνθετικού ρυθμού ενός C3 και ενός C4 φυτού από τη συγκέντρωση CO₂.

Πηγή: Taiz, L. and Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*. 5th edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company

Τα CAM φυτά εμφανίζουν μια ενδιάμεση συμπεριφορά και αυτό γιατί έχουν μεν μηχανισμό εμπλουτισμού CO₂ αντίστοιχο των C4, η δυνατότητα τους όμως για αποθήκευση του μηλικού οξέος είναι πεπερασμένη και κατ' επέκταση, ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός εξαρτάται από τα αποθέματα μηλικού που έχουν παραχθεί κατά τη διάρκεια

της νύχτας. Υπάρχουν όμως και ορισμένες περιπτώσεις στις οποίες CAM φυτά εμφανίζουν συμπεριφορά C3 φυτών (όταν υπάρχουν ευνοϊκές συνθήκες και κυρίως επάρκεια νερού στο έδαφος) και ανοίγουν τα στοματιά τους κατά την ανατολή και τη δύση του ήλιου (Lester and Goldsworthy, 1973; Hand et al, 1993; Fitter and Hay, 2001 Αϊβαλάκις και άλλοι, 2005; Taiz and Zeiger, 2010).

1.1.4.5. Άλλοι παράγοντες

Εκτός από τους παραπάνω παράγοντες, τη φωτοσύνθεση την επηρεάζουν και άλλοι όπως η συγκέντρωση O₂ στην ατμόσφαιρα, η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών στη ριζόσφαιρα, η προσβολή από εχθρούς και ασθένειες, η εμφάνιση φυτοτοξικότητας από ρυπαντές στο έδαφος και την ατμόσφαιρα κλπ. (Αϊβαλάκις και άλλοι, 2005)

1.1.5. Το φαινόμενο της φωτοαναστολής

Τα φυτά, και κυρίως αυτά που έχουν C3 μεταβολισμό του άνθρακα, αξιοποιούν ένα μικρό μόνο μέρος της ενέργειας της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που προσπίπτει σε αυτά σε συνθήκες πλήρους ηλιοφάνειας. Αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι η καμπύλη της γραφικής παράστασης του φωτοσυνθετικού ρυθμού σε σχέση με την ένταση φωτεινής ακτινοβολίας εμφανίζει καμπή και κορεσμό στο 1/4 με 1/6 της πλήρους έντασης. Στις υψηλές εντάσεις φωτισμού, παρατηρείται επίσης κορεσμός στο ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων καθώς και μείωση της λειτουργικής φωτοχημικής απόδοσης του PSII. Κατά τη φάση του κορεσμού της φωτοσύνθεσης επέρχεται δραστική μείωση της φωτοχημικής απόδοσης ανά φωτόνιο και στη συνέχεια μείωση και στον ίδιο το ρυθμό της φωτοσύνθεσης. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται φωτοαναστολή (Καραμπουρνιώτης και άλλοι, 2012).

Η ένταση φωτεινής ακτινοβολίας στην οποία εμφανίζεται η φωτοαναστολή μπορεί να διαφέρει ανάμεσα σε φυτικά είδη, φυτά του ίδιου είδους καθώς και σε φύλλα του ίδιου φυτού και εξαρτάται από τις συνθήκες φωτισμού στις οποίες είναι εγκλιματισμένος ο κάθε φωτοσυνθετικός ιστός. Για παράδειγμα, φυτά που έχουν εγκλιματιστεί σε συνθήκες σκιάς εμφανίζουν φωτοαναστολή σε χαμηλότερη ένταση φωτεινής ακτινοβολίας από φυτά που έχουν αναπτυχθεί κάτω από άπλετο ηλιακό φως (Fitter and Hay, 2001; Taiz and Zeiger, 2010 Καραμπουρνιώτης και άλλοι, 2012). Η ποιότητα της φωτεινής ενέργειας συμβάλλει επίσης στην εμφάνιση φωτοαναστολής. Πιο συγκεκριμένα, η υπεριώδης ακτινοβολία UV-B και λιγότερο η UV-A, προκαλεί καταπόνηση στα φύλλα και μείωση του φωτοσυνθετικού ρυθμού. Προκαλεί αποδόμηση των πρωτεϊνών D1 και D2 του PSII,

αλλοίωση των μεμβρανών των θυλακοειδών και της λεπτής δομής των χλωροπλαστών, ελάττωση της δραστηριότητας της Rubisco, μείωση της συγκέντρωσης των φωτοσυνθετικών χρωστικών καθώς και καταστολή των γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν φωτοσυνθετικές πρωτεΐνες. Μάλιστα, η τελευταία επίδραση είναι και η σημαντικότερη και σε αυτή οφείλεται η πολύ αργή ανάκαμψη του φωτοσυνθετικού ρυθμού μετά από καταπόνηση από την υπεριώδη ακτινοβολία (Kolb et al, 2001 Καραμπουρνιώτης και άλλοι, 2012).

Η φωτοαναστολή είναι το αποτέλεσμα της υπερτροφοδότησης της φωτοσυνθετικής συσκευής με ενέργεια. Συνοδεύεται από υπερφόρτωση της φωτοχημικής αλυσίδας μεταφοράς των ηλεκτρονίων και την επικράτηση ισχυρά οξειδωτικών μορίων, όπως το P680*, τα οποία, υπό συγκεκριμένες συνθήκες μπορούν να προκαλέσουν ανεξέλεγκτες οξειδώσεις. Επίσης, η έντονη φωτόλυση του νερού μπορεί να προκαλέσει την αύξηση της συγκέντρωσης μοριακού οξυγόνου στο περιβάλλον του συμπλόκου φωτόλυσης του νερού του PSII, γεγονός που ενέχει τον κίνδυνο να παραχθούν ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) (Καραμπουρνιώτης και άλλοι, 2012). Ένας άλλος λόγος διαταραχής του φωτοσυνθετικού μηχανισμού αφορά στην αδυναμία των βιοχημικών μηχανισμών να χρησιμοποιήσουν το παραγόμενο φωτοχημικό έργο. Αναλυτικότερα, ο κύκλος του Calvin αδυνατεί να καταναλώσει τα NADPH και ATP που παράγονται από τις φωτεινές αντιδράσεις. Τα μόρια αυτά συσσωρεύονται, ενώ υπάρχει έλλειψη σε NADP⁺ και ADP. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω επιβάρυνση των φωτοχημικών κέντρων και των ενδιάμεσων φορέων των ηλεκτρονίων, οι οποίοι παραμένουν στην ανηγμένη κατάσταση. Όσον αφορά στα ROS, τα σημεία δημιουργίας τους είναι: α) το φωτοχημικό κέντρο του PSII, του οποίου η χλωροφύλλη a παραμένει στην διεγερμένη κατάσταση για μεγάλο χρονικό διάστημα με αποτέλεσμα να ευνοείται η παραγωγή οξυγόνου απλότητας (singlet oxygen - ¹O₂) από το O₂ που παράγεται από τη φωτόλυση του νερού και β) η αναγωγική πλευρά του PSI όπου η φερεδοξίνη απουσία NADP⁺ μπορεί να οξειδώσει το μοριακό O₂ επίσης σε οξυγόνο απλότητας (Αντίδραση Mehler). Οι ROS προκαλούν καταστροφές αντίστοιχες με αυτές της επίδρασης της UV-B ακτινοβολίας που προαναφέρθηκαν (Krieger–Liszkay, 2005; Καραμπουρνιώτης και άλλοι, 2012).

Όπως γίνεται αντιληπτό, η φωτοαναστολή αποτελεί ένα δυνητικό πρόβλημα και για το λόγο αυτό τα φυτά έχουν αναπτύξει τους αναγκαίους μηχανισμούς κατανάλωσης της πλεονάζουσας ενέργειας και επιδιόρθωσης των ζημιών που προκύπτουν από αυτή. Οι μηχανισμοί που αφορούν στην προστασία της φωτοσυνθετικής συσκευής και

ενεργοποιούνται σε βραχυπρόθεσμες εξάρσεις της φωτεινής ακινοβολίας μπορούν να χωριστούν σε 3 κατηγορίες (Καραμπουρνιώτης και άλλοι, 2012):

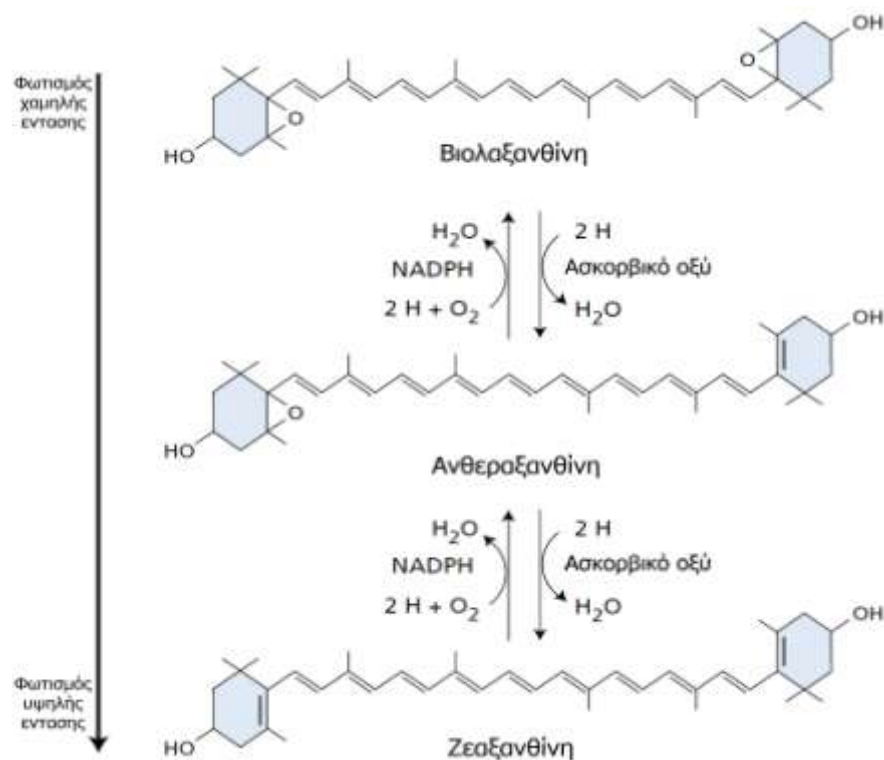
- α) Στους μη-φωτοχημικούς μηχανισμούς απόσβεσης
- β) Στους φωτοχημικούς (μη – φωτοσυνθετικούς) μηχανισμούς απόσβεσης
- γ) Στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς.

1.1.5.1. Μη-φωτοχημικοί μηχανισμοί απόσβεσης

Η απόσβεση της πλεονάζουσας ενέργειας, μέσω των μηχανισμών αυτών, πραγματοποιείται με την μετατροπή της και αποβολή της ως θερμότητα, επομένως δεν παράγεται φωτοχημικό έργο. Ένας από αυτούς λειτουργεί στη φωτοσυλλεκτική κεραία του PSII και αποσβένει την πλεονάζουσα ενέργεια μέσω της μεταφοράς της στα καροτένια. Όταν απορροφηθούν περισσότερα φωτόνια από τα αναγκαία και τα μόρια της χλωροφύλλης, λόγω αδυναμίας λειτουργίας της φωτοχημικής ροής των ηλεκτρονίων, παραμένουν στην διηγημένη κατάσταση ή κατάσταση απλότητας (singlet Chl – ^1Chl), τότε μέσω ενός μηχανισμού που ονομάζεται διασυστηματική διασταύρωση (intersystem crossing) μεταπίπτουν στην κατάσταση τριπλότητας (triplet Chl – ^3Chl). Στην κατάσταση αυτή τα μόρια της χλωροφύλλης δεν μπορούν να προκαλέσουν φωτοχημική ροή ηλεκτρονίων, μπορούν όμως να μεταφέρουν την ενέργειά τους σε μόρια καροτενοειδών που βρίσκονται συνδεδεμένα στην φωτοσυλλεκτική κεραία. Η απόσταση μεταξύ των μορίων της χλωροφύλλης *a* και των καροτενίων δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 3.6 Å, όσο είναι δηλαδή η απόσταση μεταξύ δεσμών van der Waals. Τα μόρια χλωροφύλλης *a* που εντοπίζονται στο ενεργό κέντρο του PSII δε γειτνιάζουν με μόρια καροτενίων και για το λόγο αυτό όταν διεγείρονται, και δεν υπάρχει δυνατότητα να πραγματοποιηθεί η ηλεκτρονιακή ροή κατά μήκος του θυλακοειδούς, οξειδώνουν το O_2 προς $^1\text{O}_2$. Η αναγωγή του $^1\text{O}_2$ και η αδρανοποίηση του σε αυτή την περίπτωση γίνεται με την επίδραση της α -τοκοφερόλης που λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό (Niyogi, 2000; Krieger–Liszkay, 2005; Taiz and Zeiger, 2010; Καραμπουρνιώτης και άλλοι, 2012).

Ο μηχανισμός που προαναφέρθηκε, λειτουργεί αυτόματα όταν υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες, ωστόσο δεν επιδέχεται ρυθμίσεις. Αντίθετα, σημαντικότερος μηχανισμός μη φωτοχημικής απόσβεσης, ο κύκλος των ξανθοφυλλών (Βιολαξανθίνη ↔ Ανθεραξανθίνη ↔ Ζεαξανθίνη), ενεργοποιείται και ρυθμίζεται από την αυξημένη λειτουργία της φωτοχημικής ροής των ηλεκτρονίων (Niyogi, 2000). Το έναυσμα για την ενεργοποίηση του κύκλου των ξανθοφυλλών αποτελεί η δημιουργία μεγάλης διαβάθμισης

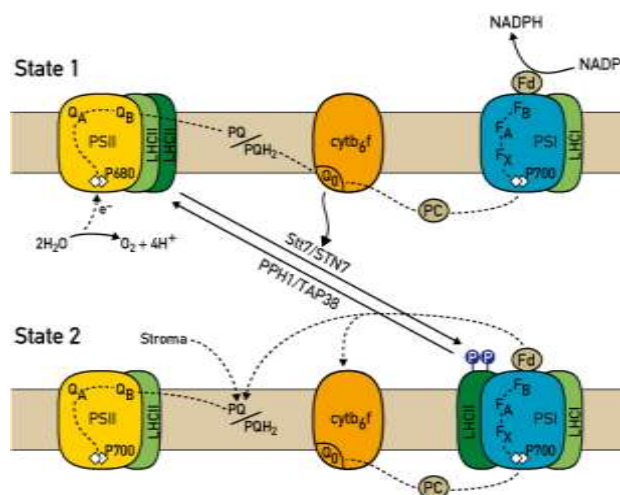
pH (ΔpH) ανάμεσα στο lumen και το στρώμα του χλωροπλάστη. Όπως αναφέρθηκε, η διαβάθμιση αυτή είναι αναγκαία για την παραγωγή ATP από τη συνθετάση του ATP. Ωστόσο, σε συνθήκες φωτοαναστολής, στο στρώμα επικρατεί έλλειψη ADP με συνέπεια το ΔpH να συνεχίζει να αυξάνεται. Η αύξηση αυτή προκαλεί την ενεργοποίηση του ενζύμου αποεποξειδάση της βιολαξανθίνης, που εντοπίζεται στο lumen, που καταλύει την αποεποξειδωση της βιολαξανθίνης (φωτοσυνθετική χρωστική) σε ζεαξανθίνη (φωτοπροστατευτική χρωστική) διαμέσου της ανθεραξανθίνης. Η ενέργεια διέγερσης μεταφέρεται στην ζεαξανθίνη, πιθανόν λόγω της πρωτονίωσης της πρωτεΐνης PsbS και της ταυτόχρονης αλλαγής της στερεοδομής της φωτοσυλλεκτικής κεραίας και αποσβένεται αργά σε θερμότητα, χωρίς να επιβαρύνεται ο υπόλοιπος φωτοσυνθετικός μηχανισμός. Όταν παρέλθει ο χρόνος επίδρασης των παραγόντων φωτοαναστολής και το ΔpH μειωθεί, η διαδικασία αντιστρέφεται και με την δράση του ενζύμου εποξειδάση της ζεαξανθίνης η τελευταία μετατρέπεται εκ νέου σε βιολαξανθίνη (Niyogi, 2000; Li et al, 2004; Taiz and Zeiger, 2010; Καραμπουρνιώτης και άλλοι, 2012).



Εικόνα 1.13 Ο κύκλος των ξανθοφυλλών.

Πηγή: Taiz, L. and Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*. 5th edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company

Ένας άλλος μηχανισμός ο οποίος έχει συμμετοχή στην προστασία από την ενεργειακή καταπόνηση είναι αυτός της κατάστασης μετάπτωσης ή *state transitions*, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία. Επειδή τα δύο φωτοσυστήματα εμφανίζουν μέγιστο στην απορρόφηση του φωτός σε διαφορετικά μήκη κύματος, είναι δυνατό να προκαλείται καταπόνηση της φωτοσυνθετικής συσκευής και λόγω της ποιότητας της φωτεινής ακτινοβολίας. Όταν η φωτεινή ακτινοβολία είναι περισσότερο εμπλουτισμένη στη φασματική περιοχή των 680nm, το PSII λειτουργεί με ταχύτερο ρυθμό από το PSI. Το αντίθετο συμβαίνει όταν η ακτινοβολία είναι εμπλουτισμένη στην περιοχή των 700nm. Στις περιπτώσεις αυτές, ο χλωροπλάστης ενεργοποιεί έναν μηχανισμό που επιτρέπει την μετακίνηση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PSII (LHCII) προς το PSI και το αντίθετο. Ειδικότερα, όταν το PSII λειτουργεί με μεγαλύτερο ρυθμό απ' ό,τι το PSI, η πλαστοκινόνη συσσωρεύεται στην ανηγμένη μορφή της. Τότε ενεργοποιείται μια πρωτεϊνική κινάση στις μεμβράνες των θυλακοειδών η οποία μπορεί να προκαλέσει την φωσφορυλίωση συγκεκριμένων μορίων θρεονίνης στην επιφάνεια του LHCII κοντά στην περιοχή που βρίσκεται η λυσίνη και η αργινίνη. Η συγκεκριμένη περιοχή φορτίζεται αρνητικά και πλέον δύναται να αποκολληθεί από την περιοχή όπου η μεμβράνη των θυλακοειδών είναι αναδιπλωμένη και να μετακινηθεί στην περιοχή όπου δεν υπάρχει αναδίπλωση και να συνδεθεί με το PSI. Σε αυτή την κατάσταση, η οποία ονομάζεται κατάσταση 2 (*state 2*) το LHCII αποδίδει ενέργεια στο PSI και έτσι οι ρυθμοί λειτουργίας PSII και PSI ισορροπούν. Όταν πάψει να υφίσταται ο παράγοντας της καταπόνησης και η πλαστοκινόνη αρχίσει να μετατρέπεται στην πιο οξειδωμένη της μορφή, η κινάση αδρανοποιείται και σταματά η φωσφορυλίωση με αποτέλεσμα τα LHCII να παραμένουν στην περιοχή των grana και να αποδίδουν περισσότερη ενέργεια στο PSII. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται κατάσταση 1 (*state 1*).



Εικόνα 1.14 Ο μηχανισμός της κατάστασης μετάπτωσης (*state transitions*).

Πηγή:

http://www.molbio.unige.ch/eng/research_groups/roch aix/objectifs

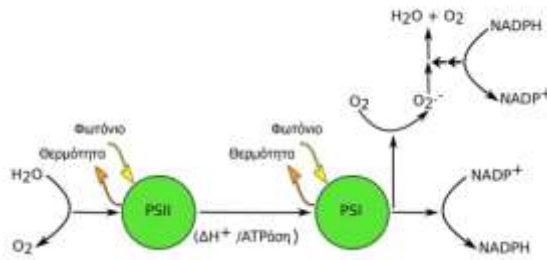
Κατά την έναρξη της μετάβασης από την κατάσταση 1 στην 2 παρατηρούνται και άλλες αλλαγές στη δομή του συμπλόκου του PSII. Από μέγα-σύμπλοκο διασπάται σε υπερ-σύμπλοκα και στη συνέχεια φωσφορυλιώνονται τα μεμονωμένα LCHII. Τα τελευταία, όταν μετακινούνται στις μη αναδιπλωμένες περιοχές των θυλακοειδών σχηματίζουν αθροίσματα-συσσωματώματα τα οποία θεωρείται πως παίζουν και ρόλο αποσβέστη σε συνθήκες καταπόνησης από υψηλές εντάσεις φωτός (Iwai et al, 2008; Wayne, 2009; Iwai et al, 2010 Taiz and Zeiger, 2010; Dietzel et al, 2011). Σημειώνεται πως αντίστοιχοι μηχανισμοί έχουν παρατηρηθεί και στα κυανοβακτήρια, με τη μεταφορά φωτοσυλλεκτικών κεραιών είτε ανάμεσα στα PSII και PSI είτε ανάμεσα στο φυκοβιλίσωμα (PBS) και το PSI (Allen et al, 1989).

Ένας άλλος μηχανισμός μη φωτοχημικής απόσβεσης της φωτεινής ενέργειας αφορά στο φθορισμό της χλωροφύλλης. Τα μόρια της χλωροφύλλης *a* του φωτοχημικού κέντρου του PSII αποβάλλουν ένα μέρος της ενέργειας που δέχονται με εκπομπή φωτονίων μεγαλύτερου μήκους κύματος από αυτό των φωτονίων που απορρόφησαν (φαινόμενο φθορισμού). Η ενέργεια όμως που αποσβένεται με αυτό τον τρόπο αποτελεί μόλις το 1-2% της μη-φωτοχημικής απόσβεσης και γι αυτό το λόγο θεωρείται ότι δε διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην φωτοπροστασία (Καραμπουρνιώτης και άλλοι, 2012).

1.1.5.2. Φωτοχημικοί (μη-φωτοσυνθετικοί) μηχανισμοί απόσβεσης

Οι μηχανισμοί αυτοί προκαλούν την απόσβεση της πλεονάζουσας ενέργειας με την παραγωγή φωτοχημικού έργου χρησιμοποιώντας εναλλακτικούς αποδέκτες των ηλεκτρονίων και αποτρέποντας κατ' αυτόν τον τρόπο την υπερφόρτωση της φωτοχημικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Ο κυριότερος μηχανισμός της κατηγορίας αυτής είναι η φωτοαναπνοή. Ο μηχανισμός της αναπτύχθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο. Επειδή αποτελεί ενεργοβόρα προσάρτηση του κύκλου του Calvin-Benson στα C3 φυτά, καταναλώνοντας ATP και NADPH, συμβάλλει στην απόσβεση μέσω κατανάλωσης ενός σημαντικού μέρους της πλεονάζουσας ενέργειας και στη μείωση του ΔpH ανάμεσα στο στρώμα και το lumen, ενώ καθιστά δυνατή την υποτυπώδη λειτουργία του κύκλου ακόμα και απουσία εξωγενούς CO₂ (Niyogi, 2000; Καραμπουρνιώτης και άλλοι, 2012).



Εικόνα 1.15 Απλοποιημένη μορφή του κύκλου νερού-νερού.

Πηγή: Skillman, J.B., Griffin, K.L., Earll, S., Kusama, M. 2011. *Photosynthetic Productivity: Can Plants do Better? in Thermodynamics - Systems in Equilibrium and Non-Equilibrium*. 2011. InTech, Rijeca, Croatia.

Ένας άλλος μηχανισμός της κατηγορίας αυτής είναι ο κύκλος νερού - νερού. Το μοριακό οξυγόνο ανάγεται από την ανηγμένη φερεδοξίνη στο PSI σε O_2^- το οποίο με την δράση του ενζύμου δεσμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) μετατρέπεται σε H_2O_2 το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε H_2O με την καταλυτική δράση της υπεροξειδάσης του ασκορβικού οξέως. Η μονοϋδροασκορβική ρίζα που προκύπτει ανάγεται εκ νέου από το PSI και ο κύκλος επαναλαμβάνεται. Η λειτουργία του

κύκλου έχει ως αποτέλεσμα να καταναλώνεται ενέργεια υπό τη μορφή NADPH. Η ονομασία του οφείλεται στο γεγονός ότι τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν από την φωτόλυση του νερού στο PSII χρησιμοποιούνται για την εκ νέου παραγωγή νερού στο PSI. (Niyogi, 2000; Καραμπουρνιώτης και άλλοι, 2012).

Άλλος μηχανισμός ο οποίος φαίνεται να συμμετέχει στην φωτοπροστασία είναι η χλωροαναπνοή. Κατ' αυτόν πραγματοποιείται μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADPH ή το NADH στο μοριακό οξυγόνο παράγοντας νερό όπως και στον κύκλο νερού-νερού. Μεταφορέας των ηλεκτρονίων είναι η πλαστοκινόνη ενώ είναι απαραίτητη η δράση της αφυδρογονάσης της πλαστοκινόνης (NDH) και της οξειδάσης Immutans (παρόμοια με την εναλλακτική οξειδάση των μιτοχονδρίων). Κατ' αυτόν τον τρόπο απομακρύνονται τα ενεργειακά προϊόντα της φωτοχημικής αλυσίδας μεταφοράς των ηλεκτρονίων επιτρέποντας έτσι την συνέχιση της λειτουργίας της. Ένας άλλος λόγος για τον οποίο η χλωροαναπνοή αναδεικνύεται σε σημαντικό παράγοντα φωτοπροστασίας είναι πως συμβάλλει στην απρόσκοπτη βιοσύνθεση καροτενίων, ειδικά στα αρχικά στάδια δημιουργίας του χλωροπλάστη, οπότε η οξειδωση της πλαστοκινόνης από το κυτόχρωμα είναι περιορισμένη καθώς και στην περίπτωση ώριμων χλωροπλαστών στους οποίους το PSII έχει υποστεί ζημιές, παρέχοντας εναλλακτική οδό μεταφοράς των ηλεκτρονίων σε συνθήκες ενεργειακού κορεσμού (Niyogi, 2000; Nixon, 2000; Casano et al, 2000).

1.1.6. Υπολογισμός του φωτοσυνθετικού ρυθμού με τη χρήση φθορισμομετρίας

Ο φωτοσυνθετικός ρυθμός μπορεί να υπολογιστεί ως η ποσότητα CO₂ που δεσμεύει ένα φύλλο στη μονάδα του χρόνου ή ως η ποσότητα του O₂ που εκλύει στη μονάδα του χρόνου, ανά μονάδα επιφάνειας, βάρους του φύλλου ή ανά ποσότητα χλωροφύλλης. Επειδή ταυτόχρονα με την φωτοσύνθεση λαμβάνουν μέρος η αναπνοή και η φωτοαναπνοή, η ολική φωτοσύνθεση μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση (Αϊβαλάκις και άλλοι, 1999):

$$\text{Ολική φωτοσύνθεση} = \text{Καθαρή Φωτοσύνθεση} + \text{Αναπνοή} + \text{Φωτοαναπνοή}$$

Από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα μέχρι και σήμερα έχουν χρησιμοποιηθεί πολυάριθμες μέθοδοι για την μέτρηση του φωτοσυνθετικού ρυθμού στα φυτά (Hunt, 2003). Η μέθοδος που έχει επικρατήσει ως η πλέον εύχρηστη και ακριβής είναι η ανάλυση αερίων με τη χρήση ανοιχτού συστήματος μέτρησης της υπέρυθρης ακτινοβολίας (open infra-red gas analysis – IRGA). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι τα ετεροατομικά μόρια αερίων, όπως το CO₂, το H₂O και το NO, εμφανίζουν απορρόφηση σε συγκεκριμένα μήκη κύματος της υπέρυθρης ακτινοβολίας. Συγκεκριμένα, το CO₂ απορροφά στα 4,25 μm ενώ παρουσιάζει και δευτερεύουσες απορροφήσεις στα 2,66, 2,77 και 14,99 μm (Long et al, 1996; Hunt, 2003). Επομένως, η εκτίμηση του ρυθμού της φωτοσύνθεσης ή της αναπνοής μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της μέτρησης των διαφορών στην απορρόφηση του CO₂ σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Πρόσθετα πλεονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν η δυνατότητα συνεχών ή στιγμιαίων μη καταστροφικών μετρήσεων ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος, και η δυνατότητα μέτρησης φωτοσυνθετικού/αναπνευστικού ρυθμού είτε σε μεμονωμένα φυτικά όργανα ή ιστούς, είτε σε ολόκληρα φυτά. Το βασικό μειονέκτημα της ανάλυσης αερίων είναι το ότι λόγω της ταυτόχρονης λειτουργίας της φωτοσύνθεσης, της αναπνοής και της φωτοαναπνοής, είναι δύσκολο έως αδύνατο να υπολογιστεί η ολική φωτοσύνθεση με τη χρήση μόνο της μεθόδου αυτής (Hunt, 2003). Για το λόγο αυτό έχει αναπτυχθεί μια νέα μέθοδος υπολογισμού του φωτοσυνθετικού ρυθμού, η μέθοδος της φθορισμομετρίας της Chl a του PSII. Όπως προαναφέρθηκε, η εκπομπή φθορισμού της χλωροφύλλης αποτελεί ένα μηχανισμό απόσβεσης της φωτεινής ενέργειας που δέχεται το PSII. Ο φθορισμός χλωροφύλλης λειτουργεί ανταγωνιστικά προς την φωτοχημική και τη μη φωτοχημική απόσβεση της ενέργειας που δέχεται το PSII. Αυτό σημαίνει πως όταν η φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων ή/και οι μη-φωτοχημικές οδοί απόσβεσης

παρεμποδίζονται, ο φθορισμός της χλωροφύλλης αυξάνεται. Συνεπώς, ανάλογα με τις συνθήκες μέτρησης, είναι δυνατή η συλλογή πληροφοριών που σχετίζονται με τον τρόπο διαχείρισης της ενέργειας διέγερσης στα φωτοσυστήματα (Maxwell and Johnson, 2000; Minagawa, 2005; Fracheboud, 2006; Baker 2008; Καραμπουρνιώτης και άλλοι 2012).

Τα σύγχρονα φθορισμόμετρα ανήκουν στην κατηγορία PAM (Pulse Amplituted Modulated – Παλμικής Διαμόρφωσης Εύρους Σήματος). Επειδή έχουν τη δυνατότητα να φωτίζουν το δείγμα με φωτεινή ακτινοβολία διαφορετικών εντάσεων ταυτόχρονα με τη μορφή παλμών (light doubling), έχουν τη δυνατότητα να μετρούν τον φθορισμό της χλωροφύλλης ακόμα και όταν ένα φύλλο φωτίζεται και από άλλες πηγές φωτός. Για την επίτευξη αυτού χρησιμοποιούνται 4 είδη φωτός.

α) **Φως μέτρησης:** το φως αυτό είναι πολύ χαμηλής έντασης και χρησιμοποιείται από το όργανο για τη μέτρηση του φθορισμού που επάγει.

β) **Ακτινικό φως:** είναι το φως που προάγει τις φωτοχημικές αντιδράσεις στους χλωροπλάστες και είναι παλμικά διαμορφωμένο (πάλλεται με δεδομένη συχνότητα). Με την ίδια συχνότητα πάλλεται και ο προαγόμενος φθορισμός και γι αυτό μπορεί να διαχωριστεί από τον φθορισμό του φωτός μέτρησης.

γ) **Φως κορεσμού:** είναι φως πολύ υψηλής έντασης το οποίο εφαρμόζεται υπό μορφή παλμών συνήθως διάρκειας 0,8 sec, και χρησιμοποιείται για την δημιουργία συνθηκών ενεργειακού κορεσμού στο PSII. Κατά την εφαρμογή του η φωτοχημική ροή των ηλεκτρονίων παρεμποδίζεται λόγω υπερφόρτωσης.

δ) **Υπέρ ερυθρό φως:** είναι φως στο σκοτεινό ερυθρό φάσμα, όπου απορροφά το PSI, και χρησιμοποιείται για να προκληθεί η οξειδωση των δεκτών των ηλεκτρονίων της φωτοχημικής αλυσίδας μετά από την εφαρμογή ακτινικού φωτός. Το συγκεκριμένο είδος φωτισμού δεν υπάρχει σε όλα τα φθορισμόμετρα. Σε αυτή την περίπτωση, οι παράμετροι του φθορισμού που μετρούνται με τη χρήση του υπολογίζονται με τη χρήση παραδοχών και μαθηματικών εξισώσεων (Minagawa, 2005; Καραμπουρνιώτης και άλλοι 2012).

Όταν ένας φωτοσυνθετικός ιστός συσκοτίζεται για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, οι δέκτες των ηλεκτρονίων της φωτοχημικής αλυσίδας παραμένουν στην

οξειδωμένη μορφή τους. Στην κατάσταση αυτή, το φύλλο θεωρείται πως είναι προσαρμοσμένο στο σκοτάδι (dark adapted). Φωτίζοντας αιφνίδια το φύλλο η επαγωγή του φθορισμού εμφανίζει μια χαρακτηριστική κινητική η οποία ονομάζεται καμπύλη Kautsky (εικόνα 1.16), από το όνομα του ερευνητή που την περιέγραψε πρώτος το 1960. Ο φθορισμός αυξάνεται ταχέως σε μια μέγιστη τιμή και στη συνέχεια μειώνεται σταδιακά και αποκτά μια σταθερή χαμηλότερη τιμή. Στη φάση αυτή το φύλλο θεωρείται πως είναι προσαρμοσμένο στο φως (light adapted) (Καραμπουρνιώτης και άλλοι 2012).

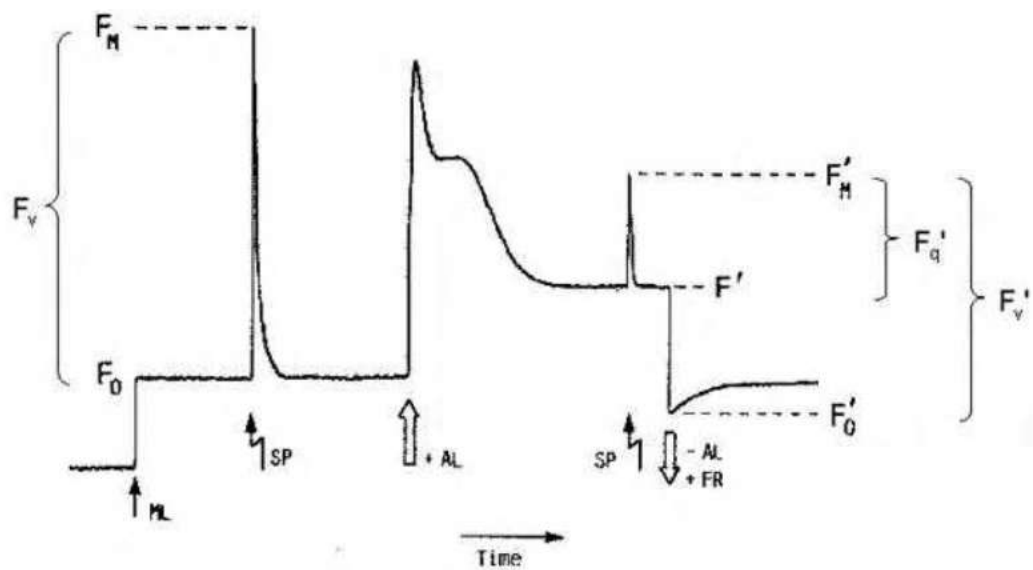
Η ανάλυση της κινητικής του φθορισμού εξηγείται ως εξής: όταν το φύλλο είναι προσαρμοσμένο στο σκοτάδι η κινόννη A (Q_A) παραμένει στην οξειδωμένη μορφή, το ενεργό κέντρο του PSII θεωρείται “ανοικτό” και είναι έτοιμο να δεχτεί την ενέργεια διέγερσης ώστε να ξεκινήσει την μεταφορά των ηλεκτρονίων. Φωτίζοντας το φύλλο με το φως μέτρησης επάγεται φθορισμός χαμηλής συνήθως έντασης με τιμή F_0 . Το φως μέτρησης δεν προκαλεί φωτοχημική ροή ηλεκτρονίων ούτε ενεργοποιεί μη-φωτοχημικούς μηχανισμούς απόσβεσης. Στη συνέχεια εφαρμόζεται ένας παλμός φωτός κορεσμού, ο οποίος προκαλεί την άμεση πλήρη αναγωγή της Q_A και επομένως καθίσταται αδύνατη περαιτέρω φωτοχημική ροή. Επειδή ο παλμός αυτός είναι μικρής διάρκειας η μη-φωτοχημική απόσβεση της ενέργειας εξακολουθεί να θεωρείται μηδενική. Ο φθορισμός λαμβάνει μια υψηλή τιμή F_m και εν συνεχεία μειώνεται και σταθεροποιείται κοντά στην τιμή F_0 .

Έχοντας γνώση των τιμών F_0 και F_m είναι δυνατός ο υπολογισμός της παραμέτρου Φ_{PSII_0} η οποία ισούται με:

$$\Phi_{PSII_0} = (F_m - F_0) / F_m$$

Το Φ_{PSII_0} ονομάζεται **θεμελειώδης ή δυνητική φωτοχημική ικανότητα του PSII** ενώ η διαφορά $F_m - F_0$ συμβολίζεται με F_v και ονομάζεται μεταβλητός φθορισμός. Το Φ_{PSII_0} σχετίζεται ικανοποιητικά με τη φωτοσυνθετική απόδοση ανά φωτόνιο και αποτελεί μια σταθερή παράμετρο αφού η τιμή της σε υγιή φυτά κυμαίνεται πλησίον της τιμής 0,83 ανεξαρτήτως του φυτικού είδους. Χαμηλότερες τιμές αποτελούν ένδειξη άσκησης καταπόνησης στα φυτά στα οποία λαμβάνονται οι μετρήσεις (Maxwell and Johnson, 2000; Minagawa, 2005; Fracheboud, 2006; Baker, 2008; Καραμπουρνιώτης και άλλοι 2012).

Η παραπάνω παράμετρος δίνει μια αδρή εκτίμηση της φυσιολογικής κατάστασης των φυτών, διότι αφορά σε φύλλα προσαρμοσμένα στο σκοτάδι. Για να εξαχθούν περαιτέρω πληροφορίες θα πρέπει να γίνει αντίστοιχη ανάλυση των παραμέτρων του φθορισμού παρουσία φωτισμού. Για το λόγο αυτό, στο επόμενο στάδιο ανάλυση κινητικής φθορισμού ενεργοποιείται το ακτινικό φως του φθορισμομέτρου. Ο χειρισμός αυτός προκαλεί την έναρξη της φωτοχημικής ροής των ηλεκτρονίων. Ωστόσο, οι δέκτες των ηλεκτρονίων, συμπεριλαμβανομένης της Q_A , παραμένουν στην ανηγμένη κατάσταση επειδή δεν έχουν ακόμα ενεργοποιηθεί τα ένζυμα που καταλύουν τις σκοτεινές αντιδράσεις. Σε αυτή τη φάση το φωτοχημικό κέντρο του PSII θεωρείται κλειστό και δεν μπορεί πλέον να πραγματοποιήσει φωτοχημική ροή ηλεκτρονίων. Αποτέλεσμα είναι η αύξηση του φθορισμού σε μια τιμή F_p . Ωστόσο, η σταδιακή ενεργοποίηση των ενζύμων των σκοτεινών αντιδράσεων καθιστά δυνατή την πραγματοποίηση της φωτοχημικής ροής των ηλεκτρονίων και την κατανάλωση των ενεργειακών προϊόντων αυτής στον κύκλο Calvin - Benson. Παράλληλα, ο φθορισμός μειώνεται και μετά από την πάροδο χρόνου σταθεροποιείται σε μια νέα χαμηλή τιμή F' ή F_t . Όταν επέλθει η σταθεροποίηση η Q_A είναι μερικώς οξειδωμένη, ενώ λειτουργούν τόσο η φωτοχημική απόσβεση της ενέργειας όσο και η μη-φωτοχημική. Προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί η συμβολή των επιμέρους αποσβέσεων επιβάλλεται ο περιορισμός της μιας εκ των δύο. Επειδή ο έλεγχος της μη-φωτοχημικής απόσβεσης δεν είναι εφικτός, πραγματοποιούνται χειρισμοί ώστε να μηδενιστεί η φωτοχημική απόσβεση. Αυτό επιτυγχάνεται με την εκ νέου χρήση παλμών του φωτός κορεσμού ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Η Q_A ανάγεται πλήρως στιγμιαία και έτσι το ενεργό κέντρο του PSII δεν έχει τη δυνατότητα παραγωγής φωτοχημικού έργου. Τότε ο φθορισμός παίρνει μια τιμή F_m' η οποία όμως είναι χαμηλότερη της F_m αφού σε αυτή την περίπτωση λαμβάνει μέρος μη-φωτοχημική απόσβεση της ενέργειας διέγερσης. Η τιμή του φθορισμού αμέσως πριν την εφαρμογή του παλμού κορεσμού είναι η F_t . Αν σταματήσει η εφαρμογή του ακτινικού φωτός και γίνει φωτισμός του φύλλου με σκοτεινό ερυθρό φως τότε το ενεργοποιείται το PSI απομακρύνοντας τα ηλεκτρόνια από την φωτοχημική αλυσίδα μεταφοράς τους και οι δέκτες τους μεταβαίνουν στην πλήρως οξειδωμένη μορφή τους. Τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή λαμβάνεται η τιμή του φθορισμού F_o' η οποία δεν είναι ίδια με την F_o λόγω του ότι τα στοιχεία της φωτοσυλλεκτικής κεραίας, λόγω της εφαρμογής του ακτινικού φωτός, έχουν διαφορετική διάταξη από αυτή που είχαν στην κατάσταση προσαρμογής στο σκοτάδι (Maxwell and Johnson, 2000; Minagawa, 2005; Fracheboud, 2006; Baker 2008; Καραμπουρνιώτης και άλλοι 2012).



Εικόνα 1.16 Αντιπροσωπευτική καμπύλη ανάλυσης του φθορισμού της χλωροφύλλης (Kautsky).

Πηγή: Van knooten and Snell, 1990, όπως τροποποιήθηκε από τους Guidi and Degl'Innocenti, 2011

Μέσω των παραμέτρων που αναφέρθηκαν παραπάνω μπορούν να υπολογιστούν και ορισμένες άλλες παράμετροι της φωτοσυνθετικής διαδικασίας με σημαντικότερες τις:

Λειτουργική φωτοχημική ικανότητα του PSII (Φ_{PSII}): Υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\Phi_{PSII} = (F_m' - F_t) / F_m' = F_q' / F_m'$$

Η παράμετρος Φ_{PSII} εκτιμά την απόδοση της απορρόφησης του φωτός από το PSII με σκοπό την αναγωγή της Q_A , δηλαδή για την παραγωγή φωτοχημικού έργου.

Θεμελιώδης ή Δυνητική φωτοχημική ικανότητα του PSII παρουσία φωτισμού: Υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$(F_m' - F_o') / F_m' = F_v' / F_m'$$

Εκτιμά τη μέγιστη απόδοση του PSII για παραγωγή φωτοχημικού έργου σε φύλλο που είναι προσαρμοσμένο στο φως όταν η Q_A είναι πλήρως οξειδωμένη.

Συντελεστής φωτοχημικής απόσβεσης (qP): Υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$qP = (F_m' - F_t)/(F_m' - F_o') = F_q'/F_v'$$

Εκτιμά το ποσοστό των ενεργών κέντρων του PSII τα οποία είναι “ανοικτά”. Δηλαδή το ποσοστό των PSII στα οποία η Q_A είναι οξειδωμένη. Η παράμετρος αυτή υπολογίζεται με την παραδοχή ότι κάθε ενεργό κέντρο PSII σχετίζεται με μια μεμονωμένη φωτοσυλλεκτική κεραία (puddle model). Επειδή όμως στην πράξη τα ενεργά κέντρα μπορούν να μοιράζονται φωτοσυλλεκτικές κεραίες (lake model), αναφέρεται και η διορθωμένη έκφραση του συντελεστή φωτοχημικής απόσβεσης:

$$qL = qP \cdot F_o'/F_t$$

Συντελεστής μη-φωτοχημικής απόσβεσης (qN, NPQ): Υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$qN = (F_m - F_m')/(F_m - F_o')$$

Εκτιμά τις αλλαγές στην μη-φωτοχημική απόσβεση της ενέργειας διέγερσης σε σχέση με την κατάσταση των παραμέτρων φωτισμού στην κατάσταση του φύλλου όταν αυτό είναι προσαρμοσμένο στο σκοτάδι. Το qN παίρνει τιμές από 0-1. Ωστόσο, σε υψηλές τιμές μη φωτοχημικής απόσβεσης (κοντά στο 1), η παράμετρος αυτή εμφανίζει μικρή ευαισθησία. Γι αυτό, μια άλλη έκφραση της μη-φωτοχημικής απόσβεσης είναι μέσω της παραμέτρου NPQ η οποία υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$$

Η παράμετρος αυτή συσχετίζεται γραμμικά με την απόσβεση της ενέργειας μέσω εκπομπής θερμότητας και παίρνει τιμές από 0 - ∞. Ωστόσο, στα περισσότερα φυτικά είδη οι συνήθεις τιμές κυμαίνονται μεταξύ 0 – 3,5.

Με ανάλυση της κινητικής στο σκοτάδι (dark relaxation kinetics) καθίσταται δυνατό να υπολογιστεί η συνεισφορά των επιμέρους μηχανισμών μη-φωτοχημικής απόσβεσης στο NPQ ή/και στο qN. Δηλαδή, την απόσβεση ενέργειας με τη μορφή θερμότητας μέσω του κύκλου των ξανθοφυλλών (qE), την απόσβεση ενέργειας μέσω της

κατάστασης μετάπτωσης (state transitions) (qI) και την απόσβεση μέσω της ελεγχόμενης και μη-ελεγχόμενης, λόγω βλαβών των φωτοσυστημάτων, φωτοαναστολής (qI).

Φαινόμενος ρυθμός γραμμικής ροής ηλεκτρονίων (ETR ή J): Υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$ETR = I \cdot A_{\text{leaf}} \cdot \text{fraction}_{\text{PSII}} \cdot \Phi_{\text{PSII}}$$

Το I είναι η ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας ($\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) που προσπίπτει στο φύλλο (Photosynthetically Active Radiation - PAR), ενώ A_{leaf} είναι το ποσοστό της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που απορροφάται από αυτό. Στα ώριμα φύλλα των περισσότερων φυτικών ειδών η παράμετρος αυτή παίρνει την τιμή 0,84 (απορροφάται δηλαδή το 84% της PAR από τα φωτοσυστήματα), χωρίς ωστόσο να αποκλείονται σημαντικές αποκλίσεις. Το $\text{fraction}_{\text{PSII}}$ αποτελεί το ποσοστό της ενέργειας που απορροφάται από το PSII και συνήθως στους υπολογισμούς θεωρείται πως λαμβάνει την τιμή 0,5 (δηλαδή πως η ενέργεια μοιράζεται εξίσου στα δύο φωτοσυστήματα). Βέβαια και αυτή η παραδοχή μπορεί να είναι εσφαλμένη αφού ανάλογα με τις συνθήκες τα δυο φωτοσυστήματα μπορεί να δεσμεύουν διαφορετικά επίπεδα ενέργειας (Maxwell and Johnson, 2000; Minagawa, 2005; Fracheboud, 2006; Baker 2008; Καραμπουρνιώτης και άλλοι 2012).

Η φθορισμομετρία της χλωροφύλλης αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στη φυσιολογία των φυτών γιατί παρέχει τη δυνατότητα μέτρησης της αποδοτικότητας της φωτοσύνθεσης άμεσα και υπό συνθήκες στις οποίες οι κλασσικές μέθοδοι παρουσιάζουν σοβαρά μειονεκτήματα (Maxwell and Johnson, 2000). Μέσω των παραμέτρων που είναι δυνατόν να υπολογιστούν από την ανάλυση της κινητικής του φθορισμού, μπορεί να εκτιμηθεί η ικανότητα της χρήσης της ενέργειας από το PSII αλλά και η έκταση της ζημιάς που μπορεί να προκύψει από την πλεονάζουσα ενέργεια διέγερσης. Σε ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες, όπου είναι δυνατόν να περιοριστεί η φωτοαναπνοή στα C3 φυτά, τόσο το ET όσο και το Φ_{PSII} μπορούν να συσχετιστούν γραμμικά με το ρυθμό δέσμευσης του CO_2 (Genty et al, 1989; Edwards and Baker, 1993). Ωστόσο, σε συνθήκες πεδίου οι συσχετίσεις αυτές δεν ισχύουν πλήρως, διότι εκτός της φωτοαναπνοής, υπάρχουν και άλλες διεργασίες που ανταγωνίζονται την αφομοίωση του CO_2 όπως ο μεταβολισμός του N και η αντίδραση Mehler. Γι αυτό τον λόγο κρίνεται

αναγκαίο τα αποτελέσματα της φθορισμομετρίας να συμπληρώνονται με τη χρήση IRGA (Krall and Edwards, 1992; Maxwell and Johnson, 2000).

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί πως όπως και σε κάθε άλλη μέθοδο υπολογισμού του φωτοσυνθετικού ρυθμού, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα πιθανά μειονεκτήματά της, καθώς και τα σφάλματα στα οποία μπορεί να υποπέσει ο ερευνητής. Στα πρώτα ανήκουν, παραδείγματος χάριν, το σφάλμα υπολογισμού της έντασης του φθορισμού λόγω κηρών, τριχών ή μη φωτοσυνθετικών χρωστικών των επιφανειακών ιστών των φύλλων, η πιθανή επίδραση του οριζόντια διαχεόμενου CO₂ στην μέτρηση συγκεκριμένης περιοχής στο φύλλο και το γεγονός πως ο μετρούμενος φθορισμός προέρχεται από την ανώτερη κυτταρική στιβάδα, επομένως ενέχει τον κίνδυνο οι ενδιάμεσες κυτταρικές στιβάδες του φύλλου να έχουν διαφορετικό φωτοσυνθετικό ρυθμό από τον μετρούμενο. Στα δεύτερα ανήκουν κυρίως η λανθασμένη επιλογή φυτικού υλικού για την πραγματοποίηση των μετρήσεων καθώς και οι λανθασμένες συγκρίσεις μεταξύ ανόμοιων φυτικών υλικών (Maxwell and Johnson, 2000; Hunt, 2003; Morison and Lawson, 2007; Logan et al, 2007; Baker, 2008).

1.2. Η Διαπνοή

Το νερό, ως κύριο συστατικό του φυτικού σώματος, αποτελεί το 80 έως και 90% του νωπού βάρους των περισσότερων ποοδών φυτών και πάνω από το 50% των πολυετών ξυλωδών φυτών. Ωστόσο, το νερό αυτό αποτελεί μόνο το 5% του νερού που μεταφέρεται από τη ρίζα αφού περισσότερο από το 95% χάνεται υπό τη μορφή υδρατμών κυρίως μέσω των στοματιών. Η διεργασία αυτή ονομάζεται διαπνοή (Δροσόπουλος, 1998; Μανέτας, 2005; Taiz and Zeiger; 2010). Η διαπνοή ευθύνεται επομένως για τις τεράστιες απώλειες νερού, οι οποίες, εάν δεν αναπληρωθούν από το έδαφος, ενέχει κίνδυνο ακόμη και για την επιβίωση των φυτικών ειδών (Δροσόπουλος, 1998). Ωστόσο η φαινομενικά σπάταλη διαδικασία δεν αποτελεί εξελικτικό λάθος αλλά αναπόφευκτη συνέπεια της λειτουργίας της φωτοσύνθεσης στα χερσαία φυτά (Αϊβαλάκις και άλλοι, 2005). Τα φυτά της χέρσου αντιμετωπίζουν συνεχώς το δίλημμα: Να ανοιξουν τα στομάτια προκειμένου να φωτοσυνθέτουν απρόσκοπτα (με κίνδυνο να αφυδατωθούν), ή να τα κλείσουν προκειμένου να διαφυλάξουν το πολύτιμο νερό (με κίνδυνο να υποστούν πενία άνθρακα); Η απάντηση στο δίλλημα αυτό δίδεται από τις επικρατούσες συνθήκες επάρκειας ή ανεπάρκειας νερού στο έδαφος. Πέραν αυτών, μέσω της διαδικασίας της διαπνοής επιτυγχάνονται δύο ζωτικής σημασίας λειτουργίες: (Δροσόπουλος, 1998; Μανέτας, 2005;)

α) Η ψύξη των φύλλων μέσω της εξάτμισης του νερού, αφού για την εξάτμιση μιας συγκεκριμένης μάζας νερού απαιτείται ενέργεια (λανθάνουσα ενέργεια εξάτμισης) που απορροφάται από το περιβάλλον μειώνοντας τη θερμοκρασία. Η λειτουργία αυτή είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση φυτών σε θερμά κλίματα.

β) Η συνεχής αναπλήρωση του διαπνεόμενου νερού από το έδαφος προκαλεί μια συνεχή ροή νερού προς τα φύλλα διαμέσου των αγγείων του ξύλου που καλείται διαπνευστικό ρεύμα. Μέσω αυτού πραγματοποιείται η τροφοδοσία των φύλλων με τα αναγκαία θρεπτικά συστατικά τα οποία συμπαρασύρονται από το διακινούμενο νερό.

Η μεταφορά των υδρατμών από το μεσόφυλλο προς την ατμόσφαιρα πραγματοποιείται με διάχυση. Ωστόσο, η εφυμενίδα αποτελεί αποτελεσματικό εμπόδιο στη μεταφορά των υδρατμών αφού όπως έχει υπολογιστεί μόνο το 5% των υδρατμών εξέρχεται του φύλλου μέσω αυτής. Το υπόλοιπο νερό που διαπνέεται από τα φύλλα χάνεται με διάχυση των υδρατμών διαμέσου των στοματιών (Taiz and Zeiger; 2010). Η διάχυση των υδρατμών από το φύλλο προς την ατμόσφαιρα οφείλεται στη διαφορά τάσεως ατμών που επικρατεί μεταξύ της κορεσμένης σε υδρατμούς φάση (μεσόφυλλο) και της ακόρεστης φάσης, δηλαδή της ατμόσφαιρας (Δροσόπουλος, 1998). Η ταχύτητα

ροής των υδρατμών εξαρτάται, όχι μόνο από τη διαφορά τάσεων, αλλά και από τις αντιστάσεις που παρεμβάλλονται στην έξοδο του νερού από τα φύλλα. Οι δύο βασικότερες αντιστάσεις που συναντά το νερό είναι η αντίσταση των στοματίων (R_s) και η αντίσταση του οριακού στρώματος (R_b). Η πρώτη επιδέχεται ενεργό ρύθμιση μέσω των αυξομειώσεων του εύρους του πόρου των στοματίων, ενώ η δεύτερη οφείλεται στην επίδραση του οριακού στρώματος (ένα στρώμα αέρα που εφάπτεται στο φύλλο και παρουσιάζει διαβάθμιση συγκέντρωσης υδρατμών) (Καράταγλης, 1999; Taiz and Zeiger; 2010).

Όπως προαναφέρθηκε, τα στομάτια εκτός από πύλες εξόδου των υδρατμών, αποτελούν και τις πύλες εισόδου του αναγκαίου για τη φωτοσύνθεση CO_2 . Το πρόβλημα μάλιστα εντείνεται λαμβάνοντας υπόψη πως η διαφορά συγκέντρωσης που προκαλεί την μεταφορά του CO_2 εντός του κυττάρου είναι πολύ μικρότερη από αυτή που προκαλεί την μεταφορά το νερού εκτός αυτού. Αν υπάρχει επαρκές εδαφικό νερό τότε και οι δύο διαδικασίες λειτουργούν συγχρονισμένα. Αν όμως το εδαφικό νερό δεν είναι επαρκές τότε το φυτό περιορίζει την απώλεια νερού αλλά και την απορρόφηση CO_2 , και ως εκ τούτου και τον ρυθμό της φωτοσύνθεσης, προκειμένου να επιβιώσει (Taiz and Zeiger; 2010). Το εύρος του στοματικού πόρου ρυθμίζει τις δύο αυτές αντίρροπες λειτουργίες και επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως:

α) Την ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας: Σε συνθήκες επάρκειας νερού και ικανοποιητικές τιμές ατμοσφαιρικής υγρασίας, το εύρος του στοματικού πόρου εξαρτάται από την ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας. Στα C3 και C4 φυτά τα στομάτια ανοίγουν κατά τη διάρκεια της μέρας και κλείνουν κατά τη διάρκεια της νύχτας. Αυτό οφείλεται στο ότι τη νύχτα δεν πραγματοποιείται η φωτοσύνθεση και άρα δεν είναι αναγκαίο το CO_2 , οπότε τα φυτά κλείνουν τα στομάτια για να περιορίσουν τις απώλειες νερού. Στα φυτά CAM ακολουθούν αντίστροφη πορεία (Αϊβαλάκис και άλλοι, 2005; Taiz and Zeiger; 2010).

β) Τη συγκέντρωση του CO_2 : Όταν το εδαφικό νερό είναι επαρκές η επικράτηση χαμηλών συγκεντρώσεων CO_2 στο μεσόφυλλο προκαλεί άνοιγμα των στοματίων έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η ταχύτερη διάχυση του CO_2 από την ατμόσφαιρα προς το φύλλο και να συνεχιστεί απρόσκοπτα η φωτοσυνθετική διαδικασία. Κατ' αυτό τον τρόπο συντονίζεται η φωτοσύνθεση με τον μηχανισμό κινήσεων των καταφρακτικών κυττάρων (Μανέτας, 2005; Taiz and Zeiger; 2010).

γ) Τη σχετική υγρασία της ατμόσφαιρας: Η σχετική υγρασία της ατμόσφαιρας επηρεάζει άμεσα την διαφορά στην τάση των υδρατμών μεταξύ του εσωτερικού του φύλλου και της ατμόσφαιρας. Σε ορισμένα φυτικά είδη τα καταφρακτικά κύτταρα είναι ευαίσθητα στις αλλαγές της σχετικής υγρασίας της ατμόσφαιρας και προκαλούν το κλείσιμο του πόρου των στοματίων όταν επικρατούν χαμηλές τιμές σχετικής υγρασίας (Δροσόπουλος, 1998; Καράταγλης, 1999).

δ) Την επάρκεια του νερού στο έδαφος: Όταν το δυναμικό του νερού στο περιβάλλον της ρίζας παίρνει χαμηλές τιμές, τα στομάτια κλείνουν προκειμένου να περιορίσουν περαιτέρω απώλειες και επακόλουθες παρενέργειες όπως η δημιουργία ασυνεχειών στη στήλη του νερού. Όταν το εδαφικό νερό είναι επαρκές τότε το εύρος του πόρου των στοματίων ελέγχεται και ρυθμίζεται από τους παράγοντες που προαναφέρθηκαν (Μανέτας, 2005; Taiz and Zeiger; 2010)

ε) Την θερμοκρασία του αέρα αλλά και του φύλλου: Η αύξηση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος προκαλεί ελάττωση της μερικής πίεσης υδρατμών της ατμόσφαιρας. Ωστόσο, η αύξηση της θερμοκρασίας δεν επηρεάζει την κατάσταση εντός του φύλλου όπου η ατμόσφαιρα θεωρείται πάντα κορεσμένη. Ως εκ τούτου, αυξάνεται η διαφορά πιέσεων και τείνει να αυξηθεί ο ρυθμός διαπνοής. Αν το εδαφικό νερό δεν είναι επαρκές για να μπορέσει το φυτό να συντηρήσει υψηλούς ρυθμούς διαπνοής, τα στομάτια τείνουν να κλείσουν (Δροσόπουλος, 1998; Αϊβαλάκις και άλλοι, 2005; Καραμπουρνιώτης και άλλοι, 2012).

στ) Την ταχύτητα του ανέμου: Η ύπαρξη ανέμου ελαττώνει το πάχος του οριακού στρώματος που σχηματίζεται πάνω από τους στοματικούς πόρους, δηλαδή μειώνονται οι τιμές της R_b . Συνεπώς, διευκολύνεται η διάχυση από το εσωτερικό του φύλλου αυξάνοντας έτσι τον ρυθμό διαπνοής λόγω αύξησης της διαφοράς των μερικών πιέσεων φύλλου – ατμόσφαιρας. Ορισμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά όπως π.χ. ή ύπαρξη τριχώματος ή βυθισμένων στοματίων, περιορίζουν την επίδραση του ανέμου στο πάχος του οριακού στρώματος (Δροσόπουλος, 1998; Taiz and Zeiger; 2010)

1.2.1. Ο ρόλος του αμπισισικού οξέως (ABA) στη διαπνοή

Η έλλειψη νερού προκαλεί, όπως προαναφέρθηκε, κλείσιμο των στοματίων. Η αντίληψη της διαμόρφωσης συνθηκών ανεπάρκειας νερού πραγματοποιείται μέσω ενός ορμονικού σήματος, του αμπισισικού οξέως (ABA). Πρόκειται για ένα σεσκιτερπένιο, ένωση με 15 άτομα άνθρακα, η βιοσύνθεση του οποίου πραγματοποιείται στους χλωροπλάστες αλλά και σε άλλα πλαστίδια, τόσο στα φύλλα όσο και στη ρίζα, με πρόδρομη ένωση το διφωσφορικό ισοπεντένιο. Με μια σειρά καταλυόμενων αντιδράσεων, η πρόδρομη αυτή ένωση μετατρέπεται σε ζεαξανθίνη, βιολαξανθίνη, νεοξανθίνη και άλλα ενδιάμεσα μόρια και τελικώς σε ABA.

Στα φύλλα, η σταδιακή αφυδάτωση του κυτταροπλάσματος λόγω της ανεπάρκειας νερού προκαλεί την έξοδο του ABA από τα σημεία βιοσύνθεσής του και μεταφορά του μέσω του διαπνευστικού ρεύματος στα καταφρακτικά κύτταρα, ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται θεαματικά και ο ρυθμός βιοσύνθεσης.

Στη ρίζα, όταν ακόμα και ένα μέρος αυτής αφυδατωθεί τότε παράγεται ABA σε υψηλές συγκεντρώσεις, το οποίο μεταφέρεται μέσω του διαπνευστικού ρεύματος στα φύλλα με τελικό προορισμό τα καταφρακτικά κύτταρα.

Και στις δύο περιπτώσεις το ABA προσδένεται σε συγκεκριμένους υποδοχείς στη κυτταρική μεμβράνη των καταφρακτικών κυττάρων προκαλώντας την αύξηση των κατιόντων Ca^{+2} στο κυτταρόπλασμα με ταυτόχρονη αύξηση του κυτταρικού pH, αποπόλωση των μεμβρανών και την ενεργοποίηση καναλιών K^{+} , Cl^{-} , ή/και του μηλικού οξέως. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μαζική έξοδο κατιόντων K^{+} από το χυμοτόπιο των καταφρακτικών κυττάρων και μεταφορά τους στα παρακαταφρακτικά, προκαλώντας άμεση μείωση της σπαργής των πρώτων και ως εκ τούτου τη μείωση του εύρους του στοματικού πόρου.

Λόγω του τρόπου δράσης του και της ταχείας μεταφοράς του σε όλο το φυτικό σώμα, το ABA μπορεί να χαρακτηριστεί ως διασυστηματικό σήμα κινδύνου που προειδοποιεί ότι επέρχονται προβλήματα στην τροφοδοσία με νερό του υπέργειου τμήματος του φυτού (Schroeder et al, 2001; Μανέτας, 2005; Taiz and Zeiger; 2010; Καραμπουρνιώτης και άλλοι, 2012)

1.3. Τα κυτταρικά έγκλειστα

Ο όρος «κυτταρικά έγκλειστα» αναφέρεται συνήθως σε εναποθέσεις ανόργανων ή οργανικών ενώσεων σε εξειδικευμένα κύτταρα. Τις συνηθέστερες ενώσεις αποτελούν τα οργανικά και ανόργανα άλατα ενώ δεν είναι σπάνιος ο εντοπισμός σε κυτταρικά έγκλειστα πρωτεϊνών, τερπενίων, φλαβονοειδών, χρωστικών, αιθέριων ελαίων κ.α. Τα κυτταρικά έγκλειστα των αλάτων στα φυτά ταξινομούνται σε τρεις κύριες κατηγορίες (Arnott and Pautard, 1970; Fahn, 1970; Franceschi and Horner, 1980; Metcalfe, 1985; Peterson et al, 2008):

α: Κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου.

β: Άμορφο ανθρακικό ασβέστιο (κυστόλιθοι).

γ: Άμορφες εναποθέσεις πυριτίου (φυτόλιθοι).

1.3.1. Κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου

Οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου (CaOx) έχουν παρατηρηθεί σε πολλά μέλη και των πέντε βασιλείων (Μόνερα, Πρώτιστα, Μύκητες, Φυτά και Ζώα) και στα φυτά κάνουν την εμφάνισή τους τόσο στα αγγειόσπερμα όσο και στα γυμνόσπερμα (Franceschi and Nakata, 2005; Nakata 2003; Metcalfe, 1985). Η πρώτη καταγεγραμμένη παρατήρησή τους χρονολογείται από το 1675 από τον Leeuwenhoek με τη χρήση απλού οπτικού μικροσκοπίου. (Franceschi and Nakata, 2005; Nakata, 2012). Εμφανίζονται σε περισσότερες από 250 φυτικές οικογένειες ενώ σύμφωνα με τον Solereder (1908) δεν έχει επιβεβαιωθεί η ύπαρξή τους σε ένα μικρό μόνο αριθμό οικογενειών (Metcalfe, 1985; Franceschi and Nakata, 2005; Nakata, 2012). Τα φυτικά είδη που σχηματίζουν κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται και πολλά καλλιεργούμενα, μπορεί να τους συσσωρεύουν σε ποσοστό 3% - 80% (w/w) του ξηρού τους βάρους ενώ στην περίπτωση του κάκτου *Cactus sensilis* το ποσοστό αυτό μπορεί να φτάσει και το 85%. Σε πολλές περιπτώσεις οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου μπορεί να περιέχουν το 90% του συνολικού Ca του φυτού (Cheavin, 1938, Libert and Franseschi, 1987; Franceschi and Nakata, 2005; Nakata, 2012).

Η θέση τους στο φυτό διαφέρει ανάλογα με το είδος, ωστόσο, κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου έχουν παρατηρηθεί σε όλα τα φυτικά όργανα, σε βλαστικά, αναπαραγωγικά, αποθησαυριστικά, φωτοσυνθετικά και μη φωτοσυνθετικά. Ένα φυτικό είδος μπορεί να σχηματίζει κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου σε έναν ή σε περισσότερους ιστούς, ενώ κρυστάλλους σχηματίζουν και οι τρεις λειτουργικές ομάδες φυτών (C3,C4,

CAM) (Franceschi and Horner, 1980; Metcalfe, 1985; Horner and Wagner, 1995; Webb, 1999; Dickinson, 2000; Franceschi and Nakata, 2005).

Όσον αφορά στον κυτταρικό εντοπισμό τους, οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου σχηματίζονται τόσο ενδοκυτταρικά (στο χυμοτόπιο ή στο κυτταρόπλασμα), όσο και εξωκυτταρικά (ενσωματωμένοι στο κυτταρικό τοίχωμα ή στην εξωτερική του επιφάνεια) (Metcalf, 1985; Horner and Wagner, 1995; Dickinson, 2000; Franceschi and Nakata, 2005). Ενδοκυτταρικά οι κρύσταλλοι μπορούν να σχηματιστούν:

α. Σε τρίχες που διαδραματίζουν αμυντικό ρόλο όπως σε αυτές των γενών *Fagraea* και *Strychnos* οικ. Loganiaceae (Metcalf, 1985).

β. Σε επιδερμικά και υποδερμικά κύτταρα. Σε αυτή την περίπτωση σπάνια παρατηρούνται μεμονωμένοι κρύσταλλοι αλλά συνήθως συναντώνται κατά ομάδες (π.χ. στο γένος *Stylosanthes* οικ. Fabaceae) (Metcalf, 1985).

γ. Σε εξειδικευμένα κύτταρα - ιδιοβλάστες (Foster, 1956), τα οποία διαφέρουν τόσο σε μορφή όσο και σε οργάνωση από τα γειτονικά τους. Συχνότερα απαντούνται στο μεσόφυλλο, στην περιοχή των δεσμικών κολεών ή των προεκτάσεών τους στην περιοχή της ηθμαγειώδους δεσμίδας (Metcalf, 1985; Franceschi and Nakata, 2005), αλλά έχουν επίσης παρατηρηθεί στο φελλόδερμα (Metcalf, 1985), στους γαμέτες και στο έμβρυο σε ορισμένα είδη της οικ. Araceae (Coté and Gibernau, 2012), στο περισπέρμιο, όπως για παράδειγμα στο *Phaseolus vulgaris* (Jáuregui-Zúñiga et al, 2005), στους χιτώνες της σπερματικής βλάστης (π.χ. στο *Glycine max*) (Parslan et al, 2001) και το ενδοκάρπιο (στο *Averrhoa carambola*) (Neto et al, 2009).

Ο σχηματισμός κρυστάλλων σε αποπλασματικούς χώρους είναι συχνός στα γυμνόσπερμα όπως για παράδειγμα στο κολλέγχυμα ορισμένων Taxaceae (Metcalf, 1985; Horner and Wagner, 1995; Dickinson, 2000; Franceschi and Nakata, 2005). Στα γυμνόσπερμα η αποπλασματική εναπόθεση οξαλικού ασβεστίου μπορεί να πραγματοποιηθεί στους μεσοκυττάριους χώρους των κυττάρων του παρεγχύματος των ηθμαγγειωδών δεσμίδων καθώς και στο κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων της επιδερμίδας. Στα αγγειόσπερμα ολιγάριθμες οικογένειες φυτών πραγματοποιούν αποπλασματική εναπόθεση οξαλικού ασβεστίου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι αστροσκληρεΐδες στα γένη *Nymphaea* (οικ. Nympaceae) και *Schisandra* (οικ. Schisandraceae), και τα επιδερμικά κύτταρα σε τρία γένη της οικ. Casuarinaceae (Horner and Wagner, 1995; Dickinson, 2000; Franceschi and Nakata, 2005; Kuo-Huang et al, 2007).

Το οξαλικό ασβέστιο των κρυστάλλων των φυτικών οργανισμών απαντάται σε δύο χημικές μορφές, τη μονοϋδρική (whewellite) $[Ca(C_2O_4) \cdot H_2O]$ και τη διϋδρική (weddelite) $[Ca(C_2O_4) \cdot 2H_2O]$. Η διϋδρική μορφή χαρακτηρίζεται ως περισσότερο ευδιάλυτη στο νερό έναντι της μονοϋδρικής (Arnott, 1982; Webb, 1999; Franceschi and Nakata, 2005; Nakata, 2012). Ο βαθμός ενυδάτωσης κατά τον σχηματισμό κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου *in vitro* φαίνεται να εξαρτάται από την σχετική αναλογία του οξαλικού οξέως - ιόντων Ca στο διάλυμα (Nakata, 2012; Webb, 1999; Frey-Wyssling, 1981). Η παρουσία κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου με μεγαλύτερο βαθμό ενυδάτωσης *in vivo* σχετίζεται με χαμηλές τιμές pH και ιξώδους του κυτταρικού χυμού (Metcalf, 1985).

Οι διαφορετικοί τρόποι κρυστάλλωσης και ενυδάτωσης, η ποικιλομορφία των ιστών και των κυττάρων στα οποία σχηματίζονται οι κρύσταλλοι του οξαλικού ασβεστίου καθώς και το πλήθος των χημικών ενώσεων που μπορούν να συμμετέχουν στην χημική τους σύσταση, δημιουργούν μια τεράστια ποικιλία μορφολογικών χαρακτηριστικών. Για την διευκόλυνση της μελέτης τους και για την ευχερέστερη συνεννόηση μεταξύ των ερευνητών που ασχολούνται με το θέμα, οι κρύσταλλοι του οξαλικού ασβεστίου κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες: (Arnott and Pautard, 1970; Metcalf, 1985; Horner and Wagner, 1995; Webb, 1999; Dickinson, 2000; Franceschi and Nakata, 2005; Peterson et al, 2008)

Ραφίδες: Επιμήκεις, λεπτοί και βελονοειδείς κρύσταλλοι συνήθως μονοϋδρικού οξαλικού ασβεστίου, με αιχμηρές απολήξεις. Συναθροίζονται σε δέσμες οι οποίες περιβάλλονται από μια βλενώδη μάζα, ενώ οι μεμονωμένοι κρύσταλλοι περιβάλλονται από μια μεμβράνη. Τα κύτταρα στα οποία σχηματίζονται οι ραφίδες είναι συνήθως μεγαλύτερα από τα γειτονικά τους και ευδιάκριτα. Η ύπαρξη ραφίδων είναι συνηθέστερη στα μονοκότυλα, ωστόσο, δημιουργούνται σε μεγάλους αριθμούς και σε ορισμένες οικογένειες δικότυλων όπως στις Balsaminaceae, Dilleniaceae και Rubiaceae.

Βελονοειδείς: Κρύσταλλοι όμοιοι των ραφίδων, αλλά μικρότερου μεγέθους, απαντώνται συνήθως μεμονωμένοι. Έχουν παρατηρηθεί στις οικογένειες Acanthaceae, Lauraceae και Myristicaceae.

Στυλοειδείς: Ευμεγέθεις κρύσταλλοι με μήκος τουλάχιστον τέσσερις φορές μεγαλύτερο από το πλάτος. Φλερουν οξύληκτα ή επίπεδα άκρα. Είναι σχετικά σπάνιοι και συνήθως μεμονωμένοι. Έχουν παρατηρηθεί στα φύλλα των Liliaceae και ορισμένων Iridaceae καθώς και στο δευτερογενές ξύλο ορισμένων ξυλωδών ειδών.

Βοτρυόμορφοι : Σύνθετοι κρύσταλλοι οι οποίοι αποτελούνται από πολυάριθμους πρισματοειδείς ή πυραμιδοειδείς κρυστάλλους χαλαρά συνδεδεμένων στο κέντρο και με προεξέχουσες γωνίες, με αποτέλεσμα ο κρύσταλλος να αποκτά ένα αστεροειδές σχήμα. Παρατηρούνται σε πολυάριθμες οικογένειες μονοκότυλων (π.χ. *Araceae*) και δικότυλων φυτών (*Polygiaceae*, *Leguminosae*, *Tiliaceae*, *Jungaladaceae*). Στη βιβλιογραφία ονομάζονται και δρούσες (*druse*).

Πρισματικοί: Ρομβοεδρικοί ή οκταεδρικοί κρύσταλλοι ποικίλου μεγέθους. Παρατηρούνται συνήθως στα παρεγχυματικά κύτταρα του δευτερογενούς ξύλου και ηθμού. Τα *Medicago truncatula* (*Fabaceae*) και *Pistacia palestina* (*Anacardiaceae*), αποτελούν αντιπροσωπευτικά είδη στα οποία απαντώνται κρύσταλλοι της κατηγορίας αυτής.

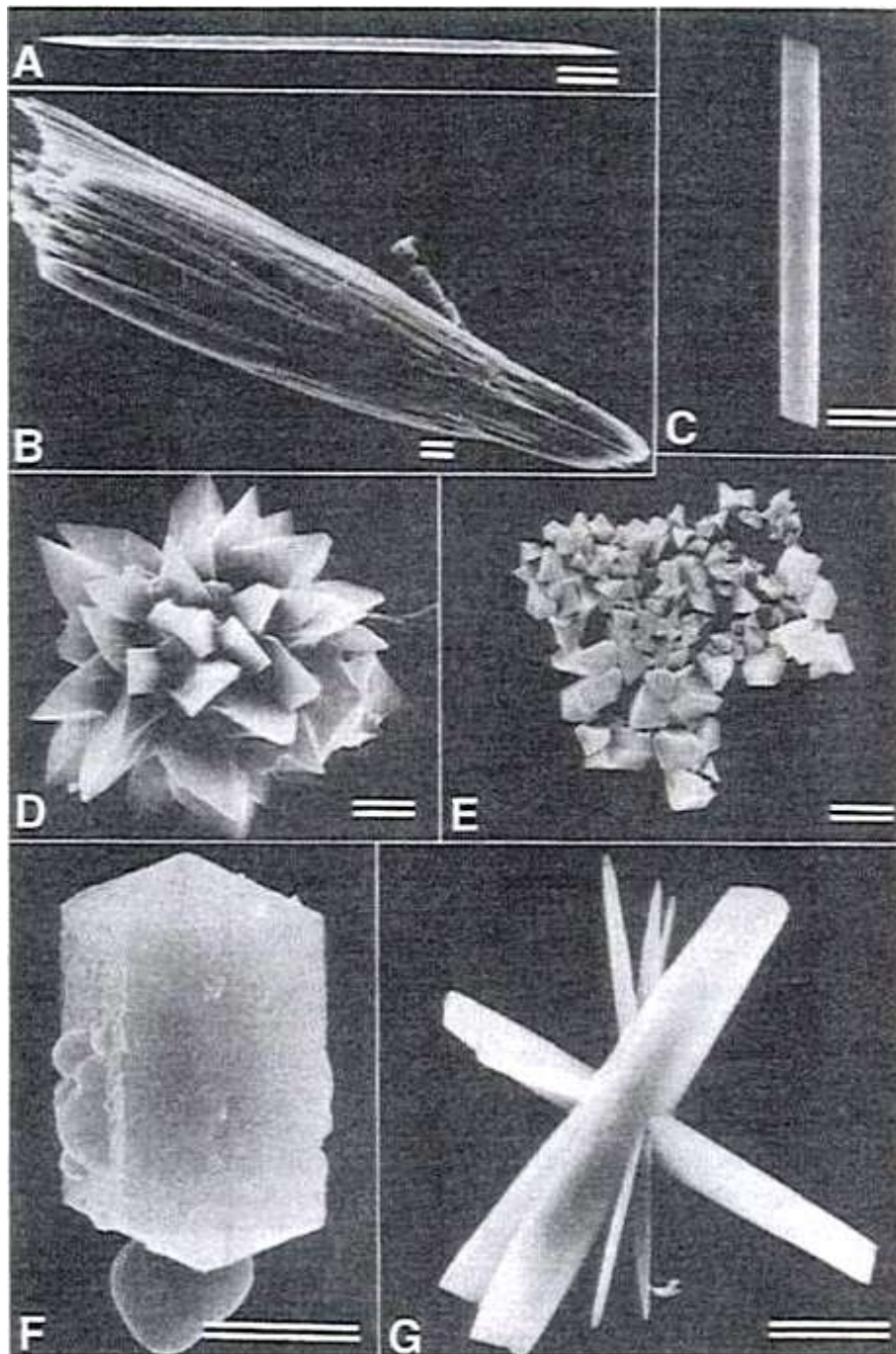
Κρυσταλλική άμμος: Πρόκειται για μια μάζα λεπτών συμπαγών μικροκρυστάλλων που είναι διεσπαρμένοι στα κύτταρα προσδίδοντας αμμώδη υφή. Οι μικροκρύσταλλοι που την απαρτίζουν είναι διαφόρων μορφών και μεγεθών. Τα *Acuba* (*Cornaceae*), *Amaranthus* (*Amaranthaceae*) και *Sambucus* (*Caprifoliaceae*), αποτελούν αντιπροσωπευτικά είδη στα οποία σχηματίζεται κρυσταλλική άμμος.

Σφαιρίτες: Κρύσταλλοι που απαρτίζουν ομάδες, με σχετικά λεία επιφάνεια. Στο μικροσκόπιο σε πολωμένο φως εμφανίζουν έναν μαύρο σταυρό στο κέντρο τους.

Η μορφή και ο εντοπισμός των κρυστάλλων του οξαλικού ασβεστίου αποτελούν γενετικά ελεγχόμενα χαρακτηριστικά. Ο σχηματισμός των κρυστάλλων δεν είναι τυχαίος αλλά περιλαμβάνει πολύπλοκες ενδοκυτταρικές διαδικασίες, γεγονός το οποίο υποδεικνύει πως ελέγχεται από πλήθος γενετικών τόπων (Webb, 1999; Nakata and McConn, 2000, Nakata and McConn, 2002; Monje and Baran, 2002; Nakata, 2012). Για τους λόγους αυτούς, η μορφολογία των κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου αξιοποιείται ως πρόσθετο ταξινομικό χαρακτηριστικό (Metcalf, 1985; Webb, 1999; Franceschi and Nakata, 2005).

Αντιθέτως, το μέγεθος των κρυστάλλων του οξαλικού ασβεστίου, αποτελεί μια παράμετρο που μεταβάλλεται τόσο μεταξύ των ειδών όσο και μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους, ακόμα και μεταξύ διαφορετικών ιστών του ίδιου φυτού. Το μέγεθός τους επηρεάζεται από μια σειρά παράγοντες όπως η θρεπτική κατάσταση των φυτικών οργάνων, η επάρκεια σε ασβέστιο, το είδος της αζωτούχου θρέψης (Raven and Smith, 1976; Metcalfe, 1985; Ahmed and Johnson, 2000; Palaniswamy et al, 2002; Palaniswamy et al, 2004; Zhang et al, 2005), η ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας και η θερμοκρασία

(Franceschi and Horner, 1980), η ώρα της ημέρας (Τουολάκου, 2006) και η ηλικία του οργάνου (Finley, 1999; Prychid et al, 2008).



Εικόνα 1.17 Μικροφωτογραφίες απομονωμένων κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου από SEM. **A και B)** μεμονωμένη ραφίδα και δέσμη ραφίδων από το φυτό *Psychotria punctata* (Rubiaceae), **C)** Στυλοειδής κρύσταλλος από το σπογγώδες παρέγχυμα των φύλλου του *Peperomia* sp. (Piperaceae), **D)** Βοτρυόμορφος κρύσταλλος από φύλλα του *Opuntia* (Cactaceae), **E)** Κρυσταλλική άμμος από μίσχους του *Nicotiana glauca* (Solanaceae), **F)** Πρισματικός κρύσταλλος από φύλλα του *Begonia* sp. (Begoniaceae) και **G)** Αστεροειδής κρύσταλλος από το σπογγώδες παρέγχυμα των φύλλων του *Peperomia* astrid. (Piperaceae). Σε όλες τις φωτογραφίες η κλίμακα αντιστοιχεί σε 5 μm.

Πηγή: Dickinson, W.C., 2000. *Integrative Plant Anatomy*. Academic Press.

1.3.1.1. Σχηματισμός Κρυστάλλων σε ιδιόβλαστα κύτταρα

1.3.1.1.1. Τα χαρακτηριστικά των ιδιοβλαστών

Τα ιδιόβλαστα κύτταρα ή ιδιοβλάστες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί διακινούν και αποθηκεύουν σημαντικές ποσότητες Ca^{+2} και παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση αφού φέρουν μεγάλο αριθμό εξειδικευμένων οργανιδίων και διαφορετικό περιεχόμενο σε σχέση με τα υπόλοιπα κύτταρα (Libert and Franceschi, 1987; Franceschi and Nakata, 2005; Nakata, 2012). Οι ιδιοβλάστες μπορούν να ομοιάζουν μορφολογικά με τα γειτονικά τους κύτταρα ή να διαθέτουν χαρακτηριστική μορφή (Foster, 1956; Metcalfe, 1985; Horner and Wagner, 1995; Webb, 1999).

Στα συνήθη χαρακτηριστικά των ιδιοβλαστών περιλαμβάνονται ο μεγεθυμένος πυρήνας, τα πολυάριθμα σωμάτια golgi και μιτοχόνδρια, το πυκνό ενδοπλασματικό δίκτυο, η ύπαρξη εξειδικευμένων πλαστιδίων, τα αυξημένα επίπεδα rRNA, η έντονη παρουσία μεμβρανών και κρυσταλλικών θαλάμων στο χυμοτόπιο, και η αυξημένη παρουσία μικροσωληνίσκων (Horner and Wagner, 1995; Webb, 1999; Kostman and Franceschi, 2000; Li et al, 2003; Franceschi and Nakata, 2005; Nakata, 2012).

Ενδοπλασματικό δίκτυο: Το πυκνό ενδοπλασματικό δίκτυο, ο μεγάλος αριθμός στοιχείων golgi και μιτοχονδρίων καθώς και το υψηλό επίπεδο rRNA υποδηλώνουν έντονη μεταβολική δραστηριότητα (Kostman and Franceschi, 2000; Franceschi and Nakata, 2005). Το πυκνό ενδοπλασματικό δίκτυο είναι αναγκαίο και για την ρύθμιση των υψηλών εισροών Ca που λαμβάνουν χώρα κατά την ανάπτυξη του κρυστάλλου του οξαλικού ασβεστίου (Franceschi et al, 1993; Kostman et al, 2003; Mazen et al, 2004). Επομένως είναι αναγκαία η ύπαρξη μηχανισμών που να επιτρέπουν την ταχεία δέσμευση των κατιόντων Ca^{+2} πριν αυτά σχηματίσουν αυθόρμητα ενώσεις με φωσφορικές ρίζες ή άλλα ανιόντα (Nakata, 2012). Σε έναν τέτοιο μηχανισμό συμμετέχει η πρωτεΐνη καλρετικουλίνη, η οποία εντοπίζεται σε συγκεκριμένες θέσεις στο lumen του ενδοπλασματικού δικτύου και έχει την ιδιότητα να δεσμεύει μεγάλες ποσότητες κατιόντων Ca^{+2} (Franceschi et al, 1993; Mazen et al, 2004; Kostman et al, 2003). Εκτός από τις θέσεις στις οποίες βρίσκεται η καλρετικουλίνη, Ca^{+2} δεσμεύεται και στα golgi και στα κυστίδια που σχετίζονται με αυτό. Πιθανολογείται πως μέσω των κυστιδίων αυτών πραγματοποιείται ένα μέρος της μεταφοράς του Ca^{+2} στο χυμοτόπιο όπου και σχηματίζεται ο κρύσταλλος του οξαλικού ασβεστίου (Kostman et al, 2003; Mazen et al, 2004).

Μεμβράνες και κρυσταλλικοί θάλαμοι: Εντοπίζονται στο χυμοτόπιο και συνδέονται άρρηκτα με τον σχηματισμό των κρυστάλλων. Πρόκειται για μακρομοριακές

δομές που φαίνεται να παίζουν ρόλο στον καθορισμό του σχήματος αλλά και του μεγέθους του κρυστάλλου (Arnott and Pautard, 1970; Horner and Wagner, 1995; Webb et al, 1995; Pennisi et al, 2001; Li et al, 2003). Συνήθως αποτελούνται από λιπίδια και πολυσακχαρίτες και συντίθενται *de novo* κατά τη διάρκεια σχηματισμού του κρυστάλλου και όχι ως διαπλάσεις του τονοπλάστη (Mazen et al, 2004; Nakata, 2012). Η μεταφορά του Ca από το χυμοτόπιο, διαμέσου των μεμβρανών των κρυσταλλικών θαλάμων, στο χώρο όπου σχηματίζεται ο κρυστάλλος εικάζεται πως πραγματοποιείται είτε με μαζική μεταφορά, είτε με τη λειτουργία ενεργειακά εξαρτώμενων μεταφορέων και καναλιών (Webb, 1999; Volk et al, 2004; Franceschi and Nakata, 2005).

Εντός των κρυσταλλικών θαλάμων εντοπίζεται συνήθως και μια, μη κρυσταλλικής φύσης, θεμελιώδης μάζα (crystal matrix) (Arnott and Pautard, 1970; Franceschi and Nakata, 2005), στην οποία εντοπίζονται πρωτεΐνες οι οποίες έχουν την δυνατότητα να δεσμεύουν το Ca και εικάζεται πως συμβάλλουν στον σχηματισμό του κρυστάλλου. Η παρουσία ορισμένων από αυτές φαίνεται πως ευνοεί την δημιουργία των κρυστάλλων εντός των κρυσταλλικών θαλάμων (Webb et al, 1995; Bouropoulos et al, 2001; Li et al, 2003; Klanrit and Webb, 2006), ενώ άλλων την παρεμποδίζουν (Jáuregui-Zúñiga et al, 2005).

Πλαστίδια: Στους περισσότερους ιδιοβλάστες έχει παρατηρηθεί η ύπαρξη πλαστιδίων που ονομάζονται κρυσταλλοπλαστίδια (Arnott and Pautard, 1970), τα οποία στερούνται θυλακοειδών και Rubisco, και ως εκ τούτου δεν είναι φωτοσυνθετικά ενεργά (Li and Franceschi, 1990). Εικάζεται πως αποτελούν τον υποκυτταρικό χώρο στον οποίο συντίθενται τα λιπίδια τα οποία είναι αναγκαία για την δημιουργία των μεμβρανικών σχηματισμών του ιδιοβλάστη ή τον χώρο στον οποίο συντίθεται το οξαλικό οξύ που είναι αναγκαίο για τον σχηματισμό του κρυστάλλου του οξαλικού ασβεστίου (Franceschi and Nakata, 2005).

Μικροσωληνίσκοι: Οι περισσότεροι ιδιοβλάστες αυξάνουν σημαντικά το μέγεθός τους κατά τη διάρκεια σχηματισμού των κρυστάλλων. Η στενή σύνδεση των δύο αυτών διεργασιών υποδηλώνει πως η βιοσύνθεση του οξαλικού οξέως, η συσσώρευση του Ca, ο σχηματισμός του κρυστάλλου και η αύξηση του μεγέθους του κυττάρου αποτελούν απόλυτα συγχρονισμένες διαδικασίες (Kostman and Franceschi, 2000; Franceschi and Nakata, 2005; Nakata, 2012). Ειδικά στους ιδιοβλάστες που σχηματίζουν ραφίδες ή στυλοειδείς κρυστάλλους, φαίνεται πως σημαντικό ρόλο τόσο στην επιμήκυνση των κυττάρων όσο και στον σχηματισμό των κρυστάλλων παίζουν κυττοσκελετικά στοιχεία όπως οι μικροσωληνίσκοι (Horner and Wagner, 1995). Στους ιδιοβλάστες που

σχηματίζουν ραφίδες στο φυτό *Pistia stratiotes* οικ. Araceae, παρατηρήθηκε ένα δίκτυο μικροσωληνίσκων το οποίο περιορίζει την κατά διάμετρο ανάπτυξη του κυττάρου αλλά όχι και την κατά μήκος. Η χρήση κολχικίνης επιτρέπει τον σχηματισμό ραφίδων, οι οποίες, ωστόσο, δεν φτάνουν το κανονικό τους μήκος (Kostman and Franceschi, 2000). Έχει διαπιστωθεί πως ο σχηματισμός του κρυστάλλου σταματά όταν οι ιδιοβλάστες αποκτήσουν συγκεκριμένο μέγεθος. Διαφορετικά οι κρύσταλλοι θα διαρρήγνυαν τον τονοπλάστη με αποτέλεσμα τον θάνατο του ιδιοβλάστη (Volk et al, 2004; Franceschi and Nakata, 2005)

1.3.1.1.2. Η βιοσύνθεση του οξαλικού οξέως

Το οξαλικό οξύ, αναγκαίο για τον σχηματισμό κρυστάλλων στους ιδιοβλάστες, είναι δυνατόν να παράγεται από περισσότερες της μίας μεταβολικές οδούς (Franceschi and Loweus, 1995). Η βιοσύνθεση μπορεί να περιλαμβάνει την οξειδωση του γλυκολικού και του γλυοξυλικού οξέως με τη δράση του ενζύμου γλυκολική οξειδάση είτε με την δράση του ενζύμου γαλακτική αφυδρογονάση που δρα ως δεσμουτάση του γλυοξυλικού (Richardson and Tolbert, 1961; Seal and Sen, 1970; Libert and Franceschi, 1987). Τα πιθανά αυτά υποστρώματα αποτελούν και μεταβολίτες της φωτοαναπνοής, η γλυκολική οξειδάση εντοπίζεται στα υπεροξυσώματα και βρίσκεται σε αφθονία στους πράσινους ιστούς και η γαλακτική αφυδρογονάση στο κυτταρόπλασμα (Davies and Asker, 1983; Franceschi and Nakata, 2005). Σχηματισμός οξαλικού θα μπορούσε επίσης να πραγματοποιηθεί μέσω της διάσπασης του ισοκιτρικού οξέως σε γλυοξυλικό και ηλεκτρικό οξύ με τη δράση του ενζύμου ισοκιτρική λυάση. Το ένζυμο αυτό εντοπίζεται στα γλυοξυσώματα και συμμετέχει στον κύκλο του γλυοξυλικού. Εικάζεται, ωστόσο, πως το συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι λαμβάνει χώρα μόνο στα πρώτα στάδια του φυτρώματος των πλούσιων σε έλαια σπόρων (Pinzauti et al, 1986; Libert and Franceschi, 1987). Οξαλικό οξύ μπορεί να σχηματιστεί επίσης μέσω της ενζυμικής διάσπασης του οξαλοξικού οξέως σε οξαλικό και οξικό οξύ. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση αυτή δεν είναι γνωστό, αλλά ενδεχομένως να πρόκειται για την οξαλοξική ακετυλ-υδρολάση, ένα ένζυμο που έχει εντοπιστεί σε μύκητες που εκκρίνουν οξαλικό οξύ (Chang and Beevers, 1968; Libert and Franceschi, 1987; Kubicek et al, 1988; Han et al, 2007). Ένα άλλο πρόδρομο μόριο για τη βιοσύνθεση του οξαλικού οξέως εικάζεται πως είναι το L-ασκορβικό οξύ. Πειράματα με ραδιενεργή σήμανση με ^{14}C έδειξαν πως το οξαλικό προκύπτει από το L-ασκορβικό με διάσπαση του δεσμού μεταξύ του C2/C3. Ωστόσο, τα

ένζυμα του μονοπατιού αυτού παραμένουν άγνωστα (Loweus, 1999; Keates et al, 1999; Kostman et al, 2001; Smirnoff et al, 2001; DeBolt et al, 2004).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, το οξαλικό οξύ μπορεί να προέρχεται από μια σειρά πρόδρομων μορίων, εκ των οποίων πιθανότερο θεωρείται το ασκορβικό οξύ, το οποίο απαντάται σε όλους τους ιστούς σε συγκεντρώσεις υψηλότερες εκείνων των υπολοίπων πρόδρομων μορίων (Kostman et al, 2001; Franceschi and Nakata, 2005, Nakata 2012). Το μονοπάτι του γλυκολικού και γλυοξυλικού οξέως ενδεχομένως να λειτουργεί σε φυτά με C3 φωτοσύνθεση όμως δεν δικαιολογεί την παρουσία κρυστάλλων σε C4 φυτά καθώς και σε ιστούς που δεν φωτοσυνθέτουν. Επίσης, πειράματα με ραδιενεργή σήμανση με ^{18}O έδειξαν πως ακόμα και σε ορισμένα C3 φυτά το οξαλικό των κρυστάλλων δεν σημάνθηκε, γεγονός που δηλώνει πως οι μεταβολίτες της φωτοαναπνοής δεν συμμετέχουν στο σχηματισμό του κρυστάλλου (Raven et al, 1982). Επίσης, στα μιτοχόνδρια των ιδιοβλαστών ορισμένων φυτών που σχηματίζουν ραφίδες εντοπίζεται το ένζυμο αφυδρογονάση της L-γαλακτόνο-γ-λακτόνης, το οποίο καταλύει την τελευταία αντίδραση του μονοπατιού της βιοσύνθεσης του ασκορβικού οξέως στα φυτά, ενώ απουσιάζει η οξειδάση του γλυκολικού (Li and Franceschi, 1990; Kostman and Koscher, 2003). Πρόσθετη ένδειξη της σημαντικότητας του ασκορβικού στον σχηματισμό του οξαλικού αποτελεί το γεγονός η προσθήκη ασκορβικού σε θρεπτικό διάλυμα σε υδροπονία προωθεί τον σχηματισμό κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου (Franceschi and Nakata, 2005). Τα άλλα δύο μονοπάτια, του ισοκιτρικού και του οξαλοξυλικού, έχουν εντοπιστεί σε μικρό αριθμό ειδών και η συμμετοχή τους στο σχηματισμό του οξαλικού οξέως θεωρείται από ορισμένους μη σημαντική (Franceschi and Nakata, 2005). Ωστόσο, πρόσφατα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι σε ορισμένα φυτά όπως το ρύζι, πρωταρχικής σημασίας πρόδρομη ένωση είναι το γλυοξυλικό οξύ. Υποστηρίζεται επίσης ότι η παραγωγή αυτού του οξέως είναι ανεξάρτητη της φωτοαναπνοής και ότι πραγματοποιείται μέσω μιας αναπληρωματικής αντίδρασης (Yu et al, 2010).

Ως πιθανά υποκυτταρικά διαμερίσματα βιοσύνθεσης του οξαλικού θεωρούνται το είτε το χυμοτόπιο είτε το κυτταρόπλασμα. Λόγω του ότι το οξαλικό οξύ αποτελεί ισχυρό δικαρβοξυλικό οξύ και χηλική ένωση που δεσμεύει ιόντα Ca, η μεγάλης κλίμακας μεταφορά του από διπλανά κύτταρα του ιδιοβλάστη θεωρείται απίθανη, παρόλο που υπάρχουν πλασμοδεσμοί μεταξύ αυτών των κυττάρων και του ιδιοβλάστη (Li and Franceschi, 1990), ωστόσο έχει διαπιστωθεί μεταφορά του από τη ρίζα μέσω του διαπνευστικού ρεύματος (Τσουλάκου, 2013).

1.3.1.1.3. Η συνολική εικόνα του σχηματισμού των κρυστάλλων στους ιδιοβλάστες

Ο σχηματισμός ενός κρυστάλλου οξαλικού ασβεστίου απαιτεί τον συγχρονισμό ενός αριθμού σταδίων, τα οποία περιλαμβάνουν την πρόσληψη του Ca από τον αποπλάστη, την μεταφορά του από το κυτταρόπλασμα στο χυμοτόπιο και εν συνεχεία στον κρυσταλλικό θάλαμο, την βιοσύνθεση ή μεταφορά του οξαλικού οξέως στο κυτταρόπλασμα και την μεταφορά του στο χυμοτόπιο και στον κρυσταλλικό θάλαμο, και την ανάπτυξη του κυττάρου.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η μεταφορά του Ca από τον τονοπλάστη στο κυτταρόπλασμα πραγματοποιείται με την λειτουργία καναλιών ασβεστίου (Volk et al, 2004; Franceschi and Nakata, 2005). Όταν το Ca εισάγεται στον ιδιοβλάστη, είναι αναγκαία η ταχεία ρύθμιση της συγκέντρωσής του του ώστε να μη διαταραχτεί η ομοιόσταση του κυττάρου. Στη ρύθμιση αυτή συμβάλλουν η παρουσία πλούσιου ενδοπλασματικού δικτύου και η ταχεία διακίνηση του Ca στο lumen του μέσω Ca ATPασών. Στο lumen το Ca συνδέεται με πρωτεΐνες υψηλού βαθμού δέσμευσης του Ca όπως οι καλρετικουλίνες (Franceschi et al, 1993; Nakata et al, 2003; Franceschi and Nakata, 2005). Ένα μέρος του ασβεστίου μεταφέρεται από το κυτταρόπλασμα στο χυμοτόπιο με άμεση μεταφορά του, ενώ ένα άλλο μέρος μεταφέρεται εντός κυστιδίων συνδεδεμένο με τις πρωτεΐνες της θεμελιώδους μάζας του κρυσταλλικού θαλάμου (Webb et al, 1995; Li et al, 2003; Mazen et al, 2004). Από το χυμοτόπιο το Ca μεταφέρεται εντός των κρυσταλλικών θαλάμων είτε με μαζική ροή είτε μέσω της λειτουργίας μεταφορέων (Franceschi and Nakata, 2005).

Παράλληλα, πραγματοποιείται η βιοσύνθεση του οξαλικού οξέως στο κυτταρόπλασμα και η μεταφορά του στο χυμοτόπιο πιθανότατα με την λειτουργία μεταφορέων των δικαρβοξυλικών οξέων ή του οξαλικού. Εν συνεχεία, η μεταφορά του από το χυμοτόπιο στον κρυσταλλικό θάλαμο φαίνεται να ακολουθεί τα πρότυπα του Ca (Franceschi and Nakata, 2005). Σημειώνεται πως η βιοσύνθεση του οξαλικού επάγεται από την διαθεσιμότητα του Ca έτσι ώστε να μη παράγεται σε συγκεντρώσεις ικανές να διαταράξουν την κυτταρική λειτουργία (Keates et al, 2000).

Ταυτόχρονα με τις παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιείται και η διάταση του κυττάρου, η οποία ρυθμίζεται από την ύπαρξη δικτύου μικροσωληνίσκων (Kostman and Franceschi, 2000).

1.3.1.2. Πιθανή φυσιολογική σημασία των κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου

Τόσο η ποικιλία μορφών και μεγεθών των κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου, όσο και η έντονη παρουσία και κατανομή τους σε πολυάριθμους ιστούς έχουν δώσει βάση για την διατύπωση πολλών θεωριών σχετικά με τον φυσιολογικό του ρόλο και τη λειτουργία τους. Οι ρόλοι που τους έχουν αποδοθεί έως τώρα συμπεριλαμβάνουν την αποθήκευση και ρύθμιση των ιόντων Ca, την ισορροπία καλίου και ασβεστίου, την φυτοπροστασία, την στήριξη των ιστών, την αποτοξίνωση βαρέων μετάλλων καθώς ακόμα και την τροποποίηση των οπτικών ιδιοτήτων των φύλλων (Franceschi and Nakata, 2005; Nakata, 2012). Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις, οι διατυπωμένοι αυτοί ρόλοι αφορούν σε υποθέσεις και δεν στηρίζονται σε πειραματικά αποτελέσματα.

1.3.1.2.1. Αποθήκευση και ρύθμιση κατιόντων ασβεστίου

Τα αποτελέσματα πολλών διαφορετικών ερευνών συνηγορούν στο ότι οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου λειτουργούν ως αποθήκες κατιόντων ασβεστίου και κατά συνέπεια συμβάλλουν στη ρύθμιση της συγκέντρωσής τους στους φυτικούς ιστούς (Franceschi and Horner, 1980; Dickinson, 2000; Kostman and Franceschi, 2000; Zindler-Frank et al, 2001; Parsan et al, 2001; Volk et al, 2002; Mazen et al, 2003; Franceschi and Nakata, 2005; Nakata, 2012). Επίσης, παρ' ότι έχει αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία πως οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου αποτελούν τελικό προϊόν του μεταβολισμού (Zindler-Frank et al, 2001; Nakata, 2003; Franceschi and Nakata, 2005), σε ορισμένους ιστούς μπορεί να αποδομηθούν κάτω από ορισμένες συνθήκες. Ωστόσο, η αποδόμηση αυτή έχει συσχετιστεί με τη διαχείριση των αποθεμάτων ασβεστίου (Parslan et al, 2001). Η συσχέτιση αυτή επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι το μέγεθος των κρυστάλλων στους ιδιοβλάστες του υδροχαρούς φυτού *Pistia stratiotes* οικ. Araceae αυξομειώνεται ανάλογα με τη διαθεσιμότητα του Ca στο θρεπτικό διάλυμα (Volk et al, 2002). Ωστόσο, όταν μεταλλαγμένα φυτά του *Medicago truncatula*, που δεν είχαν την δυνατότητα σχηματισμού κρυστάλλων, αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα παρουσία Ca, δεν παρουσίασαν διαφορά στον ρυθμό ανάπτυξης και στη μορφολογία τους σε σχέση με τα φυτά που σχημάτισαν κανονικά κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου. Είναι πιθανό επομένως ότι τα φυτά αυτά ενδεχομένως διαθέτουν πρόσθετους μηχανισμούς απορρόφησης και ρύθμισης των ιόντων Ca^{+2} προκειμένου να αντισταθμίσουν την έλλειψη δυνατότητας σχηματισμού κρυστάλλων (Nakata and McConn, 2000; Nakata and McConn, 2003), ή οι κρύσταλλοι δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων Ca.

1.3.1.2.2. Φυτοπροστασία

Οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου θεωρείται ότι αποτελούν ένα θεμελιώδη μηχανισμό προστασίας έναντι φυτοφάγων ζώων. Η δράση τους εκφράζεται κατά κύριο λόγο μέσω τριών μηχανισμών: α) με το μηχανικό τραυματισμό των φυτοφάγων ζώων (πρόκληση βλαβών σε δόντια και μαλακούς ιστούς του στόματος αλλά και στο σώμα, β) με την απόδοση δυσάρεστης γεύσης στους φυτικούς ιστούς, και γ) με την πρόκληση βλαβών στα νεφρά (νεφρολιθίαση) (Ward et al, 1997; Finley, 1999; Lucas et al, 2000; Molano-Flores, 2001; Ruiz et al, 2002).

Η αρνητική επίδραση του οξαλικού ασβεστίου στα νεφρά αποτελεί πρόβλημα και για τον άνθρωπο, αφού πολλά από τα καλλιεργούμενα είδη (π.χ. *Amaranthus spp.*, *Beta vulgaris*, *Spinacia oleracea*, *Portulaca oleracea* κλπ.) περιέχουν μεγάλες ποσότητες κρυστάλλων. Συνήθως λίθοι στα νεφρά σχηματίζονται μετά από μακροχρόνια κατανάλωση φυτικών ειδών που τους περιέχουν, ωστόσο, έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις οξείας δηλητηρίασης και νεφρικής ανεπάρκειας όπως για παράδειγμα μετά από κατανάλωση χυμών από το φρούτο Καραμπόλα (*Averrhoa carambola*) ή από κατανάλωση ραβεντίου (*Rheum rhabonticum*) (Knight and Walter, 2001; Massey, 2003; Siener et al, 2006; Neto et al, 2009; Albersmeyer et al, 2012). Για την αποφυγή των προβλημάτων αυτών, γίνεται προσπάθεια παραγωγής γενετικά τροποποιημένων φυτών που δεν παράγουν κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου (Nakata and McConn, 2000; Nakata and McConn, 2003; Nakata, 2012). Μάλιστα, έχει υπολογιστεί πως το Ca των φυτών που δεν φέρουν κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου είναι περισσότερο εύκολα απορροφήσιμο από τον ανθρώπινο οργανισμό σε σχέση με αυτό από φυτά που σχηματίζουν κρυστάλλους (Nakata, 2012).

Έχει δειχτεί επίσης ότι οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου ορισμένων φυτικών ειδών παρουσιάζουν φυτοπροστατευτική δράση και έναντι μασητικών εντόμων (Doege, 2003; Hudgins et al, 2003; Korth et al, 2006; Prychid et al, 2008), όχι όμως και έναντι των μυζητικών όπως οι αφίδες (Korth et al, 2006).

Εικάζεται επίσης πως η παρουσία και η συσσώρευση πρωτεϊνών σχετικών με την παθογένεση στα οποία περιλαμβάνεται και η οξαλική οξειδάση (ένζυμο το οποίο καταλύει την οξειδωση του οξαλικού οξέως σε CO₂ και H₂O₂) στους ιδιοβλάστες του καπνού, του φυτού *Pistia stratiotes* και σε φύλλα κριθαριού που έχουν προσβληθεί από οίδιο (Dixon et al, 1991; Zhou et al, 1998; Volk et al, 2002; Svedružić et al, 2005) αποτελεί ένδειξη για την προστατευτική δράση των κρυστάλλων και απέναντι σε ορισμένους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς.

1.3.1.2.3. Αποτοξίνωση βαρέων μετάλλων

Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου συμβάλλουν στην διαχείριση και αδρανοποίηση των τοξικών βαρέων μετάλλων καθώς επίσης και του αργιλίου. Ειδικότερα, σε ορισμένα είδη φυτών που αναπτύχθηκαν παρουσία βαρέων μετάλλων (Cd, St, Pb, Cu, Zn, Hg) καθώς και παρουσία Al, Mg και S, ανιχνεύθηκαν ποσότητες των στοιχείων αυτών στους κρυστάλλους του οξαλικού ασβεστίου. Ενδεχομένως, τα κατιόντα των βαρέων μετάλλων αδρανοποιούνται στους κρυστάλλους μέσω του ίδιου μηχανισμού μέσω του οποίου αδρανοποιείται το πλεονάζον Ca (Zindler-Frank, 1991; Mazen and Maghraby, 1997; Ma et al, 1998; Ma et al, 2001; Choi et al, 2001; Mazen, 2004; He et al, 2012; Faheed et al, 2013; Khan and Siddiqi, 2014). Έχει, ωστόσο, παρατηρηθεί πως στο *Phaseolus vulgaris* ο αριθμός και το μέγεθος των κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου μειώνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των βαρέων μετάλλων (Cd και St) στο θρεπτικό διάλυμα. Στην περίπτωση αυτή ενδεχομένως η αύξηση της συγκέντρωσής τους στους ιστούς του φυτού επηρεάζει αρνητικά τους βιοχημικούς μηχανισμούς σχηματισμού των κρυστάλλων (Zindler-Frank, 1991; Jáuregui-Zúñiga et al, 2005)

1.3.1.2.4. Άλλοι ρόλοι

Ένας άλλος φυσιολογικός ρόλος που έχει αποδοθεί στον σχηματισμό κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου είναι αυτός της αδρανοποίησης του οξαλικού οξέως, το οποίο παρουσιάζει ισχυρά όξινο χαρακτήρα και θεωρείται τοξικό (Franceschi and Horner, 1980; Franceschi and Nakata, 2005). Ο σχηματισμός οξαλικού ασβεστίου θεωρείται επίσης ότι αποτελεί μηχανισμό ωσμωρύθμισης (Raven and Smith, 1976). Ωστόσο, σύμφωνα με τους Zindler-Frank et al (2001), το οξαλικό οξύ στα φύλλα του *Phaseolus vulgaris* αυξάνεται αυξανόμενου του διαθέσιμου Ca στο θρεπτικό διάλυμα, γεγονός που σημαίνει πως η συσσώρευση Ca στους ιδιοβλάστες προηγείται αυτής του οξαλικού.

Τέλος, οι κρύσταλλοι του οξαλικού ασβεστίου είναι διπλοθλαστικοί. Στο φυτό *Peperomia glabella*, εικάζεται πως η ιδιότητά τους αυτή, να προκαλούν διπλή διάθλαση του φωτός, σε συνδυασμό με τη μορφή τους καθώς και με τη θέση τους, συμβάλλει στην αποτελεσματικότερη διάδοση της ακτινοβολίας εντός του φωτοσυνθετικού παρεγχύματος, ευνοώντας κατ' αυτό τον τρόπο την φωτοσύνθεση (Kuo-Huang et al, 2007; Horner, 2012).

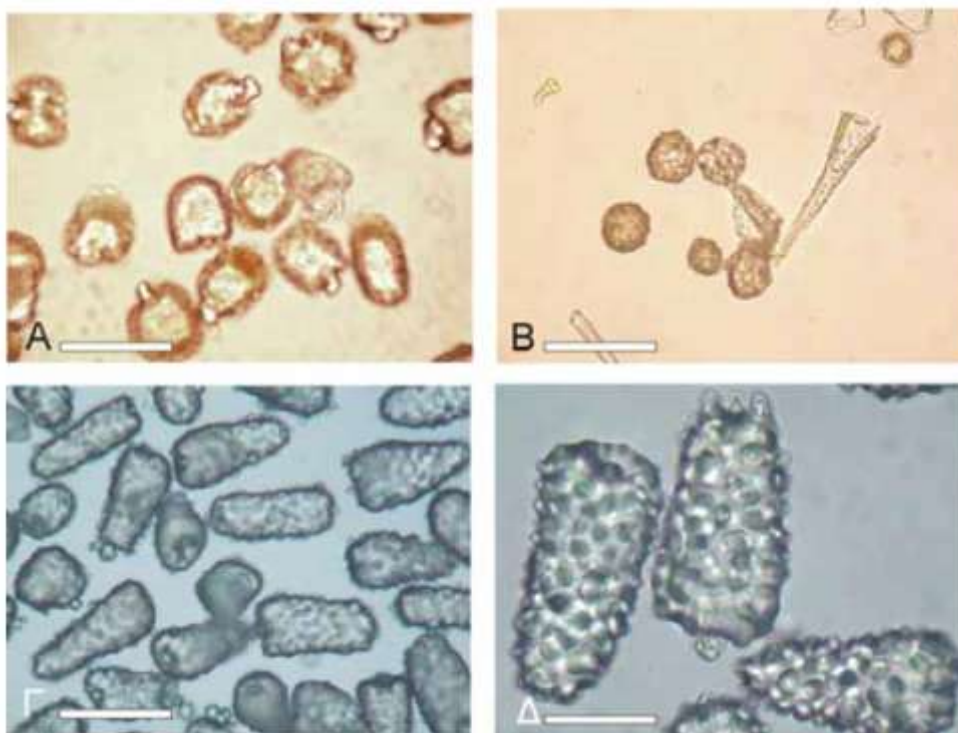
1.3.2. Άμορφο ανθρακικό ασβέστιο (κυστόλιθοι)

Σε μέλη ορισμένων φυτικών οικογενειών παρατηρείται η εναπόθεση άμορφου ανθρακικού ασβεστίου, είτε στα κυτταρικά τοιχώματα των επιδερμικών κυττάρων¹ είτε σε εξειδικευμένα κύτταρα που ονομάζονται λιθοκύστες. Οι λιθοκύστες αποτελούν ογκώδη ιδιόβλαστα κύτταρα στα οποία πραγματοποιείται η εναπόθεση του ανθρακικού ασβεστίου με τη μορφή κυστόλιθων. Συνήθως παρατηρούνται στην επιδερμίδα και των δύο επιφανειών των φύλλων αλλά και σε παρεγχυματικά κύτταρα του ξύλου και του ηθμού μελών των οικογενειών Moraceae, Urticaceae, Acanthaceae, Cucurbitaceae και Cannabaceae. Ορισμένα είδη των οικογενειών αυτών παρουσιάζουν γεωργικό ενδιαφέρον, όπως η συκιά (*Ficus carica*), η μουριά (*Morus alba*), το περδικάκι (*Parietaria judaica*), καλωπιστικοί θάμνοι (*Ficus sp.*) κ.α. (Haberlandt, 1914; Metcalfe, 1985; Fahn, 1990; Dickinson, 2000). Το κυτταρόπλασμα των λιθοκύστεων παρουσιάζει ομοιότητες με εκείνο των επιδερμικών κυττάρων, ωστόσο, περιέχει μεγαλύτερο αριθμό στοιχείων golgi καθώς και μιτοχονδρίων γεγονός το οποίο αποτελεί ένδειξη έντονης μεταβολικής δραστηριότητας, όπως και στην περίπτωση των ιδιόβλαστων κυττάρων που σχηματίζουν κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου (Jani and Rudrappa, 2014).

Οι κυστόλιθοι αποτελούν συμπαγείς αποθέσεις ανθρακικού ασβεστίου. Στηρίζονται σε μια εσωτερική απόφυση του κυτταρικού τοιχώματος (μίσχο) που προβάλλει στο εσωτερικό του κυττάρου. Ο μίσχος αποτελείται από κυτταρίνη, πάνω στην οποία αποτίθεται το ανθρακικό ασβέστιο. Η μορφή των κυστόλιθων μπορεί να είναι βοτρυόμορφη, σφαιρική, βακιλλόμορφη ή ατρακτοειδής (Welle, 1980; Fahn, 1990; Dickinson, 2000). Σύμφωνα με σχετικά πρόσφατες έρευνες, οι κυστόλιθοι σχηματίζονται σε 4 φάσεις και κατά συνέπεια αποτελούνται από 4 ανόργανες ζώνες με διαφορετική σύσταση και θερμοδυναμική σταθερότητα. Κατά την πρώτη φάση στο μίσχο αποτίθεται SiO₂ σε συνδυασμό με μικρό αριθμό κατιόντων Mg. Στη δεύτερη φάση συνεχίζεται η εναπόθεση SiO₂ ενώ αυξάνεται η παρουσία κατιόντων Mg. Στη συνέχεια, κατά την τρίτη φάση, εναποτίθεται CaCO₃ και σχηματίζεται ένας σχετικά σταθερός πυρήνας του άλατος. Στην τέταρτη φάση εναποτίθεται μια πιο ασταθής στρώση ανθρακικού ασβεστίου που

¹ Σε ορισμένα είδη το κυτταρικό τοίχωμα των επιδερμικών κυττάρων διογκώνεται εσωτερικά σχηματίζοντας μια δομή που ονομάζεται ασκός του κυτταρικού τοιχώματος ο οποίος προοδευτικά καταλαμβάνει ολόκληρο τον αποπλαστικό χώρο του κυττάρου. Εντός αυτού σχηματίζονται κυτταρινικές μεμβράνες οι οποίες αποτελούν τις εστίες συσσώρευσης Ca⁺². Στην περιφέρεια των ιδιοβλαστών σχηματίζεται μεγάλος αριθμός μικρών σφαιρικών αθροισμάτων που εμπεριέχουν Ca⁺², ενώ στην κεντρική περιοχή τα αθροίσματα είναι μεγαλύτερα και πιο πυκνά συγκεντρωμένα. Σε κάθε ιδιοβλάστη μπορούν να συσσωρευτούν έως 48 ng Ca (Nitta et al, 2006; Lin et al, 2004; Bercu, 2009).

αποτελεί τον μανδύα. Παρότι το πυρίτιο δε συγκαταλέγεται στα απαραίτητα ανόργανα στοιχεία, στην περίπτωση των λιθοκύστεων η απουσία του προκαλεί αδυναμία σχηματισμού τους. Υπάρχουν δύο απόψεις για τον τον ρόλο που επιτελεί το πυρίτιο: Σύμφωνα με την πρώτη, το SiO₂ λειτουργεί ως άγκυρα για τα κατιόντα μαγνησίου τα οποία με την σειρά τους αποτελούν τους πυρήνες συσσώρευσης του ανθρακικού ασβεστίου. Σύμφωνα με τη δεύτερη άποψη, το SiO₂ είναι βιοχημικά ανενεργό αλλά οριοθετεί και περιορίζει τον χώρο στον οποίο συσσωρεύεται το ανθρακικό ασβέστιο ευνοώντας την ορυκτοποίησή του (Gal et al, 2012).



Εικόνα 1.18 Απομονωμένοι κυστόλιθοι *M. alba* (Α) (σφαιρικοί), *F. carica* (Β) (σφαιρικοί) και *F. nitida* (Γ και Δ) (βοτρυόμορφοι). Οι εικόνες έχουν ληφθεί σε κοινό οπτικό μικροσκόπιο σε πεδίο διερχόμενου φωτός (Α και Β) ή σε πεδίο πολωμένου φωτός (Γ και Δ). Η μπάρα αντιπροσωπεύει 50 μm (Α,Β,Γ) και 25 μm (Δ).

Πηγή: Λουρίδα, Β. 2005. Πιθανοί φυσιολογικοί ρόλοι των λιθοκύστεων σε αντιπροσωπευτικά είδη. Γ.Π.Α.

Το μέγεθος και η πυκνότητα των κυστόλιθων μεταβάλλεται ανάλογα με την ηλικία του φύλλου. Στα νεαρά φύλλα της μουριάς παρουσιάζουν υψηλή πυκνότητα η οποία μειώνεται προοδευτικά λόγω της αύξησης της φυλλικής επιφάνειας, η οποία δε συνοδεύεται και από αντίστοιχη αύξηση του αριθμού των κυστόλιθων. Επίσης, στα νεαρά φύλλα παρατηρούνται λιθοκύστες με μικρούς ή ανύπαρκτους κυστόλιθους, ενώ σε ώριμα φύλλα οι κυστόλιθοι είναι ογκώδεις και μπορεί να καταλαμβάνουν ολόκληρη την λιθοκύστη. Η προοδευτική αύξηση του μεγέθους του κυστόλιθου όταν αυξάνεται η

ηλικία του φύλλου οφείλεται στη σταδιακή εναπόθεση Ca στους αναπτυσσόμενους κυστόλιθους (Fahn, 1990; Sugimura et al, 1999).

Στα ώριμα φύλλα ορισμένων ειδών, το μέγεθος των κυστόλιθων είναι ανάλογο με την συγκέντρωση του Ca στο έδαφος/θρεπτικό διάλυμα (Wu et al, 2006; Adamski and Coelho, 2008). Κυστόλιθοι μικρού μεγέθους σχηματίζονται ακόμα και σε συνθήκες πλήρους έλλειψης Ca στο θρεπτικό διάλυμα, ενώ θετική επίδραση φαίνεται να έχει και ο επαρκής φωτισμός αφού παρατεταμένη σκίαση παρεμποδίζει την ανάπτυξη κυστόλιθων σε νεαρά φυτά (Metcalf and Chalk, 1985; Γκιάφη, 2003). Το μέγεθος του κυστόλιθου φαίνεται επίσης να αυξάνεται ανάλογα με την συγκέντρωση του CO₂ στην ατμόσφαιρα (Freisleben, 1930; Γκιάφη, 2003; Λουρίδα, 2005). Ωστόσο, το CO₂ της ατμόσφαιρας δε φαίνεται να συνδέεται άμεσα με τον σχηματισμό των κυστόλιθων αφού σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, το δ ¹³C των κυστόλιθων στο περδικάκι είναι λιγότερο αρνητικό από αυτό της βιομάζας γεγονός που υποδηλώνει πως ο άνθρακας των κυστόλιθων δεν προέρχεται από προϊόντα της φωτοσύνθεσης αλλά πιθανολογείται ότι προέρχεται, είτε από τη ρίζα, είτε από την αναπνοή (Ρέππα, 2012). Τέλος, όπως και οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου, έτσι και οι κυστόλιθοι παρουσιάζουν ημερονύκτια διακύμανση του μεγέθους τους (Λουρίδα, 2005)

Όσον αφορά στους φυσιολογικούς ρόλους των λιθοκύστεων, η ανυπαρξία πειραματικών δεδομένων οδηγεί στην υπόθεση ότι είναι αντίστοιχοι με αυτούς των κρυστάλλων του οξαλικού ασβεστίου. Ειδικότερα, θεωρείται πως οι κυστόλιθοι συντελούν στην αποθήκευση και τη ρύθμιση των κατιόντων Ca καθώς και τον ανθρακικών ανιόντων (Haberlandt, 1914; Freisleben, 1933; Metcalfe and Chalk, 1985; Wu et al, 2006; Admaski and Coelho, 2008). Ο τελευταίος μάλιστα ερευνητής είχε καταλήξει ήδη πριν από έναν αιώνα στο συμπέρασμα πως οι κυστόλιθοι δεν αποτελούν στατικές δομές αλλά απλά αποθήκες των οποίων τα περιεχόμενα μπορούν να επανεισέλθουν στο μεταβολικό κύκλο. Οι κυστόλιθοι στα φύλλα της μουριάς θεωρείται πως παρέχουν σε κάποιο βαθμό φυτοπροστατευτικό ρόλο. Στην εξωτερική επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος των λιθοκύστεων σχηματίζεται μια θηλή πάνω στην οποία εναποτίθεται πυρίτιο. Είναι γνωστό ότι το πυρίτιο που εντοπίζεται στην επιφάνεια των φύλλων πολλών φυτών, κυρίως σιτηρών, παίζει ρόλο στην άμυνα των επιφανειακών ιστών έναντι των παθογόνων. Επομένως, εικάζεται πως και το πυρίτιο των λιθοκύστεων έχει τον ίδιο ρόλο (Sugimura et al, 1999). Άλλος πιθανός φυσιολογικός ρόλος των κυστόλιθων είναι η αδρανοποίηση των τοξικών βαρέων μετάλλων. Έχει παρατηρηθεί πως στη χημική σύσταση των κυστόλιθων συμμετέχουν σε ίχνη, τιτάνιο, σίδηρος και

αργίλιο ενώ αν στο μέσο στο οποίο αναπτύσσεται το φυτό προστεθεί κάδμιο τότε εντοπίζονται ίχνη και του στοιχείου αυτού (Okazaki et al, 1991). Τέλος, ομοίως με τους κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου, και οι κυστόλιθοι φαίνεται πως συμβάλλουν στη διάδοση του φωτός στους φωτοσυνθετικούς ιστούς και στη δημιουργία ευνοϊκού φωτεινού μικροπεριβάλλοντος στα φωτοσυνθετικά κύτταρα (Gal et al, 2012).

1.3.3. Άμορφες εναποθέσεις πυριτίου (φυτόλιθοι)

Σε ορισμένα φυτικά είδη σχηματίζονται κρύσταλλοι διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2) είτε στο τοίχωμα των επιδερμικών κυττάρων (αποπλασματικά), είτε στον πρωτοπλάστη σχηματίζοντας άμορφες υαλώδεις μάζες (πυριτικά σωματίδια – opaline crystals) (Fahn, 1990; Piperno, 2006). Ο σχηματισμός τους εξαρτάται από τις συνθήκες ανάπτυξης, τα συστατικά του εδάφους, την επάρκεια του νερού, την ηλικία του φυτού και το γενετικό υπόβαθρο του φυτού. Εμφανίζονται τόσο σε αγγειόσπερμα και γυμνόσπερμα φυτά όσο και σε περιδόφυτα. Ορισμένα είδη μάλιστα σχηματίζουν μεγάλες ποσότητες φυτόλιθων. Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι μια σημαντική λειτουργία τους είναι η προστασία των φυτών από φυτοφάγα ζώα ή φυτοπαθογόνους μύκητες (Piperno, 2006). Οι φυτόλιθοι αποτελούν επίσης χρήσιμα διαγνωστικά εργαλεία κυρίως στην αρχαιολογία και την παλαιοβοτανολογία. Επειδή ο σχηματισμός τους ελέγχεται γενετικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ταξινομικό χαρακτηριστικό, δεδομένου ότι παραμένουν αναλλοίωτοι στο εδαφικό περιβάλλον για πολλά εκατομμύρια χρόνια (Twiss et al, 1969; Harvey and Fuller, 2004; Piperno, 2006; Barboni and Bremond, 2009; Sobhakumari and Kumarasamy, 2014)

1.3.4. Κοκκολιθοφόρα

Πρόκειται για μια ομάδα ειδών φυτοπλαγκτού (περίπου 200 είδη) που ανήκουν στην κλάση Prymnesiophyceae και είναι πολύ διαδεδομένα στους ωκεανούς. Η ονομασία τους οφείλεται στην ικανότητά τους να σχηματίζουν κοκκόλιθους. Οι κοκκόλιθοι αποτελούν λεπιοειδείς εναποθέσεις ανθρακικού ασβεστίου που συσσωρεύονται στην επιφάνεια των κυττάρων των κοκκολιθοφόρων (Fernández et al, 1993; Billard and Inouye, 2004). Το σημαντικότερο και περισσότερο μελετημένο είδος είναι το *Emiliania huxleyi*, το οποίο μάλιστα έχει την δυνατότητα να ρυθμίζει τις μεταβολικές λειτουργίες του ανάλογα με το χημικό περιβάλλον (σύσταση και συγκέντρωση του άνθρακα) στο θαλασσίνο νερό (Ramos et al, 2010). Τα κοκκολιθοφόρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον κύκλο του άνθρακα και στην ιζηματογένεση στους ωκεανούς αφού εμπλουτίζουν με ανθρακικά τα μεγάλα βάθη όπου το CO_2 της ατμόσφαιρας δεν μπορεί να φτάσει μέσω διάλυσης και διάχυσης. Επίσης λόγω του τρόπου σχηματισμού των κοκκόλιθων, συντελούν στην ρύθμιση της οξύτητας των ανώτερων στρωμάτων της

θάλασσας και στην ανταλλαγή CO₂ μεταξύ ωκεανού και ατμόσφαιρας (Fernández et al, 1993; Rost and Riebesell, 2004).

1.4. Βοτανικοί χαρακτήρες των πειραματόφυτων

1.4.1. Η Άμπελος (*Vitis vinifera* L.)

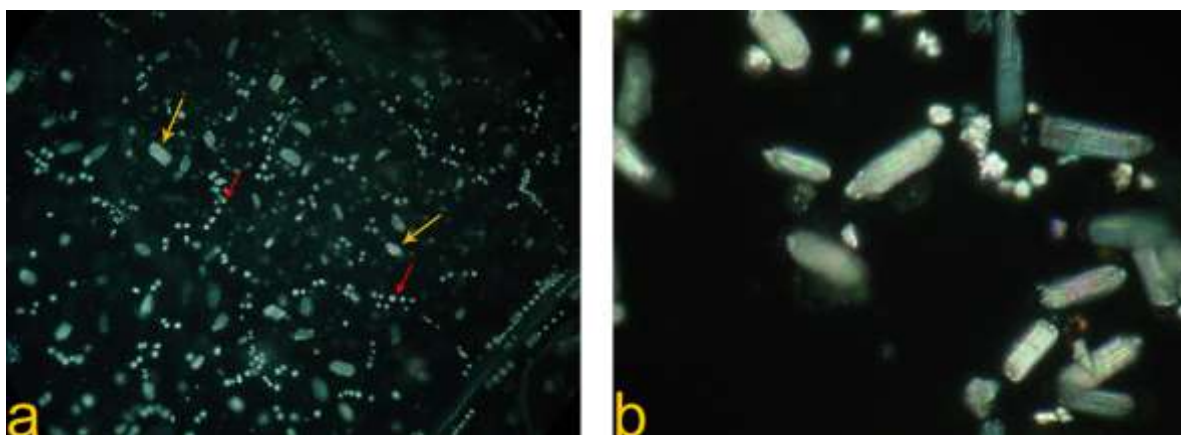
Η άμπελος *Vitis vinifera* L. είναι ευδικότυλο φυτό που ανήκει στην οικογένεια Vitaceae ή Ampelidaceae, στο γένος *Vitis* και στο υπογένος *Euvitis* ενώ υποδιαιρείται σε τρία υποείδη: *Vitis vinifera silvestris*, *Vitis vinifera caucasica* και *Vitis vinifera sativa*. Στο τελευταίο υποείδος εντάσσονται όλες οι καλλιεργούμενες ποικιλίες αμπέλου. Ανάλογα με την προέλευσή τους, τους χαρακτήρες τους και τις ιδιότητές τους μπορούν επίσης να διαχωριστούν σε τρεις φυλές (δυτική, ανατολική και ποντία). Όσον αφορά στις ποικιλίες υπολογίζεται πως ο αριθμός τους ξεπερνά τις 6000 και ανάλογα με την χρήση των καρπών τους κατατάσσονται σε επιτραπέζιες, οινοποιείας, σταφιδοποιείας, παρασκευής χυμών και παρασκευής κονσερβών. Θεωρείται ότι το *Vitis vinifera* L. προέρχεται από δύο γεωγραφικά κέντρα: α) από την περιοχή του Κασμίρ, του Παντζάμπ και του Αφγανιστάν, απ' όπου προέρχονται ποικιλίες που διαδόθηκαν στη συνέχεια σε άλλες χώρες της Ασίας αλλά και στην Ευρώπη και β) από την περιοχή της Μεσογείου όπου κατέφυγαν και επέζησαν ορισμένοι γονότυποι κατά την εποχή των παγετώνων.

Πρόκειται για φυλλοβόλο θάμνο, αναρριχώμενο, ελικοφόρο, με βαθιές και πλούσια διακλαδισμένες ρίζες, βλαστούς με καστανέρυθρο έως καστανοκίτρινο χρώμα και φύλλα παλαμόνευρα, εναλλασσόμενα, πλήρη ή έλλοβα με 3-7 λοβούς. Οι ταξιανθία είναι φόβη και συνήθως αποκαλείται βότρυς και φύεται στα ίδια γόνατα με τα φύλλα και απέναντι από αυτά. Τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα αν και υπάρχουν και ορισμένες περιπτώσεις ποικιλιών με θηλυκά άνθη οι οποίες πρέπει να συγκαλλιεργούνται με άλλες ποικιλίες προκειμένου να επικονιαστούν. Ο καρπός είναι ράγα διαφόρων σχημάτων και μεγεθών με 1-4 σπέρματα ή άσπερμος (Βαρδαβάκης, 1993; Βολιώτης και Αθανασιάδης, 1994; Σταυρακάκης, 2000; Ψύχαλου; 2004; Νικολάου, 2012; Τσέτουρας, 2014).

Το αμπέλι αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα καλλιεργούμενα είδη στις χώρες όπου ευδοκιμεί. Καλλιεργείται για τον καρπό του και τα προϊόντα που παράγονται από αυτόν και κυρίως τον οίνο και δευτερευόντως τη σταφίδα. Αποτελεί σημαντικό παράγοντα της οικονομίας ενώ ειδικά για την Ελλάδα οι εκτάσεις που καλλιεργήθηκαν το 2006 έφταναν το 1.000.000 - 1.200.000 στρέμματα (Creasy and Creasy, 2009, Ελληνική Στατιστική Αρχή). Σύμφωνα με την τελευταία ανακοίνωση της Ελληνικής Στατιστικής

Αρχής οι καλλιεργούμενες εκτάσεις το 2013 ανέρχονταν στα 844.700 στρέμματα. Από αυτά 304.900 στρέμματα ήταν επιτραπέζιες ποικιλίες και ποικιλίες σταφιδοποίησης και 539.800 στρέμματα ποικιλίες οινοποίησης.

Η άμπελος ανήκει στη λειτουργική ομάδα των C3 φυτών, ενώ όσον αφορά στα κυτταρικά έγκλειστα, συσσωρεύει οξαλικό ασβέστιο σε ιδιόβλαστα κύτταρα σε δύο μορφές: α) ραφίδες, οι οποίες απαντώνται διάσπαρτες στους αναπτυσσόμενους ιστούς και κυρίως σε αυτούς που στο τέλος του βλαστικού κύκλου θα απορριφθούν (π.χ. στα φύλλα και στο εξωκάρπιο) και β) δρούσες, οι οποίες εμφανίζονται σε ανεπτυγμένους ιστούς (φύλλα, ενδοκάρπιο και βλαστούς). Οι ίδιοι κρύσταλλοι εμφανίζονται χωρίς πολλές διαφορές και σε άλλα είδη του γένους *Vitis*. (Fabbri et al, 1992; Webb et al, 1995; Arnott and Webb, 2000; Jáuregui-Zúñiga et al, 2003; DeBolt et al, 2004).



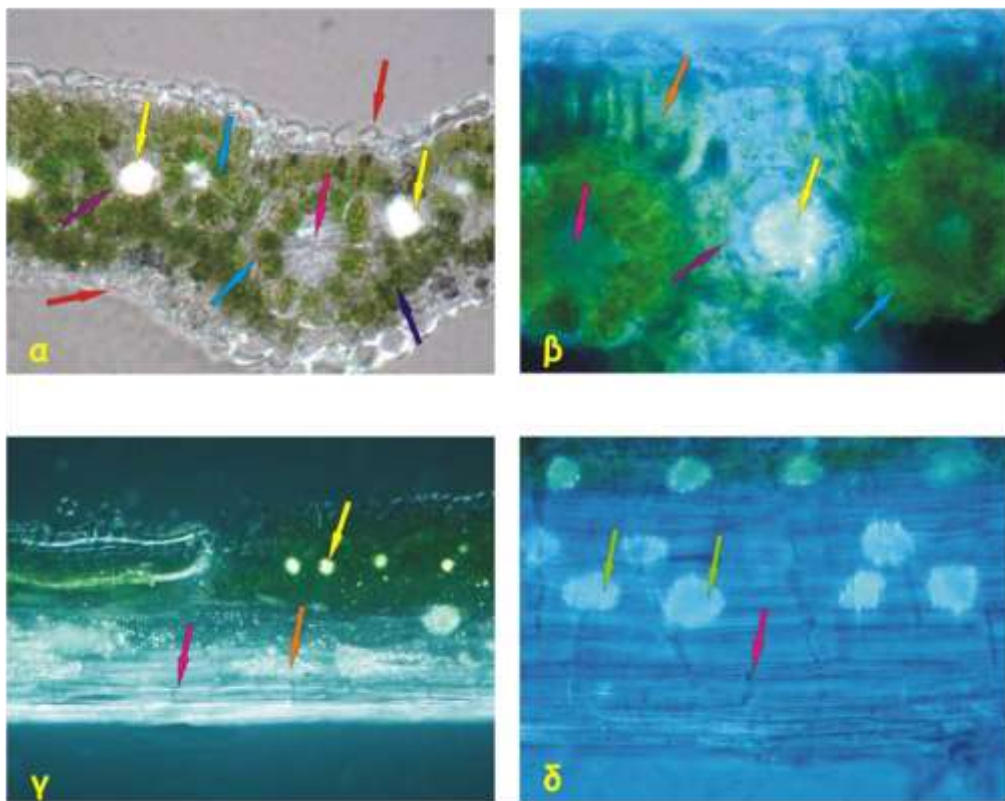
Εικόνα 1.19 Φωτογραφίες σε πεδίο πολωμένου φωτός. **a)** Ραφίδες (κίτρινα βέλη) και δρούσες (κόκκινα βέλη) σε αποχρωματισμένο ώριμο φύλλο αμπελιού και **b)** Απομονωμένες ραφίδες και δρούσες. Διακρίνεται οι δέσμη των μεμονωμένων κρυστάλλων εντός του πρωτεϊνικού matrix στις ραφίδες.

1.4.2. Το Βλήτο (*Amaranthus hybridus*)

Το βλήτο (*Amaranthus hybridus*) είναι ευδικότυλο φυτό που ανήκει στην οικογένεια Amaranthaceae. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει 65 γένη και περίπου 900 είδη φυτών. Στο γένος *Amaranthus* περιλαμβάνονται 100 περίπου είδη τα οποία ευδοκίμουν σε θερμές και εύκρατες περιοχές. Ορισμένα εξ αυτών θεωρούνται δυσεξόντωτα ζιζάνια ενώ άλλα καλλιεργούνται ως καλλωπιστικά είδη με εντυπωσιακές ταξιανθίες όπως το *A. Caudatus* και το *A. tricolor*. Περιορισμένος αριθμός ειδών, όπως και το *A. hybridus*, χρησιμοποιούνται για τη διατροφή του ανθρώπου.

Το βλήτο είναι μονοετές φυτό, μόνοικο με φύλλα έμμισχα, ακέραια και κατ' εναλλαγή. Τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα και φύονται σε κυματοειδή ταξιανθία. Το άνθος διαθέτει 5 σέπαλα, πέταλα ή τέπαλα τα οποία είναι αυτόνομα και όχι συγχωνευμένα. Οι στήμονες είναι 0-5 και ο στύλος είναι μικρός και αναπτύσσει σε 2-3 στίγματα. Ο καρπός είναι πυξίδιο και ξηρός που διαρρηγνύεται εγκάρσια ή τυχαία και περιέχει ένα σπέρμα (Harwood and Palmer, 2011; Haines, 2011; Encyclopaedia Britannica).

Το βλήτο ανήκει στη λειτουργική ομάδα των C4 φυτών, ενώ σχηματίζει κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου με δύο μορφές: α) βοτρυόμορφους (δρούσες), οι οποίοι σχηματίζονται σε ιδιόβλαστα κύτταρα του μεσοφύλλου που βρίσκονται πλησίον των κυττάρων του κολλεού της δέσμης και β) κρυσταλλική άμμο η οποία σχηματίζεται εντός της ηθμαγγειώδους δεσμίδας (Τουλάκου, 2006).



Εικόνα 1.20 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 αποαξονική επιφάνεια του φύλλου (κόκκινα βέλη), οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ροζ βέλη), τα κύτταρα του κολλεού της δέσμης (γαλάζια βέλη) τα κύτταρα του μεσοφύλλου (μπλε βέλος), οι ιδιοβλάστες (μωβ βέλη) και οι βοτρυόμορφοι κρύσταλλοι (κίτρινα βέλη). **γ. και δ.** Επιμήκειες τομές φύλλου στην περιοχή των νευρώσεων. Διακρίνονται οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ροζ βέλος), βοτρυόμορφοι κρύσταλλοι στο μεσόφυλλο (κίτρινα βέλη), βοτρυόμορφοι κρύσταλλοι στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα (πράσινα βέλη) και κρυσταλλική άμμος (πορτοκαλί βέλος).

Πηγή: Τουλάκου, Γ. 2006. Ανατομικά και Φυσιολογικά Χαρακτηριστικά των Ιδιοβλαστών που Σχηματίζουν Κρυστάλλους στο Μεσόφυλλο του Βλήτου (*Amaranthus* sp). Γ.Π.Α.

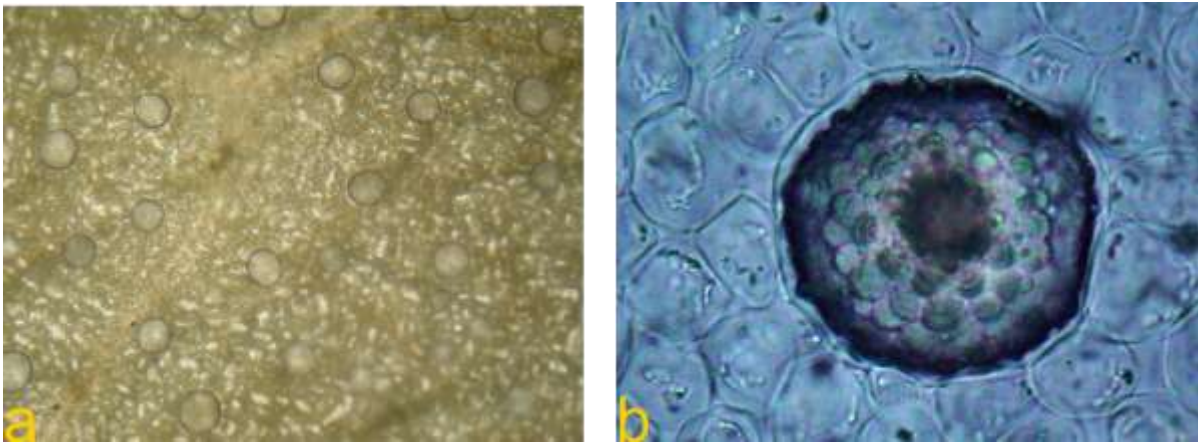
1.4.3. Το Περδικάκι (*Parietaria judaica* L.)

Το περδικάκι (*Parietaria judaica* L.) είναι ευδικότυλο, πολυετές φυτό που ανήκει στην οικογένεια Urticaceae που περιλαμβάνει περίπου 45 γένη και 800 είδη, μεταξύ αυτών και η Τσουκνίδα. Το γένος *Parietaria* περιλαμβάνει 20-35 είδη τα οποία αναπτύσσονται κυρίως σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές. Ορισμένα είδη θεωρούνται δυσεξόντωτα και πολύ ανθεκτικά ζιζάνια ενώ το *P. judaica* έχει τη δυνατότητα να εξαπλώνεται ακόμα και σε αστικό περιβάλλον, βλαστάνοντας σε ρωγμές των πεζοδρομίων και των τοίχων (στην αγγλική γλώσσα ονομάζεται Pellitory of the wall). Μάλιστα σε σχετικά πρόσφατη έρευνα βρέθηκε πως το βεβαρυμένο αστικό περιβάλλον (με αυξημένες συγκεντρώσεις χαλκού και μολύβδου) ευνοεί την βιωσιμότητα της γύρης του, ενώ η φαινοτυπική πλαστικότητα του είδους συμβάλλει στην ικανότητα προσαρμογής του σε διαταραγμένα περιβάλλοντα (Fotiou et al, 2011). Εκτός αυτού, το *P. judaica* είναι ιδιαίτερα σημαντικό είδος επειδή η γύρη του είναι υπεύθυνη για την πρόκληση αλλεργιών. Οι γυρεόκοκκοι του φυτού μεταφέρονται με τον άνεμο και όταν εισπνευστούν επικολλούνται στο βλεννογόνο των αναπνευστικών οδών και προκαλούν αλλεργική ρινίτιδα και άσθμα τύπου I. Η δράση αυτή οφείλεται στην ύπαρξη μιας επιφανειακής κατασκευής που ονομάζεται “oncus” και που αποτελεί πάχυνση του ενδοστρώματος (intine) (Damián et al, 2002). Επίσης, από τη γύρη του *P. judaica* έχουν απομονωθεί και δύο αλλεργιογόνοι παράγοντες ο Par j 1 και ο Par j 2 (Colombo et al, 2003).

Οι βλαστοί του *P. judaica* είναι ορθοί ή κατακείμενοι συνήθως τετραγωνικοί, πρασινο-καφέ ως κοκκινο-καφέ χρώματος και μπορούν να μετατραπούν σε ξυλώδεις όσο αυξάνεται η ηλικία τους. Τα φύλλα είναι έμμισχα, ελλειψοειδή, με τρίχες στην αποαξονική επιφάνεια που εντοπίζονται κυρίως στα νεύρα. Το μέγεθός τους είναι από 1-8 cm κατά μήκος και 0,5-3 cm κατά πλάτος. Τα άνθη είναι μονογενή αλλά μπορούν να είναι και ερμαφρόδιτα (ορισμένα φυτά μπορούν να φέρουν αρσενικά και θηλυκά άνθη σε διαφορετικές ταξιανθίες και ορισμένα φυτά μπορούν φέρουν αρσενικά, θηλυκά και ερμαφρόδιτα άνθη). Φέρουν 4 πέταλα, σέπαλα ή τέπαλα, διαχωρισμένα ή συγχωνευμένα που σχηματίζουν πηλίδιο. Οι στήμονες είναι 0-4 και οι στύλοι 0-1. Ο καρπός είναι αχαίνιο σκούρου καφέ ή μαύρου χρώματος, ξηρός, συνήθως οωειδής και συμμετρικός και

παραμένει εντός ορισμένων μερών του άνθους (περιάνθιο) (Townsend, 1968; Haines, 2011; Flora of North America; Anonymous, 2011).

Το περδικάκι είναι φυτό με C3 φωτοσύνθεση και σχηματίζει κυστόλιθους ανθρακικού ασβεστίου σε λιθοκύστες οι οποίες εντοπίζονται μόνο στην προσαξονική επιφάνεια του φύλλου. Έχουν διάμετρο 40-50 μm και σε εγκάρσιες τομές παρουσιάζονται εξαγωνικές ενώ σε εφαπτομενικές τομές κυκλικές και δεν σχηματίζουν θηλή στην εξωτερική τους επιφάνεια. Οι κυστόλιθοι είναι σφαιρικοί και φέρουν επάρματα διαφορετικού μεγέθους, ενώ στο εξωτερικό τους περίβλημα εντοπίζεται λιγνίνη. Συγκρατούνται στο κυτταρικό τοίχωμα από έναν αναρτήρα (μίσχο) (Γκιάφη, 2003).



Εικόνα 1.21 **a)** Κυστόλιθοι σε αποχρωματισμένο ώριμο φύλλο. **b)** Κυστόλιθος σε λιθοκύστη σε αποχρωματισμένο ώριμο φύλλο *P. judaica*. Εικόνα επεξεργασμένη μετά από πολυεστιακή φωτογράφιση.

1.5. Σκοπός της εργασίας

Η συντριπτική πλειοψηφία των φυτικών ειδών του πλανήτη σχηματίζει κυτταρικά έγκλειστα, είτε κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου, είτε κυστόλιθους ανθρακικού ασβεστίου. Η ευρεία διάδοση των δομών αυτών υποδεικνύει τη ζωτική τους σημασία, ωστόσο, τα πειραματικά δεδομένα σχετικά με τους ρόλους που επιτελούν είναι περιορισμένα. Οι φυσιολογικοί ρόλοι που τους αποδίδονται ποικίλουν και συνοψίζονται στους εξής:

- α) Αποθήκευση και ρύθμιση κατιόντων ασβεστίου
- β) Φυτοπροστασία έναντι φυτοφάγων ζώων και παθογόνων μικροοργανισμών
- γ) Συμβολή στην στήριξη των φυτικών ιστών
- δ) Αποτοξίνωση των βαρέων μετάλλων
- ε) Αδρανοποίηση του οξαλικού οξέως
- στ) Διάδοση του φωτός στους φωτοσυνθετικούς ιστούς

Ας σημειωθεί ότι ο κύριος ρόλος που τους αποδίδεται αφορά στο ένα εκ των δύο συστατικών των εγκλείστων, δηλαδή τα ιόντα Ca^{+2} . Ωστόσο, θα μπορούσε να διατυπωθεί η υπόθεση εργασίας σύμφωνα με την οποία τα κυτταρικά έγκλειστα (κρυστάλλοι και κυστόλιθοι) θα μπορούσαν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαχείριση του άνθρακα των φωτοσυνθετικών ιστών. Οι κρυστάλλοι και οι κυστόλιθοι θα μπορούσαν να αποτελούν δεξαμενή ανθρακικών ιόντων, τα οποία προκύπτουν από την διάλυση των εγκλείστων κάτω από κατάλληλες συνθήκες, και που στη συνέχεια θα ήταν διαθέσιμα να αφομοιωθούν από τη RubisCO ή την PEP·C στα φωτοσυνθετικά κύτταρα.

Σε πολύ νεαρούς φωτοσυνθετικούς ιστούς (στους οποίους τα στομάτια δεν είναι λειτουργικά) καθώς και σε φυτά που βρίσκονται σε συνθήκες πείνας άνθρακα, για παράδειγμα όταν τα στομάτια είναι κλειστά κατά τη διάρκεια της ημέρας λόγω αντίξοων περιβαλλοντικών συνθηκών (επικράτηση ισχυρών ανέμων ή/και υδατική καταπόνηση), η διάσπαση του οξαλικού και του ανθρακικού ασβεστίου θα μπορούσε να προμηθεύσει το απαραίτητο CO_2 για την απρόσκοπτη λειτουργία του κύκλου Calvin - Benson χωρίς να χρειαστεί να ανοίξουν τα στομάτια και κατά συνέπεια να υπάρξει απώλεια νερού. Εν συνεχεία, όταν οι δυσμενείς συνθήκες πάψουν να υφίστανται ή κατά τη διάρκεια της

νύχτας που δεν λειτουργεί η φωτοσύνθεση, θα μπορούσε να δοθεί το έναυσμα επαναδημιουργίας των εγκλείστων.

Με βάση αυτή την υπόθεση εργασίας έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες της ερευνητικής μας ομάδας και έχουν εξαχθεί ορισμένα αποτελέσματα τα οποία την ενισχύουν. Συγκεκριμένα, σε φυτά στα οποία εφαρμόστηκε τεχνητή πενία άνθρακα (υδατική καταπόνηση ή εφαρμογή ABA) παρατηρήθηκε μείωση του μεγέθους των κυτταρικών εγκλείστων (Γκιάφη, 2003; Λουρίδα, 2005; Τοουλάκου, 2006; Ρέππα, 2012; Τοουλάκου, 2013). Ωστόσο, όπως φάνηκε από πειράματα με τη χρήση φθορισμομετρίας της χλωροφύλλης, τα φυτά που βρίσκονταν σε πενία άνθρακα είχαν τη δυνατότητα να διατηρήσουν σταθερή την φωτοχημική ικανότητα του PSII όταν τοποθετήθηκαν σε ατμόσφαιρα μηδενικού CO₂, ενώ τα φυτά control εμφάνισαν μείωση της παραμέτρου αυτής. Το γεγονός αυτό, αποτελεί ένδειξη πως η διάλυση των εγκλείστων συμβάλλει στην διατήρηση μέρους της φωτοχημικής απόσβεσης και κατά συνέπεια τη διατήρηση ενός στοιχειώδους ρυθμού φωτοσύνθεσης (Ρέππα, 2012). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από τα αποτελέσματα έρευνας με τη χρήση μεταβολομικής που καταδεικνύει πως η διάσπαση των κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου στο βλήτο δεν συνοδεύεται από αύξηση της συγκέντρωσης του οξαλικού οξέως, το οποίο πιθανολογείται πως οξειδώνεται σε CO₂ και H₂O₂ από την οξαλική οξειδάση (Τοουλάκου, 2013).

Έχει παρατηρηθεί πως το μέγεθος τόσο των κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου όσο και των κυστόλιθων εμφανίζει ημερονύκτια διακύμανση, αφού μειώνεται κατά τη διάρκεια της ημέρας και αυξάνεται κατά τη διάρκεια της νύχτας (Λουρίδα, 2005; Τοουλάκου, 2006). Λαμβάνοντας επίσης υπόψη πως τα κυτταρικά έγκλειστα εμπεριέχουν περισσότερο ¹³C από τα κύτταρα της βιομάζας (Τοουλάκου, 2006; Ρέππα, 2012) μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα πως τα κυτταρικά έγκλειστα επαναδημιουργούνται κατά τη διάρκεια της νυχτερινής περιόδου από το CO₂ της αναπνοής.

Από τα προαναφερθέντα προτείνεται πως τα κυτταρικά έγκλειστα αποτελούν ένα δυναμικό σύστημα αποθήκευσης και διαχείρισης κυρίως ανόργανου άνθρακα παρά ασβεστίου, ωστόσο παραμένουν αναπάντητα ορισμένα ερωτήματα στα οποία κλήθηκε να απαντήσει η παρούσα εργασία. Αυτά είναι:

1. Πως επηρεάζεται η οντογένεση των κυτταρικών εγκλείστων στα φύλλα σε σχέση με τις λειτουργικές παραμέτρους των φύλλων (ηλικία, ρυθμός φωτοσύνθεσης, ρυθμός διαπνοής κλπ.);
2. Πως επηρεάζεται το μέγεθος των κυτταρικών εγκλείστων σε συνθήκες πενίας άνθρακα;

3. Είναι η οξαλική οξειδάση το ένζυμο που ευθύνεται για την διάσπαση του οξαλικού οξέως; Σε ποιο μέρος των φωτοσυνθετικών ιστών ενεργοποιείται και σε ποιο βαθμό; Υπάρχει συμμετοχή της καταλάσης στη διαδικασία;
4. Ποια είναι η τύχη των κατιόντων του ασβεστίου που προκύπτουν από τη διάσπαση των εγκλείστων;
5. Πως επηρεάζεται η φωτοσυνθετική δραστηριότητα σε φυτά που βρίσκονται σε συνθήκες τεχνητής πενίας άνθρακα με την εφαρμογή ABA;
6. Για πόσο χρονικό διάστημα μπορεί το CO₂ που παράγεται από τα κυτταρικά έγκλειστα να υποστηρίξει την φωτοσυνθετική δραστηριότητα;

Υλικά και Μέθοδοι

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Προέλευση του φυτικού υλικού

2.1.1. *Parietaria judaica* (Περδικάκι)

Το πειραματικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από αυτοφυή φυτά *Parietaria judaica* οικ. Urticaceae στον αγρό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (εικόνα 2.1). Επιλέχθηκαν υγιή φυτά, ανεπτυγμένα σε καλές συνθήκες φωτισμού και αερισμού.



Εικόνα 2.1 *Parietaria judaica* (περδικάκι) στους χώρους του Γ.Π.Α.

2.1.2. *Amaranthus hybridus* (Βλήτο)

Τα φυτά του βλήτου (*Amaranthus hybridus* οικ. Amaranthaceae) που χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματόφυτα προήλθαν από προβλαστημένα σπέρματα και αναπτύχθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών με φωτοπερίοδο 12/12 και θερμοπερίοδο 30/19 °C. Η ένταση φωτισμού και η σχετική υγρασία στο επίπεδο των φύλλων ήταν 400 μmol



Εικόνα 2.2 *Amaranthus hybridus* (βλήτο) στον θάλαμο σταθερών συνθηκών μετά τη μεταφύτευσή τους.

$\text{quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και 75% αντίστοιχα. Η σπορά πραγματοποιήθηκε σε σπορείο και όταν τα σπορόφυτα απέκτησαν ύψος 10cm μεταφυτεύτηκαν σε γλάστρες (εικόνα 2.2). Ανά τακτά διαστήματα πραγματοποιήθηκε λίπανση του υποστρώματος, με θρεπτικό διάλυμα Hoagland-Arnon (1950) ημίσειας συγκέντρωσης χωρίς ανθρακικά, και άρδευση.

2.1.3. *Vitis vinifera* (Αμπέλι)

Το φυτικό υλικό αμπελιού (*Vitis vinifera* L. οικ. Vitaceae) προήλθε από τον αμπελώνα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Για τη διευκόλυνση των πειραματικών χειρισμών και κυρίως της παρατήρησης στο οπτικό μικροσκόπιο χρησιμοποιήθηκαν φυτά της ποικιλίας Σουλτανίνα, επειδή τα φύλλα της δεν παρουσιάζουν χνοασμό. Τα φυτά ήταν κλαδεμένα σε γραμμικό σύστημα με νότια έκθεση των γραμμών φύτευσης και όλα φωτίζονταν ικανοποιητικά. Ποτίζονταν και λιπαίνονταν ανάλογα με το πρόγραμμα καλλιέργειάς τους από το εργαστήριο Αμπελουργίας του Γ.Π.Α. (εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3 Πρέμνα της ποικιλίας Σουλτανίνα στον αμπελώνα του Γ.Π.Α.

2.2. Η οντογένεση των κυτταρικών εγκλειστών σε σχέση με τις λειτουργικές παραμέτρους των φύλλων

Επιλέχθηκαν αναπτυσσόμενοι βλαστοί (5) από τα τρία πειραματόφυτα. Στη συνέχεια, βάσει του μεγέθους τους και της θέσης τους στο βλαστό τα φύλλα ομαδοποιήθηκαν σε ηλικιακές κατηγορίες.

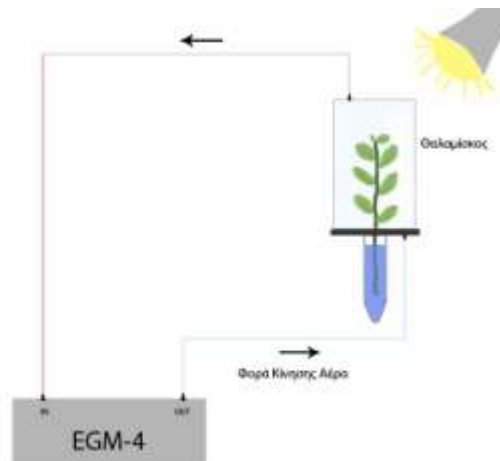
Με τη χρήση του οργάνου LC Pro+ (ADC BioScientific, Hoddesdon, UK), μετρήθηκαν οι παρακάτω παράμετροι: Ρυθμός Φωτοσύνθεσης (A), Ρυθμός Διαπνοής (E), Συγκέντρωση Υποστοματικού CO₂ (ci) και Στοματική Αγωγιμότητα (gs). Για κάθε φύλλο πάρθηκαν 5 μετρήσεις για κάθε παράμετρο και από αυτές υπολογίστηκε ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα. Σημειώνεται πως σε ορισμένες περιπτώσεις, λόγω του πολύ μικρού μεγέθους των νεαρών φύλλων, δεν έγινε δυνατή η μέτρηση των παραμέτρων αυτών. Στη συνέχεια, τα φύλλα που μετρήθηκαν συλλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν με φορητό ψυγείο στο εργαστήριο και φωτογραφήθηκαν με φωτογραφική μηχανή Cybershot DSC - H5 (SONY, Tokyo, Japan) . Από τις φωτογραφίες που προέκυψαν, υπολογίστηκε η επιφάνεια του κάθε φύλλου με τη χρήση του προγράμματος Image Pro Plus Έκδ. 5.1.0.20 (MediaCybernetics, Rockville MD, USA). Κατόπιν, δίσκοι διαμέτρου 15mm, ή και ολόκληρα, όταν επρόκειτο για πολύ μικρά φύλλα, αποχρωματίστηκαν με τη χρήση διαλύματος χλωρίνης σε νερό (1:3). Ο πλήρης αποχρωματισμός διαρκούσε συνήθως 24 ώρες. Στο περδικάκι ο αποχρωματισμός πραγματοποιήθηκε με DMSO διότι οι κυστόλιθοι είναι υδατοδιαλυτοί και το μέγεθός τους μειωνόταν κατά την παραμονή τους στο διάλυμα της χλωρίνης. Με θερμό DMSO ο αποχρωματισμός διαρκούσε μισή ώρα. Στη συνέχεια το αποχρωματισμένο φυτικό υλικό φωτογραφήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο AXIOLAB (Zeiss, Oberkochen, Germany)

Η πυκνότητα των κυτταρικών εγκλειστών ανά mm² (ραφίδων και δρουσών στο αμπέλι, δρουσών στο βλήτο και κυστόλιθων στο περδικάκι) υπολογίστηκε μέσω του προγράμματος ανάλυσης εικόνας Image Pro Plus.

2.3. Εφαρμογή σημείου Αντιστάθμισης CO₂ (Πειράματα Π0 και Β0)

Κατασκευάστηκε ένα κλειστό σύστημα αερίων με αναλυτή CO₂ (εικόνα 2.4) το οποίο περιελάμβανε έναν αεροστεγή θαλαμίσκο στη βάση του οποίου είχε προσαρμοστεί ένα δοχείο με διάλυμα ανιόντος χυμού (SAP) που περιείχε 0,5mM KH₂PO₄, 1mM KNO₃ και 0,1mM CaCl₂ (Wilkinson and Davies, 1997). Οι μίσχοι των φύλλων εμβαπτίστηκαν

στο διάλυμα του ανιόντος χυμού και στη συνέχεια ο θαλαμίσκος έκλεινε αεροστεγώς.



Εικόνα 2.4 Σχεδιάγραμμα κλειστού κυκλώματος μέτρησης του Σημείου Αντιστάθμισης

Τα φύλλα φωτίστηκαν από τεχνητή πηγή με ένταση φωτισμού στα 400 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ στο επίπεδο της κόμης. Ο θαλαμίσκος ήταν συνδεδεμένος στην είσοδο και την έξοδο με μετρητή CO₂ EGM-4 (PP Systems, Amesbury, MA USA), δημιουργώντας κλειστό κύκλωμα. Ο αέρας ανακυκλώνονταν με την λειτουργία της ενσωματωμένης στην συσκευή αντλίας.

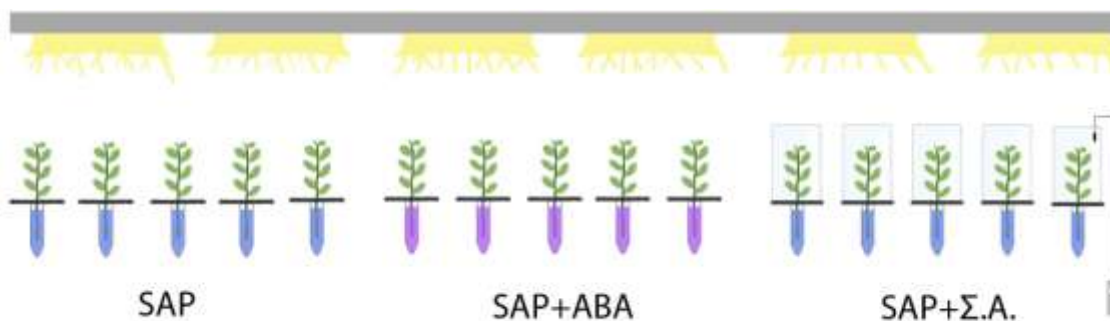
Ο μετρητής ήταν συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή και το επίπεδο της συγκέντρωσης του CO₂ εμφανίζονταν σε πραγματικό χρόνο στην οθόνη. Τα φυτά παρέμειναν στον θαλαμίσκο μέχρι να σταθεροποιηθεί η συγκέντρωση του CO₂ (1 ώρα περίπου) και καταγράφηκαν οι τιμές της συγκέντρωσης του CO₂.

2.4. Αλλαγές στο μέγεθος των κυτταρικών εγκλείστων σε συνθήκες πενίας άνθρακα.

2.4.1. Αλλαγές στο μέγεθος των κυστόλιθων σε συνθήκες πενίας άνθρακα σε φύλλα του *Parietaria judaica* (Περδικάκι)

Στα πειράματα αυτά μετρήθηκε η μεταβολή του μεγέθους των κυστόλιθων σε βλαστούς που παρέμεναν υπό συνεχή φωτισμό και σε διαφορετικούς πειραματικούς χειρισμούς.

Πείραμα Π1: Στο πείραμα αυτό μετρήθηκε η μεταβολή του μεγέθους των κυστόλιθων βλαστών σε συνθήκες πενίας άνθρακα με την εφαρμογή σημείου αντιστάθμισης για το CO₂ και με την χρήση ABA.



Εικόνα 2.5 Σχηματική διάταξη του πειράματος Π1.

Χρησιμοποιήθηκαν 15 βλαστοί περδικάκι εκ των οποίων οι 5 τοποθετήθηκαν σε σωλήνες falcon των 50 ml οι οποίοι περιείχαν SAP, οι 5 τοποθετήθηκαν σε falcon με SAP στο οποίο είχε προστεθεί αμπισικό οξύ (ABA) σε συγκέντρωση 200μM και 5 βλαστοί τοποθετήθηκαν σε falcon με SAP και σε αεροστεγείς θαλαμίσκους όπως στο προηγούμενο πείραμα (εικόνα 2.5) για να επέλθει ισορροπία CO₂ στο σημείο



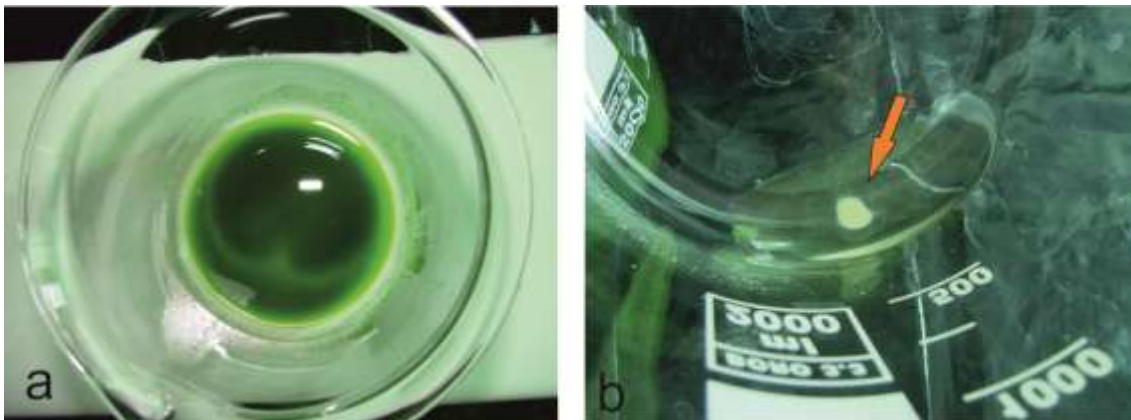
Εικόνα 2.6 Διάταξη του πειράματος Π1.

αντιστάθμισης. Σε έναν από τους θαλάμους είχε τοποθετηθεί θερμομέτρο για το έλεγχο της θερμοκρασίας. Όλοι οι βλαστοί τοποθετήθηκαν κάτω από προβολείς που παρείχαν φωτισμό 400 μmol quanta m⁻² s⁻¹ στο επίπεδο της κόμης (εικόνες 2.5, 2.6).

Αμέσως μόλις ολοκληρώθηκε η δημιουργία της πειραματικής διάταξης

(0h), συλλέχθηκαν 5 φύλλα από κάθε πειραματικό χειρισμό και από αυτά απομονώθηκαν οι κυστόλιθοι. Δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε επίσης μετά από 24 και 48 ώρες.

Η απομόνωση των κυστόλιθων έγινε με μηχανικό τρόπο. Ειδικότερα, τα φύλλα τοποθετήθηκαν με ποσότητα ισοπροπανόλης² στον ομογενοποιητή OMNI-MIXER HOMOGENIZER (OMNI, Kennesaw GA, USA) και το εκχύλισμα που προέκυψε μεταφέρθηκε σε δοχείο ζέσης και αφέθηκε να ηρεμήσει έτσι ώστε οι κυστόλιθοι να επικαθήσουν στον πυθμένα λόγω διαφοράς πυκνότητας. Στη συνέχεια το υπερκείμενο απορρίφθηκε ενώ με διαδοχικές πλύσεις με ισοπροπανόλη και με τη χρήση πιπέτας παστέρ οι κυστόλιθοι συλλέχθηκαν σε όσο το δυνατόν καθαρότερη μορφή σε άλλο δοχείο (Εικόνες 2.7.a και 2.8.b).



Εικόνα 2.7 Μηχανική απομόνωση κυστόλιθων: **a)** Οι κυστόλιθοι διακρίνονται ως μια άσπρη σκόνη που σχηματίζει δακτύλιο στον πυθμένα του δοχείου. **b)** Μετά από αρκετές πλύσεις οι κυστόλιθοι έχουν φτάσει σε μια αρκετά καθαρή μορφή.

Ένα μέρος από τους απομονωμένους κυστόλιθους της κάθε επέμβασης τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρο προς παρατήρηση και φωτογράφιση στο οπτικό μικροσκόπιο. Φωτογραφήθηκαν 5 οπτικά πεδία για κάθε επέμβαση και για κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας. Στη συνέχεια, στις ψηφιακές φωτογραφίες σχεδιάστηκε με το χέρι το περίγραμμα του κάθε κυστόλιθου και κατόπιν, με τη χρήση του προγράμματος Image Pro Plus, υπολογίστηκε ο μέσος όρος της επιφάνειας των κυστόλιθων. Ο όγκος των κυστόλιθων υπολογίστηκε από τη διάμετρό τους, με την παραδοχή ότι αυτοί είναι σφαιρικοί. Από τα 5 οπτικά πεδία για κάθε επέμβαση και χρονική στιγμή υπολογίστηκε ο τελικός μέσος όρος του όγκου καθώς και το τυπικό σφάλμα. Τέλος, οι μέσοι όροι των όγκων και τα τυπικά σφάλματα για κάθε επέμβαση και κάθε χρονική στιγμή εκφράστηκαν

² Στην βιβλιογραφία αναφέρεται πως όταν πρόκειται για κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου η απομόνωση μπορεί να πραγματοποιηθεί και σε απιονισμένο νερό (da Costa et al, 2009).

ως ποσοστό επί % του όγκου που μετρήθηκε στη χρονική στιγμή 0h για την αντίστοιχη επέμβαση.

Πείραμα Π2: Μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας ανθρακικών ανιόντων στο θρεπτικό διάλυμα στη μεταβολή του μεγέθους των κυστόλιθων βλαστών που βρίσκονταν σε συνθήκες πενίας άνθρακα με την εφαρμογή σημείου αντιστάθμισης για το CO₂.

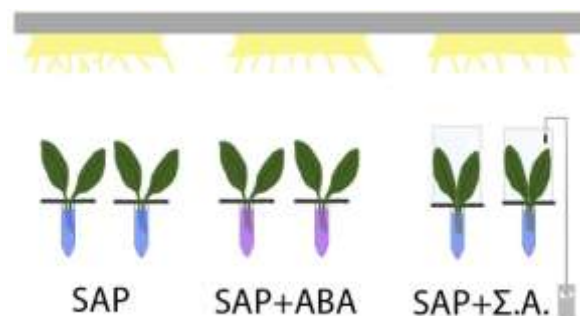
Χρησιμοποιήθηκαν 12 βλαστοί περδικάκι οι οποίοι τοποθετήθηκαν σε falcon με SAP και μέσα σε αεροστεγείς θαλάμους (ΣΑ) κάτω από συνεχή φωτισμό. Κατά την έναρξη του πειράματος πάρθηκαν 5 φύλλα από το κάθε φυτό, ενώ μετά από 5 ώρες πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία από 6 βλαστούς και στο θρεπτικό διάλυμά τους προστέθηκαν ανθρακικά ανιόντα HCO₃⁻ υπό τη μορφή K₂CO₃ και σε συγκέντρωση 1,5 mM. Οι θάλαμοι έκλεισαν ξανά και αφέθηκαν υπό φωτισμό για άλλες 10 ώρες. Μετά τη συμπλήρωση 15 ωρών από την έναρξη του πειράματος ανοίχτηκαν όλοι οι θάλαμοι και πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία.

Από τα συλλεχθέντα φύλλα πάρθηκαν δίσκοι διαμέτρου 15mm οι οποίοι αποχρωματίστηκαν με DMSO και κατόπιν φωτογραφήθηκαν. Από τις ψηφιακές φωτογραφίες μετρήθηκε η επιφάνεια των κυστόλιθων με το Image Pro Plus και στη συνέχεια υπολογίστηκε ο όγκος τους. Για κάθε πειραματικό χειρισμό υπολογίστηκε ο μέσος όρος του όγκου και το τυπικό σφάλμα.

2.4.2. Αλλαγές στο μέγεθος των κρυστάλλων σε συνθήκες πενίας άνθρακα σε φύλλα του *Amaranthus hybridus* (Βλήτο)

Πείραμα B1: Μετρήθηκε η μεταβολή του μεγέθους των κρυστάλλων στα φύλλα του βλήτου σε συνθήκες πενίας άνθρακα αντίστοιχες με αυτές του πειράματος Π1 στο περδικάκι.

Από φυτά βλήτου που αναπτύχθηκαν στον θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών και σε καλή υδατική κατάσταση συλλέχθηκαν 45 ώριμα φύλλα. 15 φύλλα τοποθετήθηκαν σε falcon με SAP, 15 σε falcon με SAP και ABA και 15 σε SAP και σε αεροστεγή θάλαμο (ΣΑ = 7ppm) (Εικόνα 2.9). Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία με το Πείραμα Π1 με δειγματοληψία σε 0, 12 και 24 ώρες.

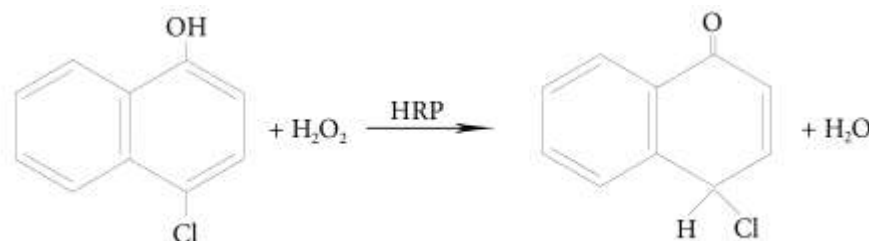


Εικόνα 2.9 Σχηματική διάταξη του πειράματος B1.

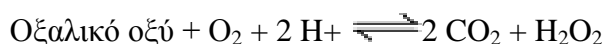
2.5. Ιστοχημικός εντοπισμός της Οξαλικής Οξειδάσης και της καταλάσης και υπολογισμός της δραστηρότητας της Οξαλικής Οξειδάσης στο *Amaranthus hybridus* (Βλήτο)

Πείραμα B2: Για τον ιστοχημικό εντοπισμό της οξαλικής οξειδάσης σε εγκάρσιες τομές φύλλων βλήτου, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα χρωστικής 4-chloro-1-naphthol το οποίο παρασκευάστηκε ως εξής: Σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρικού οξέως pH 4 (25mM ηλεκτρικό οξύ, 3,5mM EDTA και διόρθωση του pH με NaOH), προστέθηκε 1 μονάδα/ ml υπεροξειδάση (Horseradish Radish Peroxidase, HRP – *Amoracia rusticana* Οικ. Brassicaceae) και 0,6 mg ml⁻¹ 4-chloro-1-naphthol. Επειδή η τελευταία ένωση είναι αδιάλυτη στο νερό, διαλύθηκε σε 0,5 ml αιθανόλης πριν προστεθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα. Αμέσως πριν τη χρήση του διαλύματος της χρωστικής προστέθηκε σε αυτό 2,5mM οξαλικό οξύ ως υπόστρωμα της οξαλικής οξειδάσης. Το διάλυμα χωρίς την προσθήκη του οξαλικού οξέως χρησιμοποιήθηκε ως “τυφλό” (Dumas et al. 1995).

Η 4-chloro-1-naphthol (χρωμογόνος παράγοντας) παρουσία της υπεροξειδάσης οξειδώνεται, με οξειδωτικό μέσο το H₂O₂, σε 4-chloro-1-naphthon η οποία είναι αδιάλυτη και έχει μωβ χρώμα κατά την αντίδραση (Fortin et al, 2006):



Το H₂O₂ στην παραπάνω αντίδραση προκύπτει από την ενζυμική οξείδωση του οξαλικού οξέως προς H₂O₂ και CO₂ με την επίδραση της οξαλικής οξειδάσης κατά την αντίδραση:

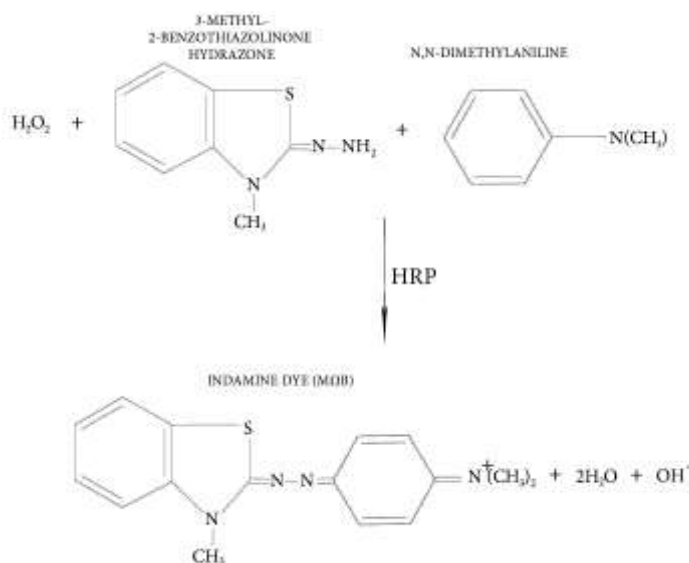


Παρ' ότι στο όξινο περιβάλλον της αντίδρασης, η υπεροξειδάση παρουσιάζει εντονότερη δραστηρότητα έναντι της καταλάσης (Chance, 1952; Gallati, 1979; Suha et al, 2013), στο διάλυμα της χρωστικής προστέθηκαν 50mM 3-amino-1,2,4-triazole (ATA), παρεμποδιστής της καταλάσης (Margoliash and Novgrodsky, 1957; Frederick and Newcomb, 1969; Allen and Whatley, 1978; Havir, 1992; Switala and Loewen, 2002), ώστε να μην υπάρξει διάσπαση του H₂O₂ από το ένζυμο αυτό.

Εφαρμογή υδατικής καταπόνησης: Επιλέχθηκαν 10 φυτά βλήτου που αναπτύσσονταν στον θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών, τα οποία βρίσκονταν σε παρόμοιο στάδιο ανάπτυξης και σε καλή υδατική κατάσταση. Τα 5 εξ αυτών ποτίζονταν φυσιολογικά ενώ τα άλλα 5 παρέμειναν απότιστα μέχρι να αρχίσουν να εμφανίζουν συμπτώματα υδατικής καταπόνησης (απώλεια σπαργής, καρούλιασμα φύλλων κλπ). Μόλις έφτασαν σε αυτή την κατάσταση, συλλέχθηκαν 3 φύλλα από κάθε φυτό και από αυτά πάρθηκαν τομές πάχους 30μm με τη χρήση του ψυκτοτόμου CM1850 (LEICA GA, Wetzlar, Germany). Εν συνεχεία, οι τομές εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα της χρωστικής όπου και παρέμειναν για 15min. Κατόπιν, φωτογραφήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο BX40 με την ενσωματωμένη ψηφιακή κάμερα DP71 (OLYMPUS, Tokyo, Japan).

Πείραμα B3: Διερευνήθηκε η επίδραση της υδατικής καταπόνησης στη δραστικότητα της οξαλικής οξειδάσης. Χρησιμοποιήθηκαν συνδυαστικά οι φασματοφωτομετρικές τεχνικές των Goyal et al και Laker et al με ορισμένες τροποποιήσεις (Laker et al, 1980; Goyal et al, 1999).

Η μέθοδος βασίζεται στη μέτρηση της μεταβολής της απορρόφησης που οφείλεται στον σχηματισμό του μωβ έγχρωμου συμπλόκου μεταξύ των ενώσεων 3-Methyl-2-Benzothiazolinone Hydrazone (MBTH) και N,N-Dimethylaniline (DMA) υπό την επίδραση της υπεροξειδάσης και με συμμετοχή του H_2O_2 ως υποστρώματος (προϊόν της ενζυμικής οξείδωσης του οξαλικού οξέως με την δράση της οξαλικής οξειδάσης) κατά την αντίδραση:



Επιλέχθηκαν 15 φυτά βλήτου με τα ίδια κριτήρια με το πείραμα **B2**. Από αυτά, τα 5 ποτίζονταν κανονικά και τα 5 παρέμειναν απότιστα όπως και στο πείραμα **B2**.

Μόλις τα απότιστα φυτά άρχισαν να εμφανίζουν συμπτώματα υδατικής καταπόνησης πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία 5 φύλλων από κάθε χειρισμό και μετρήθηκε το υδατικό δυναμικό τους ($\Delta\Psi$) και η στοματική τους αγωγιμότητα. Επίσης απομονώθηκαν κρύσταλλοι από φύλλα κάθε πειραματικού χειρισμού και μετρήθηκε ο όγκος τους.

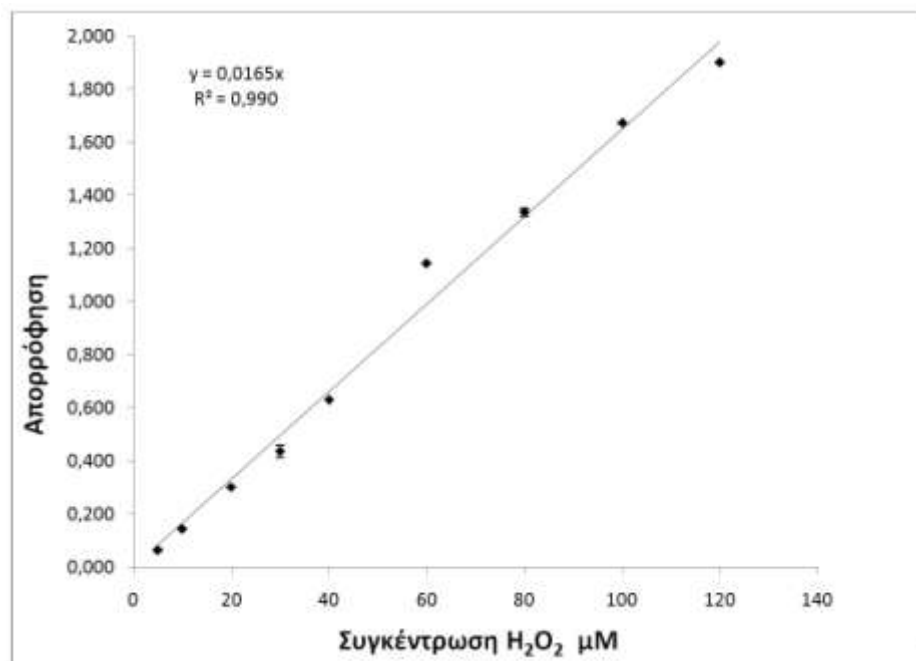
Συλλέχθηκε 1 gr φύλλων από κάθε φυτό το οποίο εκχυλίστηκε υπό ψύχος και σκότος σε γουδί πορσελάνης με 5 ml ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7 (0,1 M φωσφορικό κάλιο, 0,5 M σακχαρόζη). Κατόπιν το εκχύλισμα φιλτραρίστηκε με τριπλό τούλι, και φυγοκεντρήθηκε στα 15.000xg για 15 λεπτά στους 4°C στη φυγόκεντρο Biofuge Pico (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Germany). Το υπερκείμενο διαχωρίστηκε από το ίζημα το οποίο επαναδιαλύθηκε σε 6 ml ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης. Εν συνεχεία, 225μl από το εκχύλισμα (υπερκείμενο και ίζημα) κάθε πειραματικού χειρισμού μεταγγίστηκαν σε 6 μαύρους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν διάλυμα αντίδρασης pH 4 (25 mM ηλεκτρικό οξύ, 2,5mM EDTA-Fe-Na, 0,79 mM DMA 0,11 mM MBTH και 1,2 mM 3-amino-1,2,4-triazole). Πριν την εισαγωγή του εκχυλίσματος στους σωλήνες προστίθενταν 2,5 units HRP και οξαλικό οξύ (2mM). Παράλληλα ετοιμάστηκαν 6 δοκιμαστικοί σωλήνες για κάθε φυτό οι οποίοι περιείχαν ότι και οι παραπάνω αλλά με 225μl ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης αντί του εκχυλίσματος (“τυφλό”).

Κατόπιν, οι σωλήνες επώαστηκαν σε υδατόλουτρο LCB-R08 (LABTECH, Laval QC, Canada) στους 37°C για 30 λεπτά υπό περιοδική ανακίνηση. Αφαιρέθηκε ένας σωλήνας ανά 5 min και φυγοκεντρήθηκε στις 6000 RPM για 2 min. Το υπερκείμενο μεταγγίστηκε σε πλαστική κυβέττα του 1 ml και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 600nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UV-160A (Shimadzu, Kyoto, Japan). Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε το περιεχόμενο ενός δοκιμαστικού σωλήνα που δεν περιείχε το εκχύλισμα και παρελήφθη από το υδατόλουτρο την ίδια χρονική στιγμή με το δείγμα.

Λόγω του ότι η μέθοδος ανιχνεύει το H_2O_2 (προϊόν της διάσπασης του οξαλικού οξέως από την οξαλική οξειδάση), για να καταστεί δυνατή η αντιστοίχιση της μεταβολής της απορρόφησης με τα units της οξαλικής οξειδάσης ανά γραμμάριο νωπού βάρους φύλλου, δημιουργήθηκε μια πρότυπη καμπύλη για το H_2O_2 . Στο διάλυμα της αντίδρασης (σε σωλήνες όπως παραπάνω) προστέθηκαν 2,5 units HRP και H_2O_2 ώστε στον τελικό όγκο της αντίδρασης η συγκέντρωσή του να είναι 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 και 120 μ M. Στη θέση του διαλύματος του οξαλικού οξέως και του εκχυλίσματος προστέθηκε

ίσος όγκος απιονισμένου νερού. Κατόπιν, οι σωλήνες έκλεισαν και αναδεύτηκαν. Η αντίδραση της χρώσης πραγματοποιήθηκε σχεδόν ακαριαία και γι αυτό η μέτρηση της απορρόφησης στα 600 nm πραγματοποιήθηκε άμεσα, χωρίς επώαση. Παράλληλα με τους σωλήνες αυτούς ετοιμάστηκε και ένας σωλήνα για κάθε τιμή συγκέντρωσης του H_2O_2 ο οποίος περιείχε ότι και οι παραπάνω χωρίς το H_2O_2 ("τυφλό" φασματοφωτομέτρησης).

Από τις τιμές απορρόφησης που προέκυψαν σχεδιάστηκε η πρότυπη καμπύλη (γραμμική), υπολογίστηκε η κλίση της και η εξίσωση που την περιγράφει (εικόνα 2.10).



Εικόνα 2.10 Η πρότυπη καμπύλη του H_2O_2 .

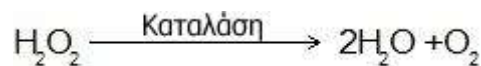
Πείραμα B4: Πραγματοποιήθηκε ο ιστοχημικός εντοπισμός της καταλάσης σε τομές φύλλων βλήτου από φυτά στα οποία είχε εφαρμοστεί πενία άνθρακα (εφαρμογή σημείου αντιστάθμισης και ABA). Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε ήταν αυτό των Frederick και Newcomb (Frederick and Newcomb, 1969) με τροποποιήσεις. Επιλέχθηκαν 15 φύλλα από καλά ανεπτυγμένα φυτά βλήτου εκ των οποίων οι μίσχοι των 5 εμβαπτίστηκαν σε SAP, των 5 σε SAP και ABA και των 5 σε SAP και εντός αεροστεγών θαλάμων. Όλα τα φύλλα τοποθετήθηκαν κάτω από φωτισμό εντάσεως $400 \mu mol \text{ quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ όπου και παρέμειναν για 24 ώρες (εικόνα 2.9).

Εγκάρσιες τομές από τα φύλλα κάθε πειραματικού χειρισμού εμβαπτίστηκαν και επώαστηκαν για 60 min στους $30^\circ C$ σε διάλυμα χρωστικής που παρασκευάστηκε ως εξής:

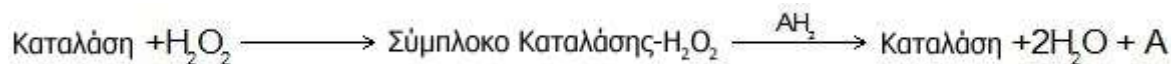
Σε 50 ml ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50 mM) pH 9 προστέθηκαν 1 mg ml^{-1} 3,3-Diaminobenzidine (DAB) και 1 ml H_2O_2 3%. Κατόπιν, έγινε πλύση των τομών με το παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα και στη συνέχεια φωτογραφήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο.

Επίσης, τομές από κάθε πειραματικό χειρισμό προεπωάστηκαν για 30min στο παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο είχαν προστεθεί 50 mM 3-amino-1,2,4-triazole. Κατόπιν ακολουθήθηκε η προηγούμενη διαδικασία με την προσθήκη 50 mM 3-amino-1,2,4-triazole και στο διάλυμα της χρωστικής. Οι τομές αυτές απετέλεσαν το “τυφλό” για κάθε επέμβαση. “Τυφλό” απετέλεσαν επίσης τομές οι οποίες εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα χρωστικής απουσία H_2O_2 .

Η καταλάση καταλύει την αντίδραση:



Ωστόσο, παρουσία άλλων δοτών πρωτονίων (AH_2), δύναται να τους οξειδώσει με την αντίδραση τη μορφής:



Στην προκειμένη περίπτωση δότη πρωτονίων αποτελεί το DAB, το οποίο όταν οξειδώνεται αποκτά καφέ χρώμα (Sexton and Hall, 1991).

Η 3-amino-1,2,4-triazole είναι παρεμποδιστής της καταλάσης. Ωστόσο, δεν παρεμποδίζει τις υπεροξειδάσες. Η επίδραση των υπεροξειδασών, περιορίζεται με την επιλογή υψηλού pH επειδή σε αυτό παρεμποδίζεται η δραστηκότητά τους (Sexton and Hall, 1991; Ruzin, 1999).

2.6. Ιστοχημικός εντοπισμός των κατιόντων Ca^{+2} σε τομές του *Parietaria judaica* και *Amaranthus hybridus* με τη χρωστική alizarine red-s

Για την ανίχνευση κατιόντων Ca^{+2} σε τομές φύλλων από περδικάκι (Π3) και βλήτο (B5), χρησιμοποιήθηκε η ιστοχημική χρώση με Alizarin red S όπως περιγράφηκε από τον McGee-Russel (McGee-Russel, 1958) με ορισμένες τροποποιήσεις.

Πείραμα Π3: Δημιουργήθηκε η ίδια πειραματική διάταξη με το πείραμα Π2 (εικόνα 2.5). Μετά από 24 ώρες συνεχούς φωτισμού πάρθηκαν 5 φύλλα από κάθε πειραματικό χειρισμό και πραγματοποιήθηκαν εγκάρσιες τομές.

Πείραμα B5: Δημιουργήθηκε η ίδια πειραματική διάταξη με το πείραμα B2. Όταν τα απότιστα φυτά εμφάνισαν συμπτώματα υδατικής καταπόνησης συλλέχθηκαν 5 φύλλα από κάθε πειραματικό χειρισμό και από αυτά πάρθηκαν εγκάρσιες τομές.

Οι τομές των φύλλων κάθε πειραματικού χειρισμού εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα της χρωστικής το οποίο παρασκευάστηκε ως εξής: σε 100 ml απιονισμένου νερού διαλύθηκε 1 gr Alizarine red S και το pH διορθώθηκε στο 4,2 με NH_4OH . Οι τομές παρέμειναν στη χρωστική για 5 λεπτά και στη συνέχεια η περίσσεια χρωστικής ξεπλύθηκε με 20 εμβαπτίσεις σε ακετόνη και 20 εμβαπτίσεις σε διάλυμα ακετόνης-ξυλενίου 1:1. Κατόπιν, φωτογραφήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο.

Η χρώση αυτή έχει δοκιμαστεί στη βιβλιογραφία σε διαφορετικές τιμές του pH. Ωστόσο, αυξανόμενου του PH αυξάνεται το ιξώδες και έτσι η χρωστική εισχωρεί δυσκολότερα στους ιστούς (McGee-Russel, 1958; Puchtler et al, 1969). Ένα πλεονέκτημα της μεθόδου είναι πως ανάλογα με το PH του διαλύματος μπορεί να γίνει διαχωρισμός του οξαλικού ασβετίου από το ανθρακικό ασβέστιο αφού το πρώτο χρωματίζεται μόνο σε PH 7 ενώ το δεύτερο σε όλο το εύρος του PH (Proia and Brinn, 1985).

Όσον αφορά στον μηχανισμό εμφάνισης του χρώματος, το μόριο της χρωστικής Alizarin red S σχηματίζει χηλικά σύμπλοκα με τα κατιόντα του Ca^{+2} τα οποία είναι διπλοθλαστικά. Ωστόσο, είναι δυνατό να σχηματίσει χηλικά σύμπλοκα και με άλλα δισθενή κατιόντα όπως Mn^{+2} , Mg^{+2} και Fe^{+2} τα οποία όμως δεν απαντώνται τους ιστούς των φύλλων σε συγκεντρώσεις ικανές να επηρεάσουν το αποτέλεσμα του πειράματος. Τέλος, εκτός από χρώση τομών, πραγματοποιήθηκε και χρώση απομονωμένων κρυστάλλων και κυστόλιθων.

2.7. Ανίχνευση πρωτεϊνών στο matrix των απομονωμένων ιδιοβλαστών στο *Vitis vinifera* (Πείραμα A1).

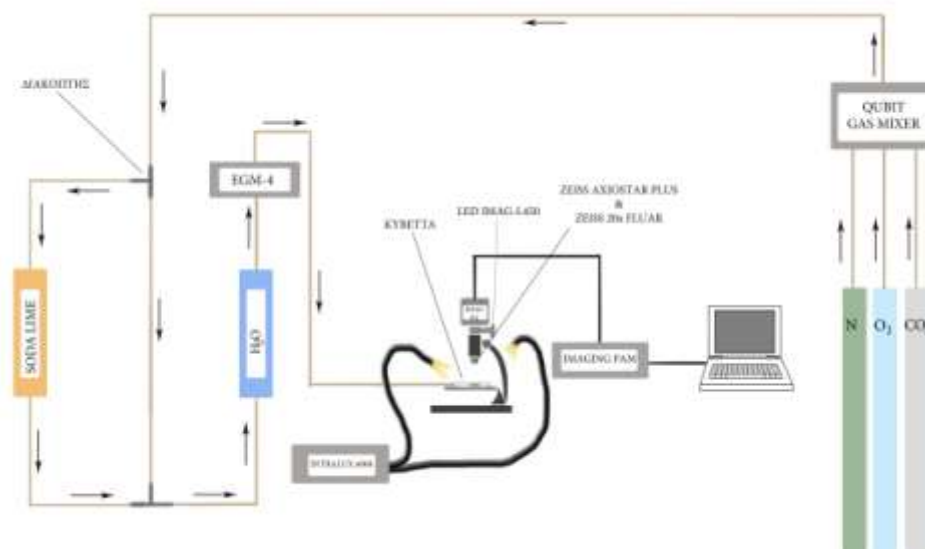
Για τον έλεγχο της ύπαρξης πρωτεϊνών στο μάτριξ των ιδιοβλαστών του αμπελιού, απομονώθηκαν ιδιοβλάστες, από νεαρά και ώριμα φύλλα, σε ισοπροπανόλη και 150mg απομονωμένων ιδιοβλαστών τοποθετήθηκαν σε erpendorf των 2 ml όπου με θερμό αέρα πραγματοποιήθηκε η πλήρης εξάτμιση της ισοπροπανόλης. Στη συνέχεια προστέθηκε στο erpendorf 1 ml ρυθμιστικό διάλυμα Tris 40mM pH 8 για διάλυση του πρωτεϊνικού μάτριξ και κατόπιν φυγοκεντρήθηκε στα 1500 RPM για 5 min στους 4°C. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1 ml από το παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα και επαναλήφθηκε η διαδικασία. Το υπερκείμενο που προέκυψε από τις δύο φυγοκεντρήσεις μεταγγίστηκε σε σωλήνα falcon όπου πραγματοποιήθηκε τεστ Bradford στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γ.Π.Α.

Σε αντίστοιχη ποσότητα απομονωμένων ιδιοβλαστών πραγματοποιήθηκε ανάλυση SDS-PAGE με χρώση Coomassie Blue και AgNO₃. Τα gel της πολυακρυλαμίδης φωτογραφήθηκαν και οι ζώνες που εμφανίστηκαν συγκρίθηκαν με πρότυπη κλίμακα μοριακών βαρών ώστε να είναι δυνατή η εκτίμηση του μοριακού βάρους της κάθε πρωτεΐνης που ανιχνεύτηκε.

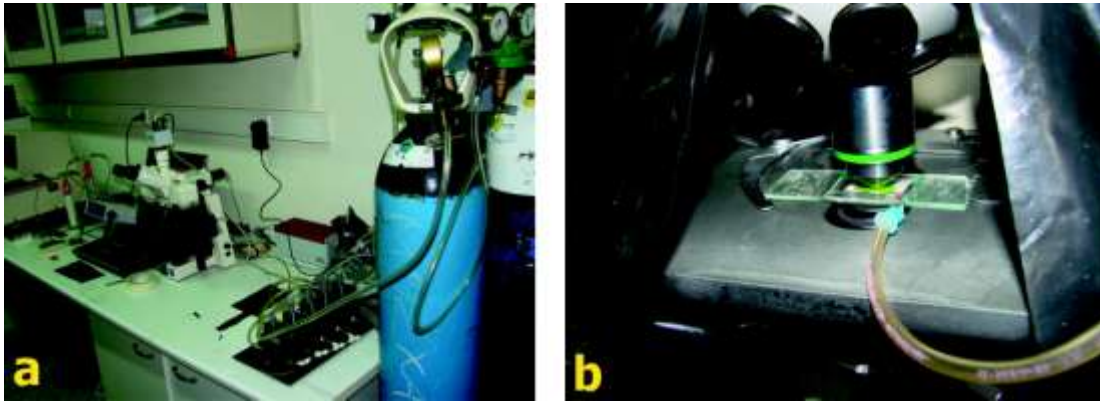
2.8. Χαρακτηριστικά του Φθορισμού της Χλωροφύλλης

Για τον υπολογισμό των χαρακτηριστικών του φθορισμού της χλωροφύλλης των τριών πειραματόφυτων σε διαφορετικούς πειραματικούς χειρισμούς, χρησιμοποιήθηκε πειραματική διάταξη η οποία επέτρεπε την μέτρηση του φθορισμού χλωροφύλλης σε πραγματικό χρόνο, σε διαφορετικές συνθήκες φωτισμού και διαφορετική σύσταση της ατμόσφαιρας.

Ο βασικός κορμός της πειραματικής διάταξης περιελάμβανε το φθορισμόμετρο Imaging PAM M-Series (Walz, Effeltrich, Germany), το οπτικό μικροσκόπιο Axiostar Plus (Zeiss, Oberkochen, Germany), την ψηφιακή κάμερα IMAG-K4 της Walz και την πηγή φωτισμού LED IMAG-L450. Τα αέρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σε φιάλες υπό πίεση, ενώ για τη μίξη τους χρησιμοποιήθηκε σύστημα 5 ροομέτρων της εταιρίας Qubit Systems Inc (Kingston ON, Canada). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η πηγή φωτισμού με οπτικές ίνες INTRALUX 6000 (Volpi, Schlieren, Switzerland) καθώς και ο αναλυτής αερίων EGM-4. Ο χειρισμός του φθορισμόμετρου γινόταν με το συνοδευτικό πρόγραμμα Imaging Win v2.40b (Walz, Effeltrich, Germany) ενώ ο χειρισμός των ροομέτρων με το συνοδευτικό πρόγραμμα G400 Gas Mixing System (Qubit Systems Inc, Kingston ON, Canada) εγκατεστημένα σε φορητό ηλεκτρονικό υπολογιστή. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης μικροκυβέττες, σωλήνες σιλικόνης, διακόπτες καθώς και 2 πλυντρίδες, μία με νερό για την διατήρηση σταθερού επιπέδου της ατμοσφαιρικής υγρασίας του κυκλώματος και μία με soda lime ως παγίδα CO_2 (εικόνες 2.11 και 2.12).



Εικόνα 2.11 Διάγραμμα πειραματικής διάταξης για τη μέτρηση των παραμέτρων του φθορισμού της χλωροφύλλης



Εικόνα 2.12, **a)** Η πειραματική διάταξη για τη μέτρηση των παραμέτρων του φθορισμού της χλωροφύλλης, **b)** Η κυβέττα και ο τρόπος εισαγωγής του μίγματος των αερίων σε αυτή.

Για κάθε πειραματόφυτο επιλέχθηκαν 10 φύλλα [αμπελιού (**Πείραμα A2**) ή βλήτου (**Πείραμα B6**) ή 10 βλαστοί από περδικάκι (**Πείραμα Π4**), εκ των οποίων: 5 τοποθετήθηκαν σε SAP και 5 σε SAP με ABA και κάτω από φωτισμό εντάσεως $400 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για 5 ώρες. Στη συνέχεια πάρθηκαν δίσκοι διαμέτρου 15mm οι οποίοι τοποθετήθηκαν στην μικροκυβέττα προς παρατήρηση. Στον πυθμένα της υπήρχε γάζα η οποία ήταν εμποτισμένη είτε με SAP είτε με SAP+ABA ανάλογα με την επέμβαση. Η χρήση της γάζας απέτρεπε την αφυδάτωση του δίσκου.

Για την καταγραφή του φθορισμού (F_0 και F_t) χρησιμοποιήθηκε ακτινοβολία μέτρησης εντάσεως $4-6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και συχνότητας 8Hz, ενώ για την καταγραφή του μέγιστου φθορισμού (F_m και F_m') δόθηκε φωτεινός παλμός κορεσμού $2700 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Για την μέτρηση των παραμέτρων του φθορισμού στο φως χρησιμοποιήθηκε ακτινικό φως εντάσεως $460 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Σε κάθε οπτικό πεδίο επιλέγησαν, τυχαία και διάσπαρτα, 30 περιοχές ενδιαφέροντος (AOI), η κάθε μία εκ των οποίων απαρτιζόταν από 5-10 κύτταρα ανάλογα με την προέλευση του φύλλου. Το λογισμικό υπολόγιζε τις παραμέτρους του φθορισμού χλωροφύλλης για κάθε AOI και κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε ο μέσος όρος του και το σφάλμα.

Η πειραματική διαδικασία μέτρησης των παραμέτρων του φθορισμού περιελάμβανε 6 στάδια.

- Στο στάδιο προσαρμογής οι δίσκοι μέσα στην κυβέττα παρέμειναν στο σκοτάδι και σε συνθήκες ατμοσφαιρικού αέρα (390ppm CO₂, 21% O₂ και 78% N και παροχή 300 ml min⁻¹) για 15 λεπτά (προσαρμογή στο σκοτάδι).
- Στο πρώτο στάδιο ενεργοποιήθηκε το φως μέτρησης και καταγράφηκε το **F₀** ενώ με ένα παλμό κορεσμού καταγράφηκε και το **F_m**. Κατόπιν, ενεργοποιήθηκε το ακτινικό φως και ανά 2 min δόθηκαν περιοδικοί παλμοί κορεσμού. Η σύσταση του αέρα παρέμενε η ίδια ενώ η διάρκεια του σταδίου, καθώς και των επόμενων, ήταν 10 min.
- Στο δεύτερο στάδιο η συγκέντρωση του O₂ μειώθηκε στο 1% ώστε να αποκλειστεί η φωτοχημική απόσβεση μέσω της φωτοαναπνοής.
- Στο τρίτο στάδιο η συγκέντρωση του CO₂ μηδενίστηκε με την χρήση παγίδας CO₂ ενώ παράλληλα ενεργοποιήθηκε η εξωτερική φωτεινή πηγή. Σκοπός αυτής της ενέργειας ήταν η κατανάλωση του CO₂ στις περιοχές πέριξ του οπτικού πεδίου ώστε να αποτραπεί η αλλοίωση της μέτρησης λόγω πλάγιας διάχυσης του CO₂.
- Στο τέταρτο στάδιο απενεργοποιήθηκε η εξωτερική πηγή φωτισμού αλλά η σύσταση του αέρα παρέμεινε η ίδια με το προηγούμενο στάδιο.
- Στο πέμπτο και τελευταίο στάδιο πραγματοποιήθηκε η επαναφορά της σύστασης των αερίων στα αρχικά επίπεδα.

Τα στάδια που έχριζαν ιδιαίτερης σημασίας και ανάλυσης ήταν τα 3,4 και 5 αφού σε αυτά αναμενόταν οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις βάσει της υπόθεσης εργασίας.

Το λογισμικό του φθορισμομέτρου έκανε αυτόματα τους υπολογισμούς των διαφόρων παραμέτρων του φθορισμού της χλωροφύλλης. Από αυτούς επιλέχθηκαν και αναλύθηκαν: η λειτουργική φωτοχημική ικανότητα του PSII **Φ_{PSII}** (Yield), ο συντελεστής φωτοχημικής απόσβεσης **qP**, ο συντελεστής μη-φωτοχημικής απόσβεσης **qN** και ο ρυθμός μεταφοράς ηλεκτρονίων **ETR**.

2.9. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων όλων των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα JMP Έκδ. 10.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC USA) και τα γραφήματα δημιουργήθηκαν με το πρόγραμμα Sigmaplot (Systat software Inc., San Jose, CA USA).

Όσον αφορά στις επί μέρους αναλύσεις κάθε πειράματος πραγματοποιήθηκαν οι εξής:

Πειράματα Π1 και Β1: Πραγματοποιήθηκε μονοκατευθυντική ανάλυση της διασποράς (One Way Anova) και συγκρίσεις όλων των μέσων με το τεστ Tukey-Kramer HSD, και οι μεταβολές του όγκου αποδόθηκαν σε γράφημα.

Πείραμα Π2: Πραγματοποιήθηκε μονοκατευθυντική ανάλυση της διασποράς και σύγκριση των μέσων με το τεστ Tukey-Kramer HSD και τα αποτελέσματα αποδόθηκαν με τη μορφή πίνακα.

Πείραμα Β3: Πραγματοποιήθηκε μονοκατευθυντική ανάλυση της διασποράς και συγκρίσεις των μέσων. Τα αποτελέσματα αποδόθηκαν σε πίνακα.

Πειράματα χαρακτηριστικών του φθορισμού της χλωροφύλλης (Π4, Β6 και Α2): Οι μεταβολές στις τιμές των παραμέτρων του φθορισμού χλωροφύλλης αποδόθηκαν σε γραφήματα, ενώ για κάθε χρονική στιγμή μέτρησης πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μέσων των δύο επεμβάσεων με το τεστ Tukey-Kramer HSD.

Αποτελέσματα

3. Αποτελέσματα

3.1. Η οντογένεση των κυτταρικών εγκλείστων σε σχέση με τις λειτουργικές παραμέτρους των φύλλων.

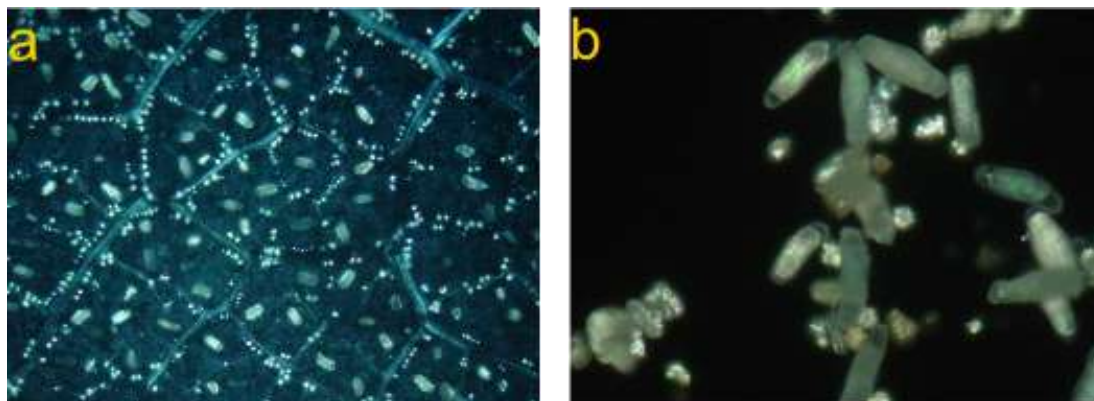
Διατυπώθηκε η υπόθεση εργασίας σύμφωνα με την οποία, οι ιδιοβλάστες που σχηματίζουν έγκλειστα δημιουργούνται και λειτουργούν στα αρχικά στάδια ανάπτυξης των φύλλων έτσι ώστε να δεσμεύουν το CO₂ το οποίο βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις διότι δεν υπάρχει ανταλλαγή αερίων (ατροφικά στόματα). Στα αρχικά στάδια ανάπτυξης τους τα φύλλα είναι ετερότροφα, επομένως αναμένεται συσσώρευση CO₂.

Για την επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής, ο αριθμός των ιδιοβλαστών που περιέχουν έγκλειστα (οξαλικό ασβέστιο στα φύλλα του Αμπελιού και του Βλήτου και ανθρακικό ασβέστιο στο περδικάκι) κατά τη διάρκεια της έκπτυξης των φύλλων των πειραματόφυτων, συσχετίστηκε με την επιφάνεια των φύλλων και με παραμέτρους της φωτοσύνθεσης και της διαπνοής. Για να δοθεί η δυνατότητα να συγκριθούν τα αποτελέσματα μεταξύ των τριών φυτικών ειδών, η επιφάνεια εκφράστηκε ως το % ποσοστό της επιφάνειας του πλήρως εκπτυγμένου φύλλου που μετρήθηκε σε κάθε είδος.

3.1.1. Η οντογένεση των ραφίδων και των δρουσών κατά τη διάρκεια έκπτυξης των φύλλων του *Vitis vinifera* L. (αμπέλι).

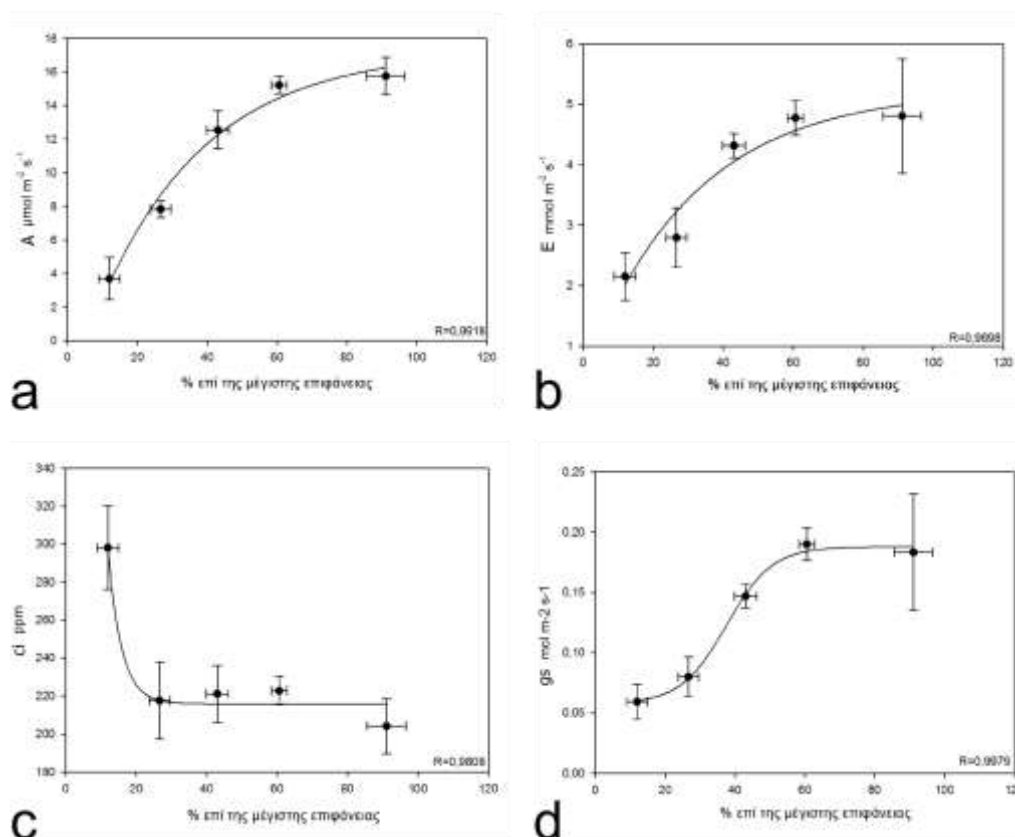
Το αμπέλι είναι ένα C₃ φυτό στα φύλλα του οποίου εμφανίζονται δύο μορφές κυτταρικών εγκλείστων, δρούσες και ραφίδες. Και οι δύο μορφές κυτταρικών εγκλείστων αποτελούν αποθέσεις οξαλικού ασβεστίου. Οι δρούσες απαντώνται σε ιδιοβλαστικά κύτταρα που βρίσκονται σε επαφή με τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες ενώ οι ραφίδες σε ιδιοβλάστες που βρίσκονται διάσπαρτοι στο μεσόφυλλο (εικόνα 3.1).

Από τη συσχέτιση του ρυθμού φωτοσύνθεσης (A) με την επιφάνεια του φύλλου κατά τη διάρκεια της έκπτυξης προκύπτει ότι αυτή μπορεί να περιγραφεί μέσω μιας εκθετικής καμπύλης (εικόνα 3.2α). Σε φύλλα που μόλις έχουν εκπτυχθεί και που δεν ξεπερνούν το 20% της μέγιστης επιφάνειας ο ρυθμός φωτοσύνθεσης είναι χαμηλός (3,7 μmol m⁻² s⁻¹). Ωστόσο, αυξάνεται ταχέως και προσεγγίζει τη μέγιστη τιμή όταν το φύλλο έχει αποκτήσει το 60% της μέγιστης επιφάνειας.



Εικόνα 3.1 **a)** Δρούσες και ραφίδες σε αποχρωματισμένο ώριμο φύλλο αμπελιού και **b)** απομονωμένες ραφίδες και δρούσες αμπελιού όπως εμφανίζονται στο οπτικό μικροσκόπιο σε πεδίο πολωμένου φωτός.

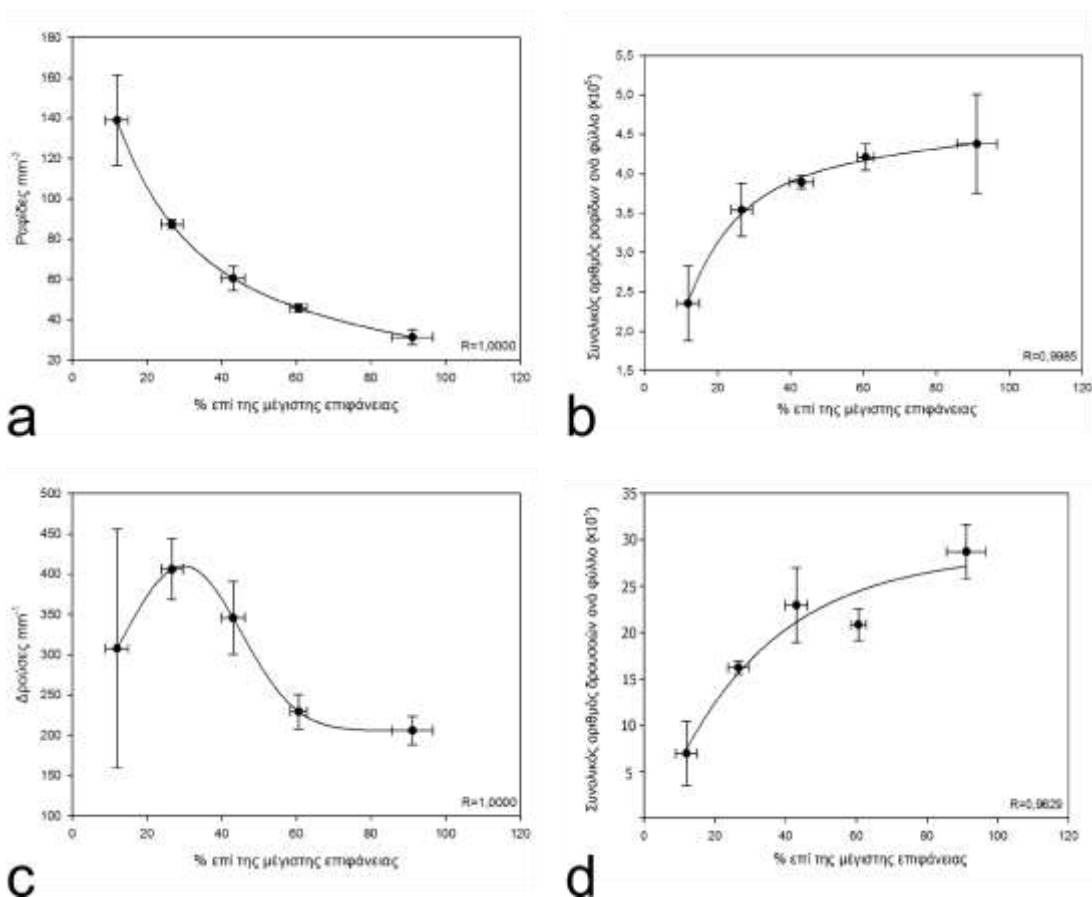
Την ίδια μορφή παρουσιάζει και η καμπύλη που περιγράφει τη συσχέτιση του ρυθμού διαπνοής (E) με το ποσοστό της επιφάνειας (εικόνα 3.2b). Και σε αυτή την περίπτωση ο ρυθμός διαπνοής ακολουθεί καμπύλη τύπου Michaelis-Menten και προσεγγίζει τη μέγιστη τιμή όταν το φύλλο έχει μέγεθος ίσο με 65% της τελικής



Εικόνα 3.2 **a)** Ο ρυθμός της φωτοσύνθεσης (A), **b)** ο ρυθμός της διαπνοής (E), **c)** η συγκέντρωση του υποστοματικού CO_2 (c_i) και **d)** η στοματική αγωγιμότητα (g_s) συναρτήσει του μεγέθους του φύλλου κατά τη διάρκεια έκπτυξης στο φυτό *V. vinifera*.

επιφάνειας.

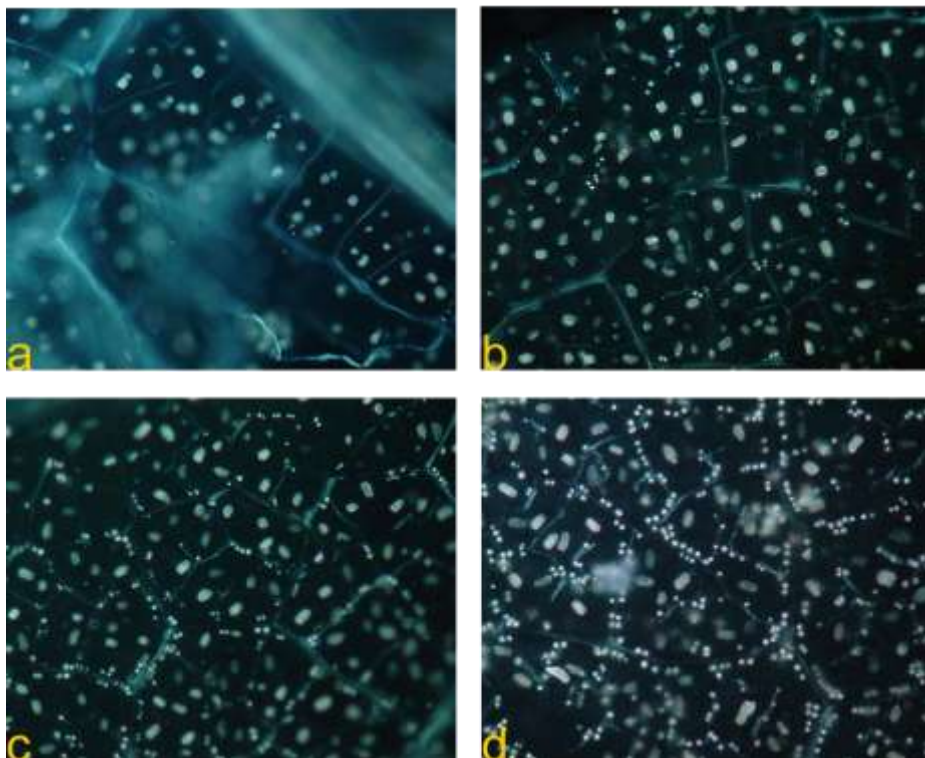
Η συσχέτιση της συγκέντρωσης του υποστοματικού CO₂ με το ποσοστό επιφάνειας περιγράφεται από θετικό κλάδο υπερβολής (εικόνα 3.2c). Το υποστοματικό CO₂ βρίσκεται σε σχετικά υψηλή συγκέντρωση (300ppm) σε φύλλα επιφάνειας μικρότερης του 10% της μέγιστης, αλλά μειώνεται τάχιστα και σταθεροποιείται σε μια τιμή περίπου στα 220 ppm. Όσον αφορά στη καμπύλη της στοματικής αγωγιμότητας (gs) συναρτήσει της επιφάνειας, παρουσιάζει σιγμοειδή μορφή (εικόνα 3.2d). Σε πολύ νεαρά φύλλα των οποίων η επιφάνεια αποτελεί περίπου το 30% της μέγιστης, η gs παρουσιάζει χαμηλές τιμές (0,05 - 0,08 mol m⁻² s⁻¹). Στη συνέχεια, και μέχρι η επιφάνεια να φτάσει στο 50% της μέγιστης, η στοματική αγωγιμότητα αυξάνεται με ταχύ ρυθμό και προσεγγίζει τα 0,18 mol m⁻² s⁻¹ όπου και σταθεροποιείται μέχρι και την πλήρη ωρίμανση του φύλλου.



Εικόνα 3.3 **a)** Η πυκνότητα των ραφίδων, **b)** ο συνολικός αριθμός των ραφίδων ανά φύλλο, **c)** η πυκνότητα των δροουσών και **d)** ο συνολικός αριθμός των δροουσών ανά φύλλο συναρτήσει του μεγέθους του φύλλου κατά τη διάρκεια έκπτυξης στο φυτό *V. vinifera*.

Η συσχέτιση της πυκνότητας των ραφίδων (ραφίδες mm^{-2}) με την επιφάνεια περιγράφεται από μία εκθετική μείωση. Η πυκνότητα των ραφίδων παρουσιάζει τη μέγιστη τιμή της σε πολύ νεαρά φύλλα και μειώνεται σταδιακά, αυξανόμενης της επιφάνειας του φύλλου, και σταθεροποιείται στην τιμή των 30 ραφίδων mm^{-2} . Ωστόσο, ο συνολικός αριθμός των ραφίδων ανά φύλλο ακολουθεί αντίθετη πορεία εκθετικής αύξησης και σταθεροποιείται στις 425.000 περίπου ραφίδες ανά φύλλο όταν αυτά έχουν αποκτήσει το 50% της μέγιστης επιφάνειας (εικόνα 3.3a και 3.b).

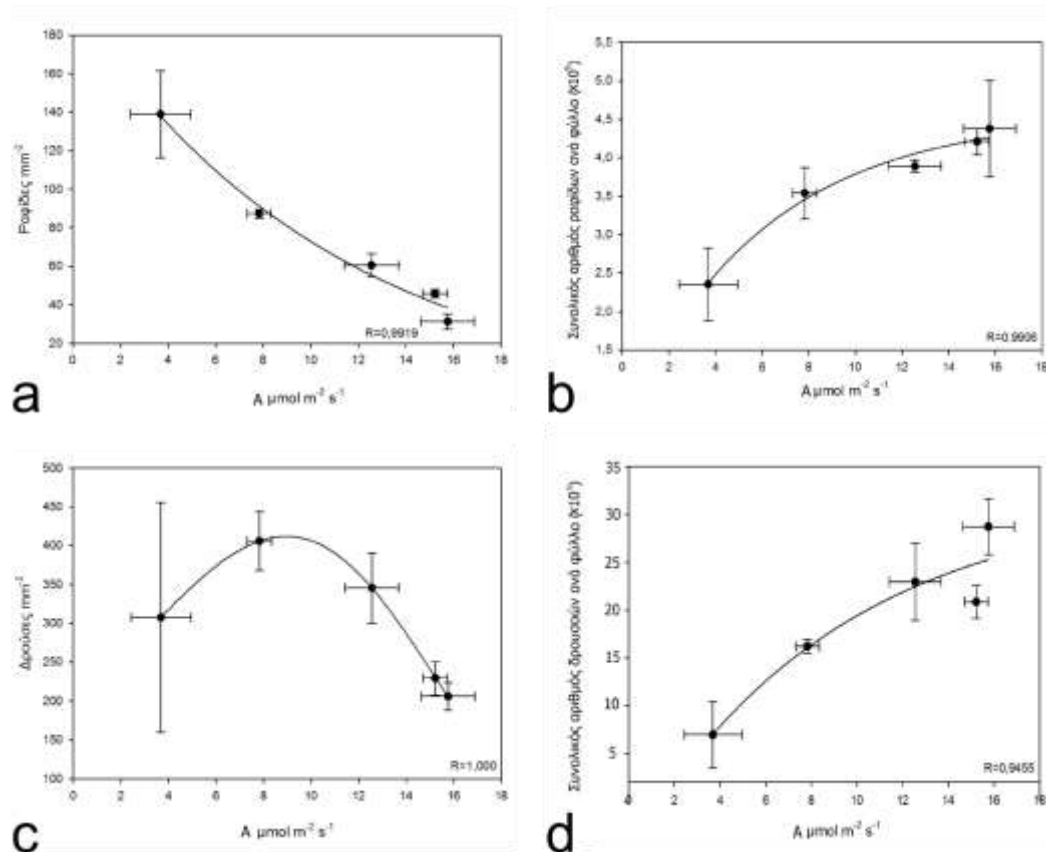
Όσον αφορά στις δρούσες, η συσχέτιση της πυκνότητάς τους (δρούσες mm^{-2}) με την αύξηση της επιφάνειας των φύλλων κατά τη διάρκεια της έκπτυξης περιγράφεται από μια κωδωνοειδή καμπύλη, ενώ ο συνολικός αριθμός τους στο φύλλο αυξάνεται εκθετικά αυξανόμενης της επιφάνειας του (εικόνα 3.3 c και d). Σύμφωνα με τα παραπάνω, στα πολύ νεαρά φύλλα οι δρούσες δεν έχουν ακόμα σχηματιστεί ή απαντώνται σποραδικά και επομένως η πυκνότητά τους είναι χαμηλή. Ωστόσο, μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα προσεγγίζει τη μέγιστη τιμή της, όταν το φύλλο έχει αποκτήσει το 25% της μέγιστης επιφάνειας, και στη συνέχεια μειώνεται και σταθεροποιείται (220 δρούσες mm^{-2}) όταν το φύλλο αποκτά το 60% της μέγιστης επιφάνειας.



Εικόνα 3.4 Ραφίδες και δρούσες σε αποχρωματισμένα φύλλα αμπελιού: **a)** του πρώτου κόμβου (0,5 - 3% της επιφάνειας του πλήρως εκπτυγμένου φύλλου), **b)** του δεύτερου κόμβου (3 - 10% της επιφάνειας του πλήρως εκπτυγμένου φύλλου), **c)** του τέταρτου κόμβου (20 - 25 % της επιφάνειας του πλήρως εκπτυγμένου φύλλου και **d)** του δέκατου κόμβου (90 - 100 % της επιφάνειας του πλήρως εκπτυγμένου φύλλου).

Στην εικόνα 3.4 φαίνονται οι ραφίδες και οι δρούσες σε αποχρωματισμένα φύλλα αμπελιού τεσσάρων διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης.

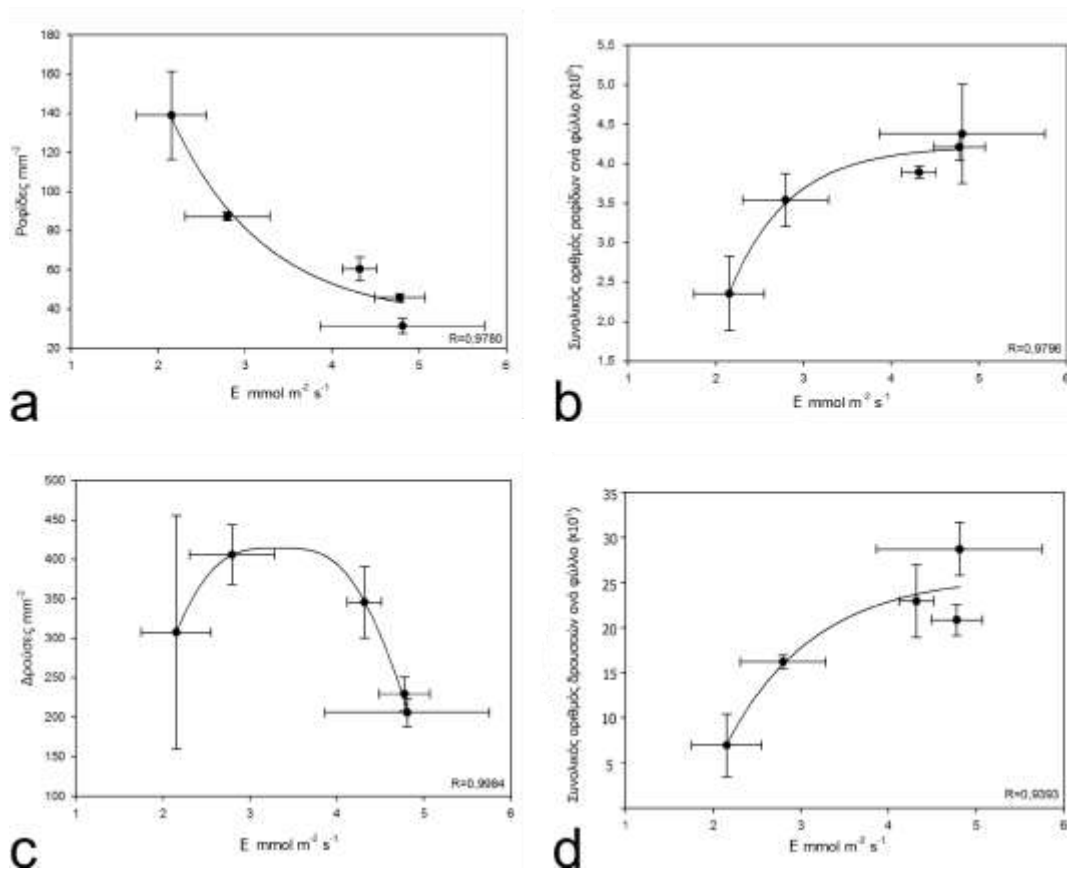
Στην εικόνα 3.5 παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ της πυκνότητας και του συνολικού αριθμού ραφίδων και δρουσών και του φωτοσυνθετικού ρυθμού.



Εικόνα 3.5 **a)** Η πυκνότητα των ραφίδων, **b)** ο συνολικός αριθμός των ραφίδων ανά φύλλο, **c)** η πυκνότητα των δρουσών και **d)** ο συνολικός αριθμός των δρουσών ανά φύλλο συναρτήσει του ρυθμού φωτοσύνθεσης στο φυτό *V. vinifera*.

Όπως φαίνεται, η συσχέτιση της πυκνότητας των ραφίδων με τον ρυθμό φωτοσύνθεσης περιγράφεται από καμπύλη ήπιας εκθετικής μείωσης, ενώ οι συσχετίσεις του συνολικού αριθμού ραφίδων και του συνολικού αριθμού δρουσών με τον ρυθμό φωτοσύνθεσης περιγράφονται από καμπύλη ήπιας εκθετικής αύξησης. Ωστόσο, η καμπύλη που περιγράφει την συσχέτιση μεταξύ πυκνότητας δρουσών και αναπτυξιακού σταδίου είναι κωδωνοειδής.

Η εικόνα 3.6 παρουσιάζει τις συσχετίσεις μεταξύ της πυκνότητας και του συνολικού αριθμού ραφίδων και δρουσών και του ρυθμού διαπνοής. Οι συσχετίσεις

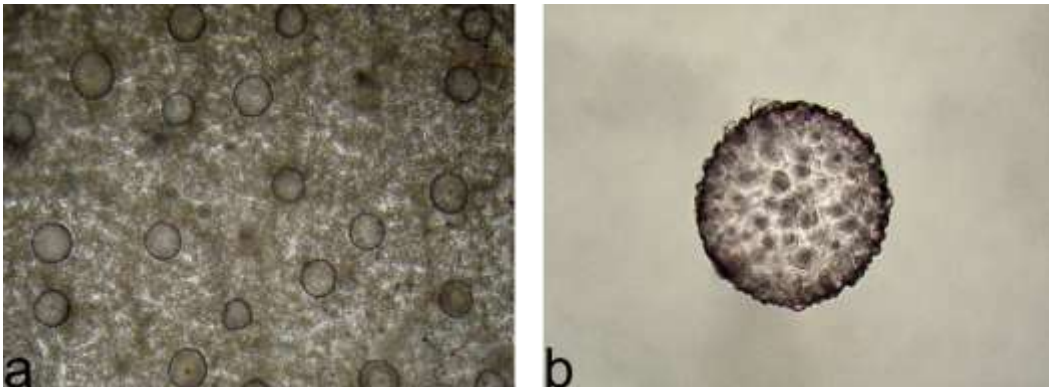


Εικόνα 3.6 **a)** Η πυκνότητα των ραφίδων, **b)** ο συνολικός αριθμός των ραφίδων ανά φύλλο, **c)** η πυκνότητα των δρουσών και **d)** ο συνολικός αριθμός των δρουσών ανά φύλλο συναρτήσει του ρυθμού διαπνοής στο φυτό *V. vinifera*.

αυτές παρουσιάζουν την ίδια μορφή με αυτές των παραπάνω παραγόντων με τον ρυθμό φωτοσύνθεσης (εικόνα 3.5).

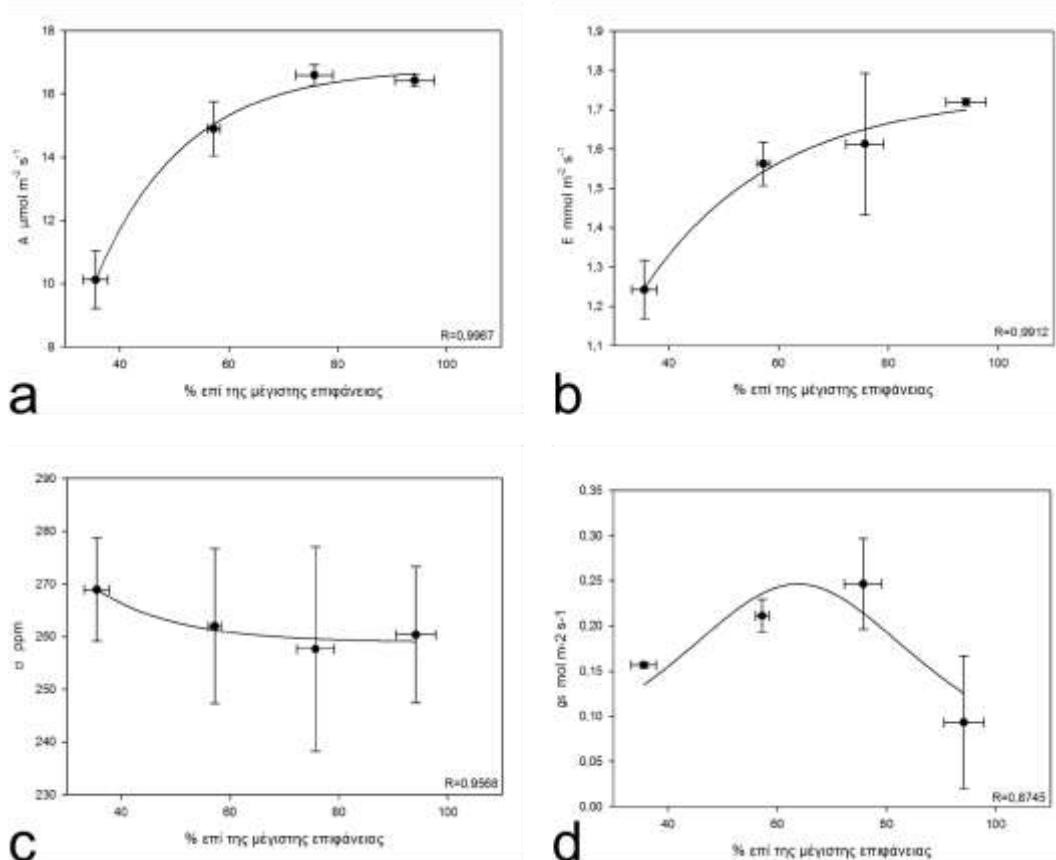
3.1.2. Η οντογένεση των κυστόλιθων σε κατά τη διάρκεια έκπτυξης των φύλλων του *Parietaria judaica* (περδικάκι).

Το περδικάκι είναι C3 φυτό το οποίο συσσωρεύει ανθρακικό ασβέστιο σε ιδιοβλαστικά κύτταρα που ονομάζονται λιθοκύστες και εντοπίζονται διάσπαρτα στο μεσόφυλλο. Η απόθεση του ανθρακικού ασβεστίου σε αυτές γίνεται υπό τη μορφή κυστόλιθων (εικόνα 3.7)



Εικόνα 3.7 **a)** Κυστόλιθοι σε αποχρωματισμένο ώριμο φύλλο και **b)** απομονωμένος κυστόλιθος από ώριμο φύλλο *P. judaica* όπως φαίνονται στο οπτικό μικροσκόπιο.

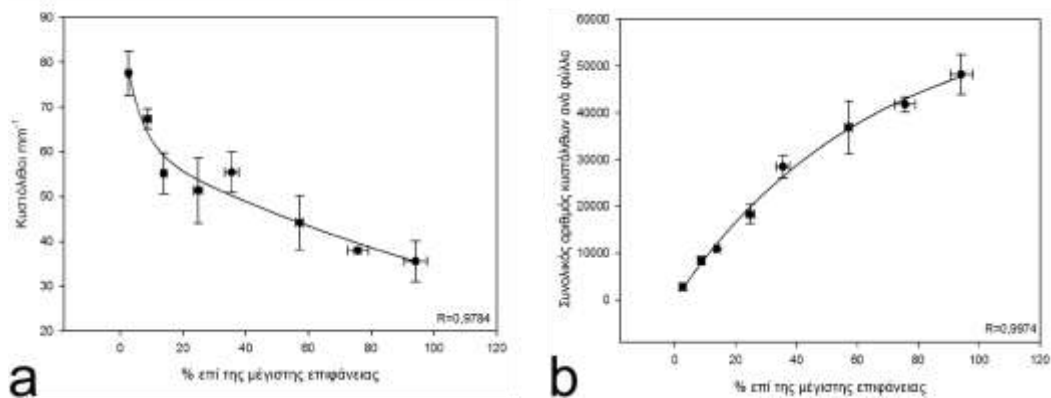
Οι συσχετίσεις μεταξύ ρυθμού φωτοσύνθεσης, ρυθμού διαπνοής, συγκέντρωσης του υποστοματικού CO₂ και στοματικής αγωγιμότητας με την επιφάνεια του φύλλου κατά τη διάρκεια έκπτυξης παρουσιάζονται στην εικόνα 3.8.



Εικόνα 3.8 **a)** Ο ρυθμός της φωτοσύνθεσης (A), **b)** ο ρυθμός της διαπνοής (E), **c)** η συγκέντρωση του υποστοματικού CO₂ (ci) και **d)** η στοματική αγωγιμότητα (gs) συναρτήσει του μεγέθους του φύλλου κατά τη διάρκεια έκπτυξης στο φυτό *P. judaica*.

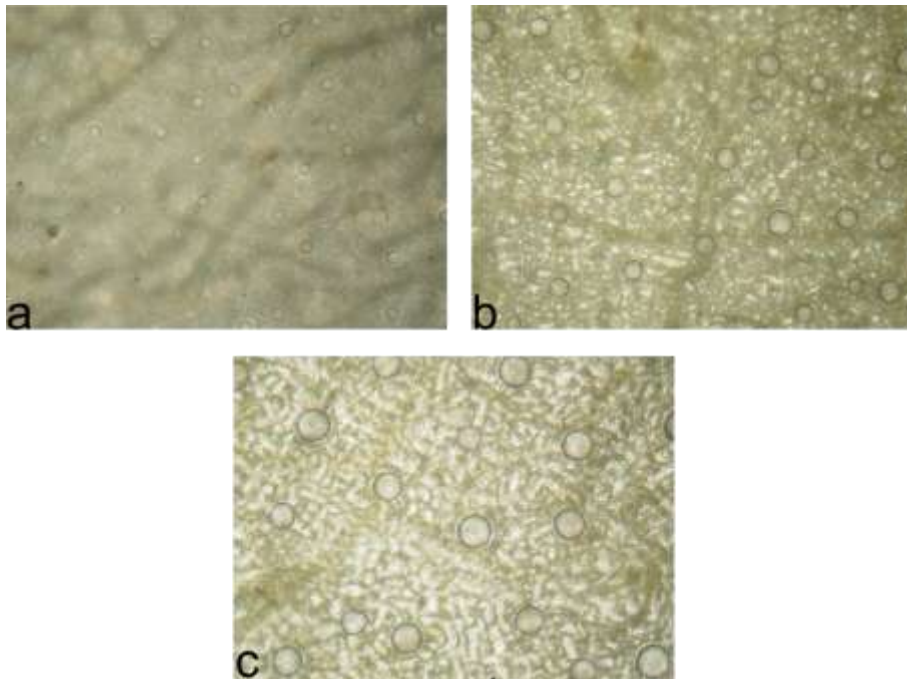
Όπως και στην περίπτωση του αμπελιού, ο ρυθμός φωτοσύνθεσης και ο ρυθμός διαπνοής αυξάνονται εκθετικά όσο η επιφάνεια του φύλλου αυξάνεται. Παρατηρείται επίσης μια ήπια ελάττωση της συγκέντρωσης του υποστοματικού CO₂ κατά τη διάρκεια έκπτυξης των φύλλων. Η στοματική αγωγιμότητα αρχικά αυξάνεται και η τιμή της φτάνει σε μέγιστο όταν το φύλλο έχει αποκτήσει το 65% της μέγιστης επιφάνειάς του. Ωστόσο, στη συνέχεια μειώνεται προσεγγίζοντας σε τιμές συγκρίσιμες με τις αρχικές.

Η συσχέτιση μεταξύ πυκνότητας κυστόλιθων και μεγέθους φύλλου παρουσιάζει την ίδια μορφή με εκείνης μεταξύ πυκνότητας ραφίδων και μεγέθους φύλλου στο αμπέλι (εικόνα 3.3). Το ίδιο ισχύει και για τη συσχέτιση μεταξύ συνολικού αριθμού κυστόλιθων ανά φύλλο και του μεγέθους του φύλλου (εικόνα 3.9).



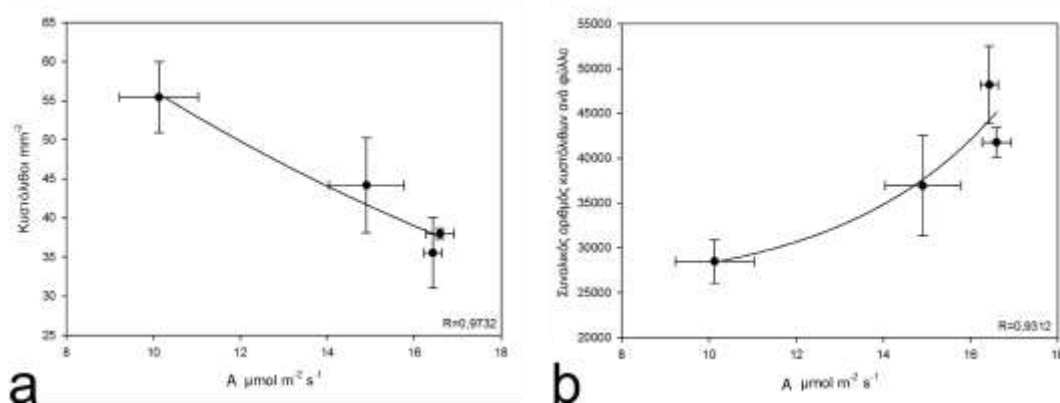
Εικόνα 3.9 **α)** Η πυκνότητα και **β)** ο συνολικός αριθμός των κυστόλιθων ανά φύλλο συναρτήσει του μεγέθους του φύλλου κατά τη διάρκεια έκπτυξης στο φυτό *P. judaica*.

Αντιπροσωπευτικές μορφές νεαρών, μέσης ωριμότητας και ώριμων φύλλων, στο οπτικό μικροκόπιο, μετά από αποχρωματισμό, φαίνονται στην εικόνα 3.10.



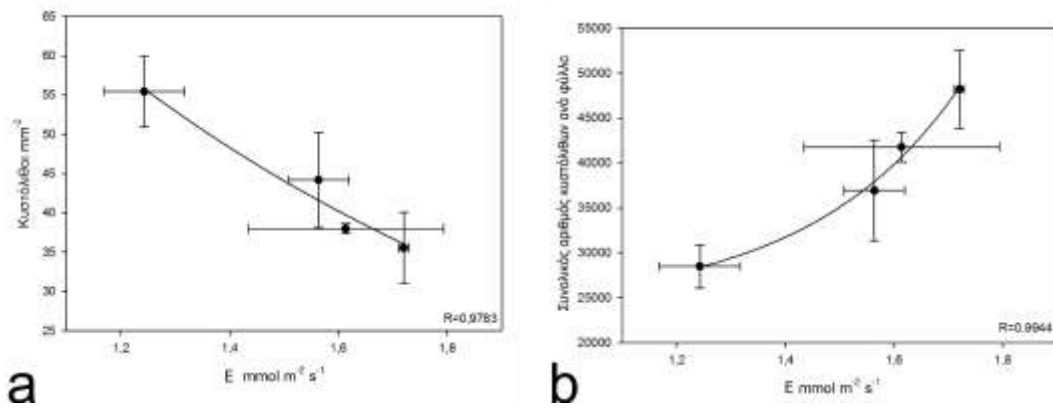
Εικόνα 3.10 Κυστόλιθοι σε αποχρωματισμένα φύλλα *P. judaica*: **a)** νεαρό φύλλο, **b)** μεσαίας ωριμότητας φύλλο και **c)** ώριμο, όπως φαίνονται στο οπτικό μικροσκόπιο.

Παρατηρείται επίσης αρνητική συσχέτιση μεταξύ της πυκνότητας των κυστόλιθων και του ρυθμού φωτοσύνθεσης. Από την άλλη πλευρά, ο συνολικός αριθμός των κυστόλιθων ανά φύλλο αυξάνεται εκθετικά αυξανόμενου του ρυθμού φωτοσύνθεσης (εικόνα 3.11).



Εικόνα 3.11 **a)** Η πυκνότητα και **b)** ο συνολικός αριθμός των κυστόλιθων ανά φύλλο συναρτήσει του ρυθμού φωτοσύνθεσης στο φυτό *P. judaica*.

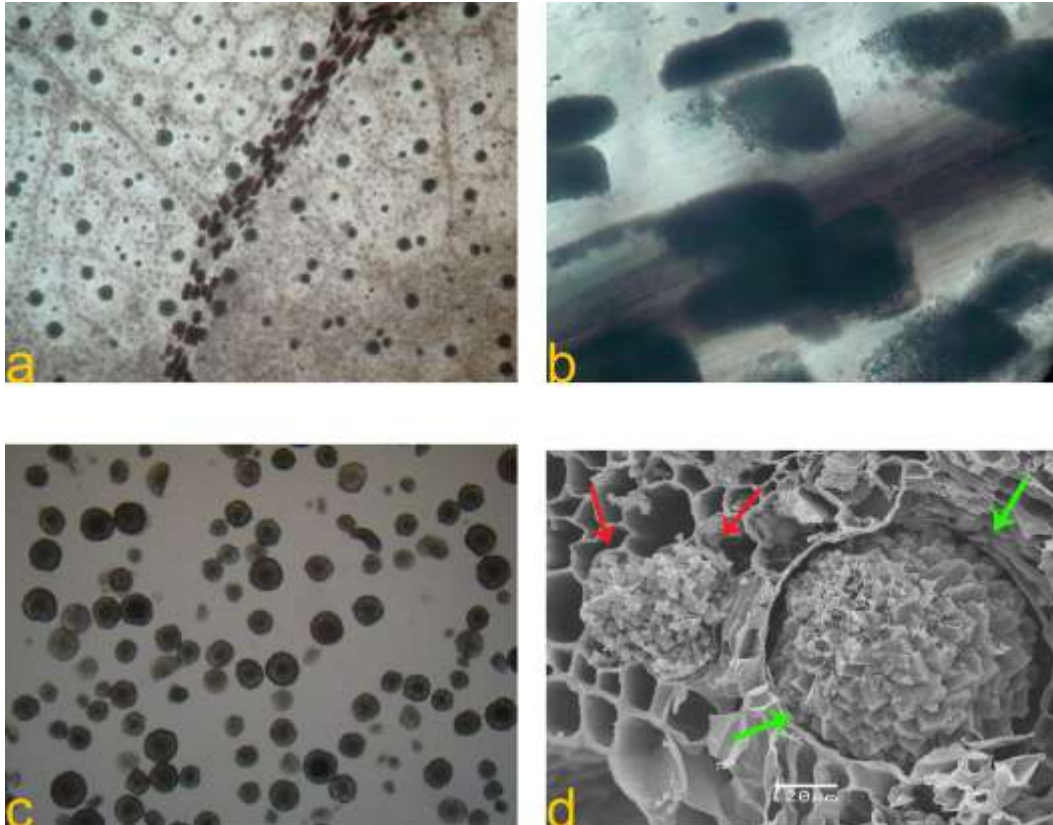
Ανάλογα αποτελέσματα προκύπτουν και από τις συσχετίσεις μεταξύ της πυκνότητας των κυστόλιθων και του συνολικού αριθμού τους με τον ρυθμό διαπνοής (εικόνα 3.12).



Εικόνα 3.12 **a)** Η πυκνότητα και **b)** ο συνολικός αριθμός των κυστόλιθων ανά φύλλο συναρτήσει του ρυθμού διαπνοής στο φυτό *P. judaica*.

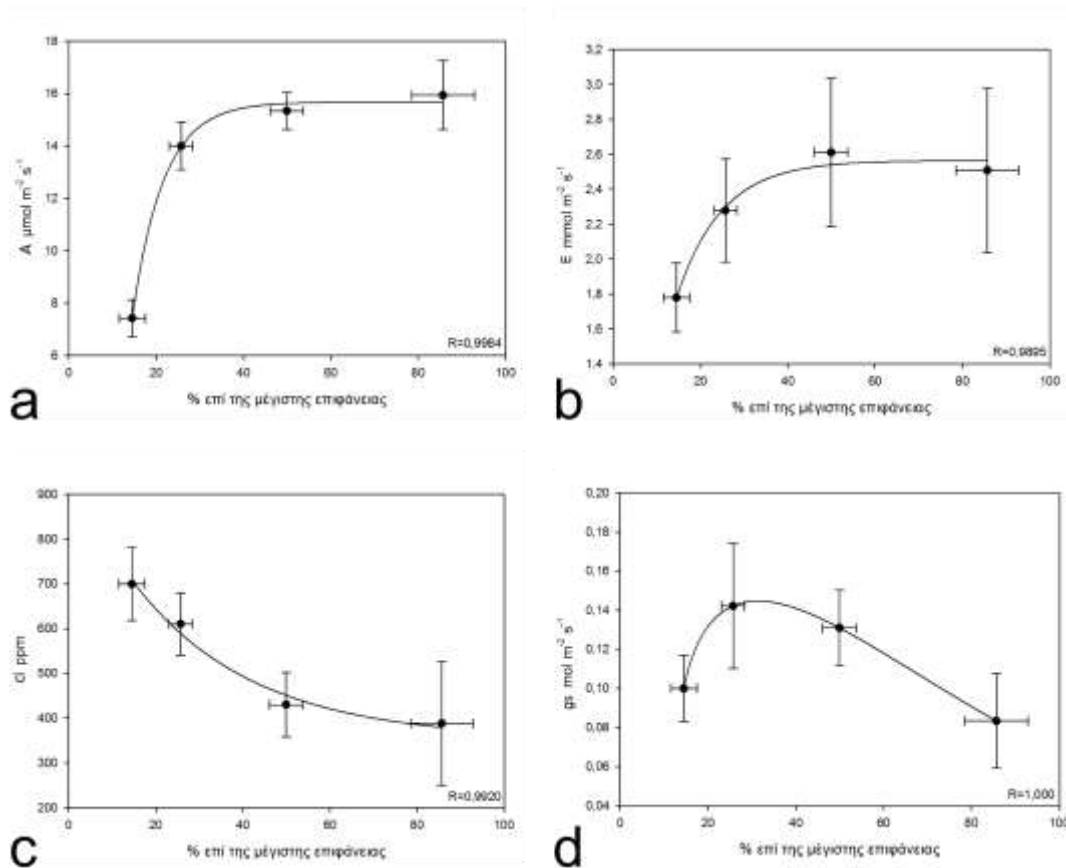
3.1.3. Η οντογένεση των κρυστάλλων σε σχέση με το αναπτυξιακό στάδιο του φύλλου του φυτού *Amaranthus hybridus* (Βλήτο).

Το βλήτο είναι C4 φυτό το οποίο συσσωρεύει, όπως και το αμπέλι, οξαλικό ασβέστιο σε ιδιοβλάστες υπό τη μορφή δρούσων. Επίσης, συσσωρεύει οξαλικό ασβέστιο και υπό τη μορφή κρυσταλλικής άμμου στα παρεγχυματικά κύτταρα του κολεού της δέσμης (εικόνες 3.13). Στα παρακάτω αποτελέσματα μετρήθηκαν οι δρούσες.



Εικόνα 3.13 **a)** Δρούσες και κρυσταλλική άμμος σε αποχρωματισμένο ώριμο φύλλο βλήτου. **b)** Κρυσταλλική άμμος στα κύτταρα του κολεού της δέσμης πρωτοταγούς νεύρωσης σε αποχρωματισμένο ώριμο φύλλο. **c)** Απομονωμένες δρούσες από ώριμα φύλλα βλήτου και **d)** μικροφωτογραφία δρούσας (πράσινα βέλη) και κρυσταλλικής άμμου (κόκκινα βέλη) σε σπασμένες τομές ώριμου φύλλου βλήτου όπως φαίνονται στο ΗΜΣ.

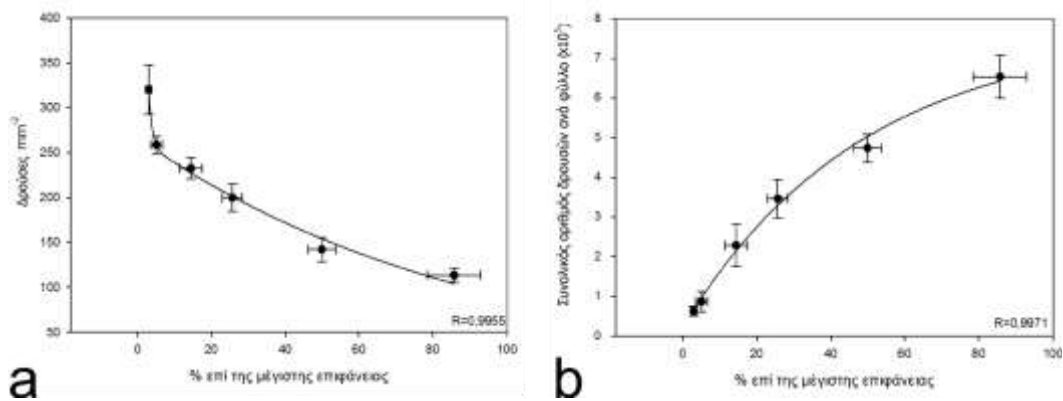
Όπως και στο περδικάκι, ο ρυθμός φωτοσύνθεσης (A) και ο ρυθμός διαπνοής (E) αυξάνονται εκθετικά αυξανομένης της επιφάνειας των φύλλων και προσεγγίζει την μέγιστη τιμή τους όταν αυτά έχουν αποκτήσει το 40% της μέγιστης επιφάνειας. Η



Εικόνα 3.14 **a)** Ο ρυθμός της φωτοσύνθεσης (A), **b)** ο ρυθμός της διαπνοής (E), **c)** η συγκέντρωση του υποστοματικού CO_2 (c_i) και **d)** η στοματική αγωγιμότητα (g_s) συναρτήσει του μεγέθους του φύλλου κατά τη διάρκεια έκπτυξης στο φυτό *A. hybridus*.

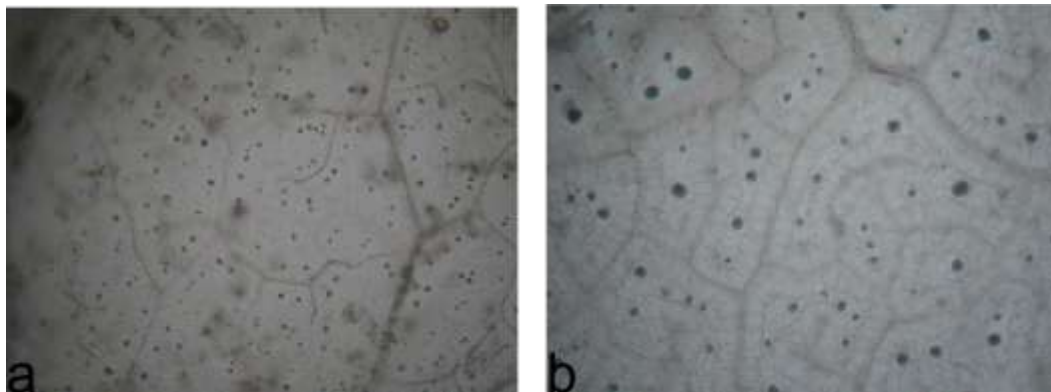
συγκέντρωση υποστοματικού CO_2 (c_i), μειώνεται εκθετικά και από τιμές διπλάσιες της ατμοσφαιρικής καταλήγει στα 400 ppm στα πλήρως ώριμα. Η στοματική αγωγιμότητα (g_s) εμφανίζει αύξηση και αποκτά μέγιστη τιμή όταν τα φύλλα έχουν επιφάνεια ίση με το 25% της μέγιστης ενώ στη συνέχεια μειώνεται (εικόνα 3.14).

Κατ' αντιστοιχία με το περδικάκι, η πυκνότητα των δρυσών και το μέγεθος του φύλλου συσχετίζονται αρνητικά, ενώ ο συνολικός αριθμός τους στο φύλλο αυξάνεται εκθετικά αυξανομένης της επιφάνειας (εικόνα 3.15).



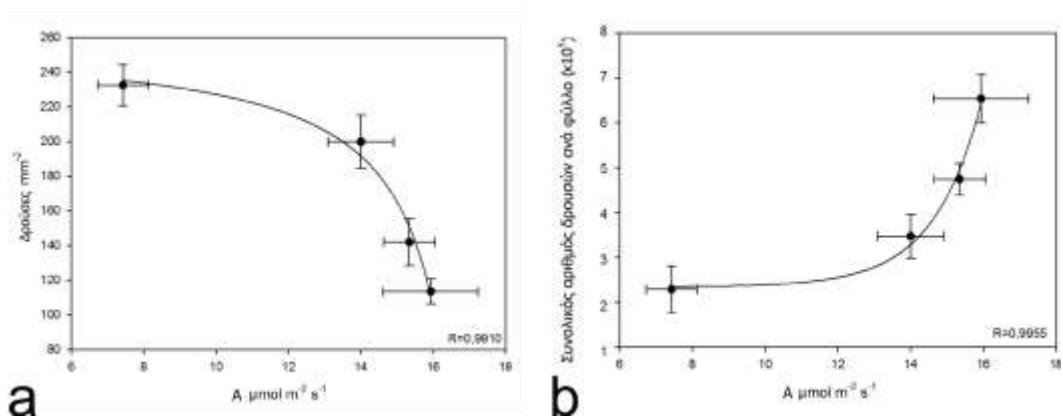
Εικόνα 3.15 **α)** Η πυκνότητα και **β)** ο συνολικός αριθμός των δρούσων ανά φύλλο συναρτήσει μεγέθους του φύλλου κατά τη διάρκεια έκπτυξης στο φυτό *A. hybridus*.

Στην εικόνα 3.16 φαίνονται οι δρούσες σε δύο αποχρωματισμένα φύλλα βλήτου διαφορετικού επιπέδου ωριμότητας.



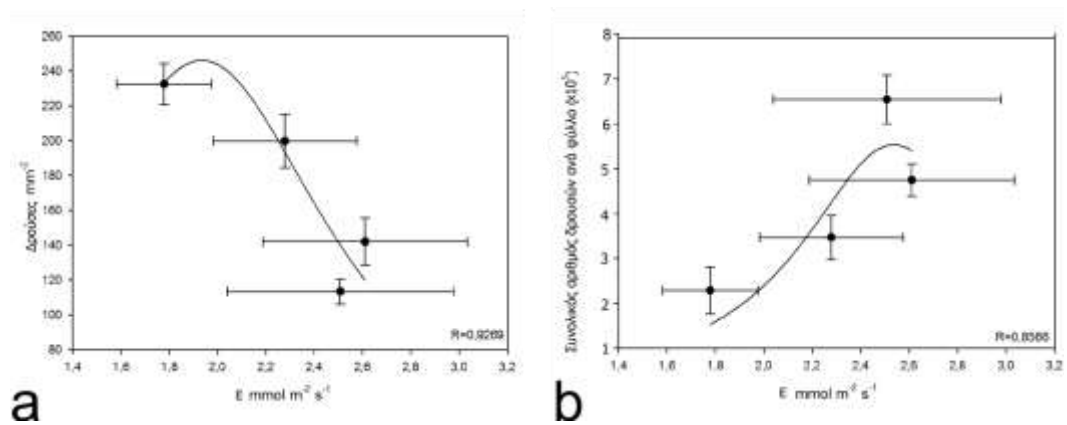
Εικόνα 3.16 Δρούσες σε αποχρωματισμένα φύλλα βλήτου: **α)** νεαρό φύλλο, **β)** ώριμο φύλλο, όπως φαίνονται στο οπτικό μικροσκόπιο.

Η συσχέτιση της πυκνότητας των κρυστάλλων και του ρυθμού φωτοσύνθεσης είναι φθίνουσα, ενώ ο συνολικός αριθμός τους στο φύλλο συσχετίζεται εκθετικά με το ρυθμό φωτοσύνθεσης (εικόνα 3.17).



Εικόνα 3.17 **α)** Η πυκνότητα και **β)** ο συνολικός αριθμός των δρούσων ανά φύλλο συναρτήσει του ρυθμού φωτοσύνθεσης στο φυτό *A. hybridus*.

Τέλος, οι συσχετίσεις της πυκνότητας των κρυστάλλων και του συνολικού αριθμού τους με τον ρυθμό διαπνοής είναι σιγμοειδείς (εικόνα 3.18).



Εικόνα 3.18 **α)** Η πυκνότητα και **β)** ο συνολικός αριθμός των δρούσων ανά φύλλο συναρτήσει του ρυθμού διαπνοής στο φυτό *A. hybridus*.

3.2. Αλλαγές στο μέγεθος των κυτταρικών εγκλειστών σε συνθήκες πενίας άνθρακα.

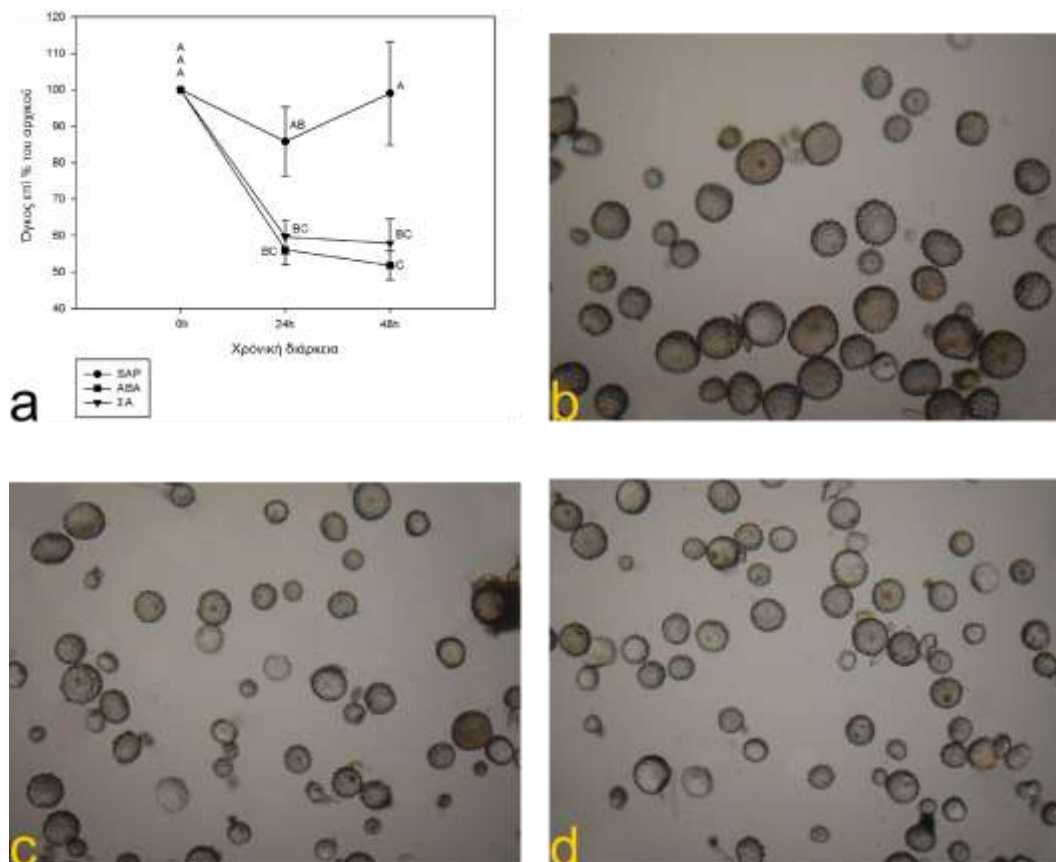
Διατυπώθηκε η υπόθεση, σύμφωνα με την οποία τα κυτταρικά εγκλειστα αποδομούνται σε συνθήκες πενίας άνθρακα ώστε να καταστεί δυνατή η συνέχιση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας μέσω της δέσμευσης του CO₂ που απελευθερώνεται από τα εγκλειστα. Για την επιβεβαίωσή της υπόθεσης αυτής, φύλλα από περδικάκι και βλήτο τοποθετήθηκαν υπό συνεχή φωτισμό σε συνθήκες πενίας άνθρακα, η οποία προκλήθηκε είτε έμμεσα (επίδραση ABA – κλείσιμο στοματίων) είτε άμεσα, με την τροποποίηση της συγκέντρωσης του CO₂ της ατμόσφαιρας (αεροστεγείς διαφανείς θαλάμους). Μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα απομονώθηκαν εγκλειστα, μετρήθηκε ο όγκος τους και εκφράστηκε ως % ποσοστό του αρχικού για κάθε επέμβαση.

3.2.1. Οι μεταβολές στο μέγεθος των κυστόλιθων σε φύλλα του *Parietaria judaica* σε συνθήκες πενίας άνθρακα.

Πείραμα Π1: Βλαστοί από περδικάκι τοποθετήθηκαν α) σε τεχνητό ανιόντα χυμό (SAP), β) σε SAP το οποίο περιείχε ABA 200μM, και γ) σε αεροστεγείς διάφανους θαλάμους ώστε η συγκέντρωση του CO₂ στην ατμόσφαιρα να παραμείνει στο σημείο αντιστάθμισης CO₂³ (ΣΑ). Οι μεταβολές του όγκου των κυστόλιθων σε 0, 24 και 48 ώρες συνεχούς φωτισμού για κάθε επέμβαση φαίνονται στην εικόνα 3.19a.

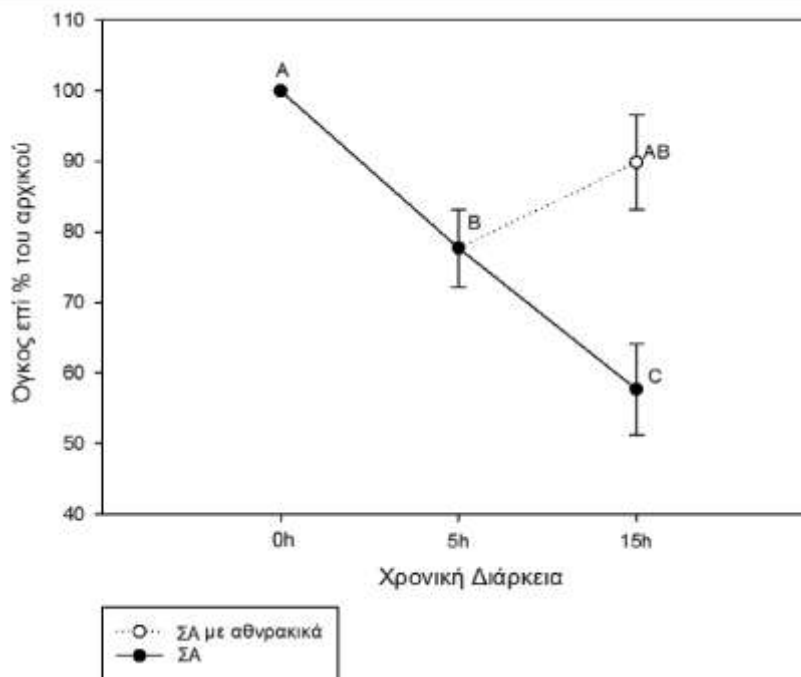
Στις τιμές που μετρήθηκαν πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις των μέσων, τόσο μεταξύ των χρονικών στιγμών δειγματοληψίας εντός της επέμβασης, όσο και μεταξύ των επεμβάσεων για κάθε χρονική στιγμή. Όπως προκύπτει, οι κυστόλιθοι των βλαστών που παρέμειναν σε SAP εμφάνισαν μείωση του όγκου τους κατά 12% στις 24 ώρες, αλλά στις 48 ώρες ανέκτησαν τον αρχικό τους όγκο. Οι βλαστοί στους οποίους προστέθηκε ABA καθώς και αυτοί που παρέμειναν στο ΣΑ εμφάνισαν σημαντική μείωση του όγκου των κυστόλιθων τους (40-45%) στις 24 ώρες. Στις 48 ώρες παρουσιάστηκε περαιτέρω μείωση (3-5%) με αποτέλεσμα, στο τέλος του 48ωρου, η συνολική μείωση του όγκου των κυστόλιθων σε σχέση με τον αρχικό να προσεγγίζει το 45-50% και στις δύο περιπτώσεις. Στην εικόνα 3.19 (b,c και d) φαίνονται οι απομονωμένοι κυστόλιθοι μετά από παραμονή 48 ωρών σε κάθε επέμβαση για κάθε επέμβαση.

³ Προκαταρκτικό πείραμα (Πείραμα Π0) έδειξε ότι το σημείο αντιστάθμισης του CO₂ στο περδικάκι κυμαίνεται μεταξύ 70 και 100 ppm.



Εικόνα 3.19 **a)** Ο όγκος των κυστόλιθων φύλλων *P. judaica* σε SAP, SAP+ABA και στο σημείο αντιστάθμισης του CO₂ για 0, 24 και 48 ώρες. Στατιστικά σημαντικά διαφέρουν μεταξύ τους οι μέσοι όροι ο οποίοι επισημαίνονται με διαφορετικά γράμματα. Απομονωμένοι κυστόλιθοι φύλλων *P. judaica* που παρέμειναν για 48 ώρες σε: SAP (**b**), SAP+ABA (**c**) και στο σημείο αντιστάθμισης του CO₂ (**d**).

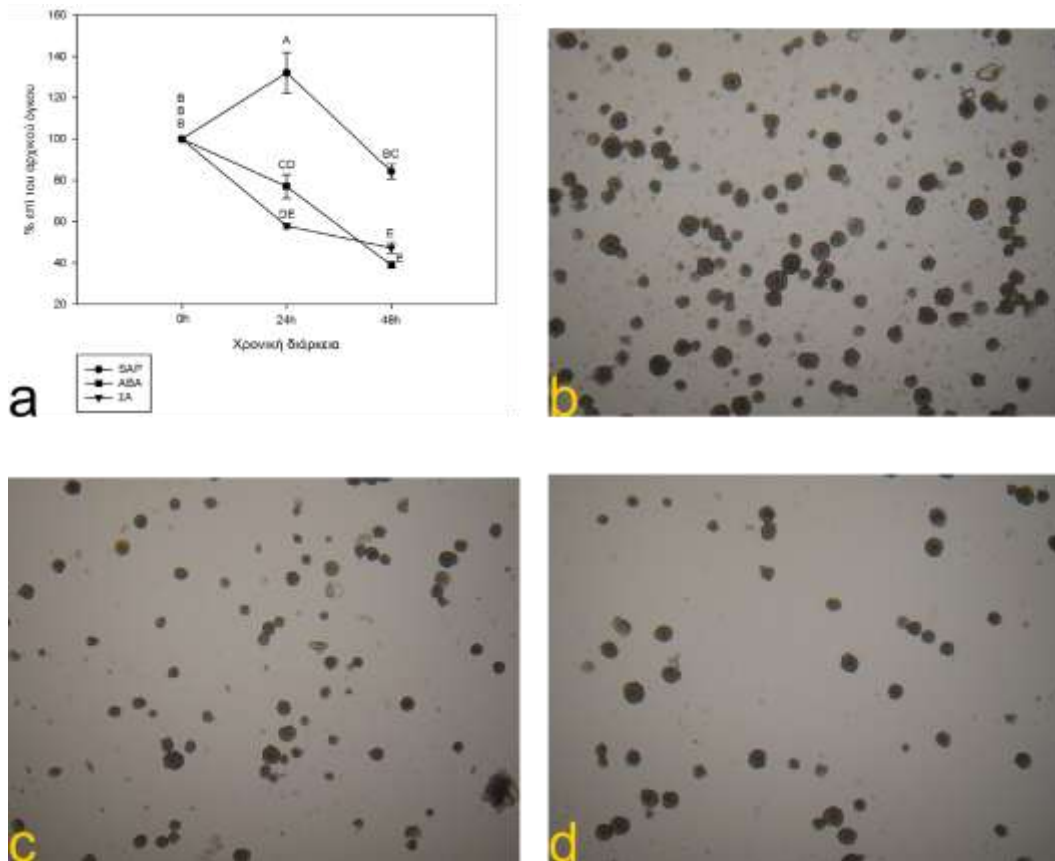
Πείραμα Π2: Η επίδραση της εφαρμογής ανθρακικών ιόντων στο θρεπτικό υπόστρωμα (SAP) φυτών που βρίσκονταν σε ατμόσφαιρα με CO₂ στο σημείο αντιστάθμισης αποτυπώνεται στην εικόνα 3.20. Όπως φαίνεται, μετά την διέλευση 5 ωρών ο όγκος των κυστόλιθων είχε μειωθεί κατά 22% και συνέχισε να μειώνεται με αποτέλεσμα μετά το πέρας 15 ωρών να έχει τιμή ίση με το 55% του αρχικού. Στα φυτά όμως στο θρεπτικό διάλυμα των οποίων προστέθηκαν ανθρακικά μετά την δειγματοληψία των 5 ωρών, παρατηρήθηκε αύξηση του όγκου των κυστολιθων με αποτέλεσμα στις 15 ώρες αυτός να είναι στο 90% του αρχικού.



Εικόνα 3.20 Ο όγκος των κυστόλίθων φύλλων *P. judaica* που παρέμειναν στο σημείο αντιστάθμισης του CO_2 , με ή χωρίς την προσθήκη ανθρακικών ιόντων, για 0, 5 και 15 ώρες. Στατιστικά σημαντικά διαφέρουν μεταξύ τους οι μέσοι όροι οι οποίοι επισημαίνονται με διαφορετικά γράμματα.

3.2.2. Οι μεταβολές στο μέγεθος των δρουσών σε φύλλα του *Amaranthus hybridus* (βλήτο) σε συνθήκες πενίας άνθρακα.

Πείραμα Β1: Πραγματοποιώντας πείραμα αντίστοιχο με αυτό στο περδικάκι (Πείραμα Π1) προέκυψε μεταβολή του όγκου των δρουσών η οποία φαίνεται στην εικόνα 3.21a. Όπως και στο περδικάκι, οι δρούσες των φύλλων τα οποία τοποθετήθηκαν σε διάλυμα ABA, καθώς και αυτών που παρέμειναν στο σημείο αντιστάθμισης παρουσίασαν μείωση του όγκου τους στις 24 ώρες και περαιτέρω μείωση μέχρι τις 48 με τις τελικές τιμές να είναι στο 40-50% των αρχικών. Αντίθετα, οι δρούσες των φύλλων που τοποθετήθηκαν σε διάλυμα SAP εμφάνισαν μια αύξηση του όγκου τους της τάξης του 35% στις 24 ώρες, ωστόσο στη συνέχεια ο όγκος τους μειώθηκε και στις 48 ώρες είχε τιμές στο 85% του αρχικού. Στις εικόνες 3.21(b, c και d) φαίνονται οι απομονωμένες δρούσες μετά από παραμονή 48 ωρών σε κάθε επέμβαση.



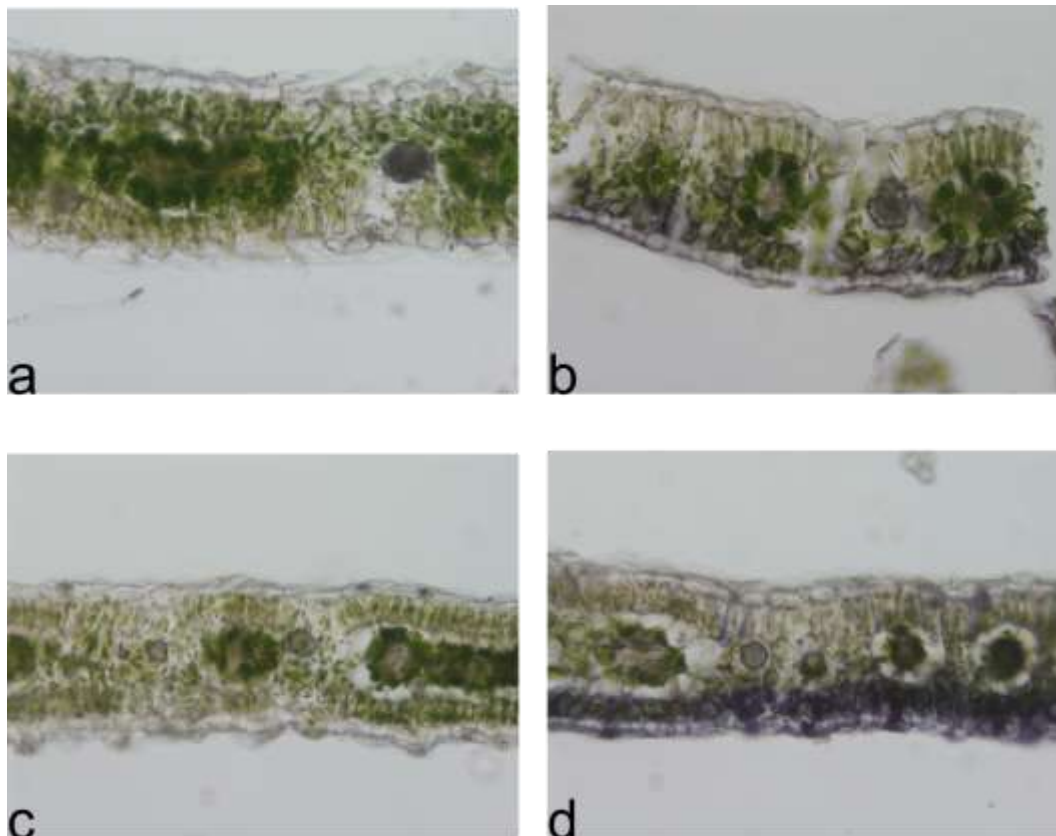
Εικόνα 3.21 **a)** Ο όγκος των δροσών φύλλων *A. hybridus* σε SAP, SAP+ABA και στο σημείο αντιστάθμισης του CO₂ για 0, 24 και 48 ώρες. Στατιστικά σημαντικά διαφέρουν μεταξύ τους οι μέσοι όροι ο οποίοι επισημαίνονται με διαφορετικά γράμματα. Απομονωμένες δρούσες από φύλλα *A. hybridus* που παρέμειναν για 48 ώρες σε: SAP (**b**), SAP+ABA (**c**) και στο σημείο αντιστάθμισης του CO₂ (**d**).

3.3. Ιστοχημικός εντοπισμός της οξαλικής οξειδάσης και της καταλάσης στο *Amaranthus hybridus*.

Το οξαλικό οξύ που προκύπτει από τη διάλυση του οξαλικού ασβεστίου στο βλήτο μπορεί να διασπαστεί ενζυμικά μέσω της οξαλικής οξειδάσης προς H_2O_2 και CO_2 . Σύμφωνα με την υπόθεση εργασίας, σε συνθήκες πείνας άνθρακα (κλείσιμο στομάτων) τα φύλλα αποδομούν τους κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου ώστε να εκμεταλλευτούν το παραγόμενο CO_2 στην φωτοσυνθετική διαδικασία. Επομένως στις συνθήκες αυτές αναμένεται ενεργοποίηση και αύξηση της δραστηριότητας της οξαλικής οξειδάσης.

Θα πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη ότι το παραγόμενο υπεροξείδιο είναι τοξικό για τους ιστούς. Αναμένεται λοιπόν αύξηση και της δραστηριότητας της καταλάσης, η οποία καταλύει την διάσπαση του υπεροξειδίου σε H_2O και O_2 . Για την επιβεβαίωση αυτών των υποθέσεων πραγματοποιήθηκε ιστοχημικός εντοπισμός των δύο αυτών ενζύμων τόσο σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν σε συνθήκες πείνας άνθρακα (υδατική καταπόνηση, εφαρμογή ABA, SA), ενώ πραγματοποιήθηκε και ενζυμική δοκιμή για τον υπολογισμό της δραστηριότητας της οξαλικής οξειδάσης.

Πείραμα B2: Ο ιστοχημικός εντοπισμός της οξαλικής οξειδάσης σε φυτά control και καταπονημένα φυτά φαίνεται στην εικόνα 3.22. Όταν στο διάλυμα εντοπισμού δεν έχει προστεθεί οξαλικό οξύ (υπόστρωμα της οξαλικής οξειδάσης), δεν παρατηρείται χρώση και στους δύο χειρισμούς. Με την προσθήκη ωστόσο του υποστρώματος, παρατηρείται χρώση στα κύτταρα του σπογγώδους παρεγχύματος καθώς και στα κύτταρα της επιδερμίδας της αποαξονικής επιφάνειας του φύλλου. Η χρώση είναι πολύ έντονη στα καταπονημένα φυτά και ήπια στα control. Τα ίδια αποτελέσματα προέκυψαν όταν τα φύλλα παρέμειναν για 5 ώρες σε διάλυμα SAP και ABA αντίστοιχα. Σε όλες τις περιπτώσεις το ένζυμο δεν εντοπίζεται στα κύτταρα του κολεού της δέσμης ή στους ιδοβλάστες που σχηματίζουν τις δρούσες.



Εικόνα 3.22 Ιστοχημικός εντοπισμός της οξαλικής οξειδάσης σε εγκάρσιες τομές φύλλων φυτών: **a)** μαρτύρων απουσία οξαλικού οξέως στο διάλυμα της χρωστικής (τυφλό), **b)** μαρτύρων παρουσία οξαλικού οξέως στο διάλυμα της χρωστικής, **c)** καταπονημένων φυτών απουσία οξαλικού οξέως στο διάλυμα της χρωστικής (τυφλό) και **d)** καταπονημένων φυτών παρουσία οξαλικού οξέως στο διάλυμα της χρωστικής στο φυτό *A. Hybridus*.

Πείραμα Β3: Για τον υπολογισμό της διαφοράς του επιπέδου της δραστηριότητας της οξαλικής οξειδάσης ανάμεσα στα φυτά που βρίσκονταν σε καλή υδατική κατάσταση και σε αυτά που βρίσκονταν σε υδατική καταπόνηση πραγματοποιήθηκε ενζυμική δοκιμή της οξαλικής οξειδάσης με φασματοφωτομετρική μέθοδο. Γι αυτό τον σκοπό χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα φύλλων από φυτά των δύο επεμβάσεων (Control και Καταπονημένα) και εξετάστηκε η δραστηριότητα του ενζύμου με την εμφάνιση χρώσης τόσο στο υπερκείμενο⁴ όσο και στο ίζημα που προέκυψε μετά από φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος. Η δραστηριότητα της οξαλικής οξειδάσης καθώς και οι τιμές του υδατικού

⁴ Στο υπερκείμενο (κυτταρικός χυμός) η δραστηριότητα της οξαλικής οξειδάσης ήταν μηδενική σε όλους τους χειρισμούς. Γι αυτό στον πίνακα 3.1 η δραστηριότητα της οξαλικής οξειδάσης αναφέρεται στο ίζημα (μεμβράνες και κυτταρικά τοιχώματα) της φυγοκέντρησης.

δυναμικού, της στοματικής αγωγιμότητας και του όγκου των κρυστάλλων των φύλλων των δύο χειρισμών φαίνονται στον πίνακα 3.1⁵

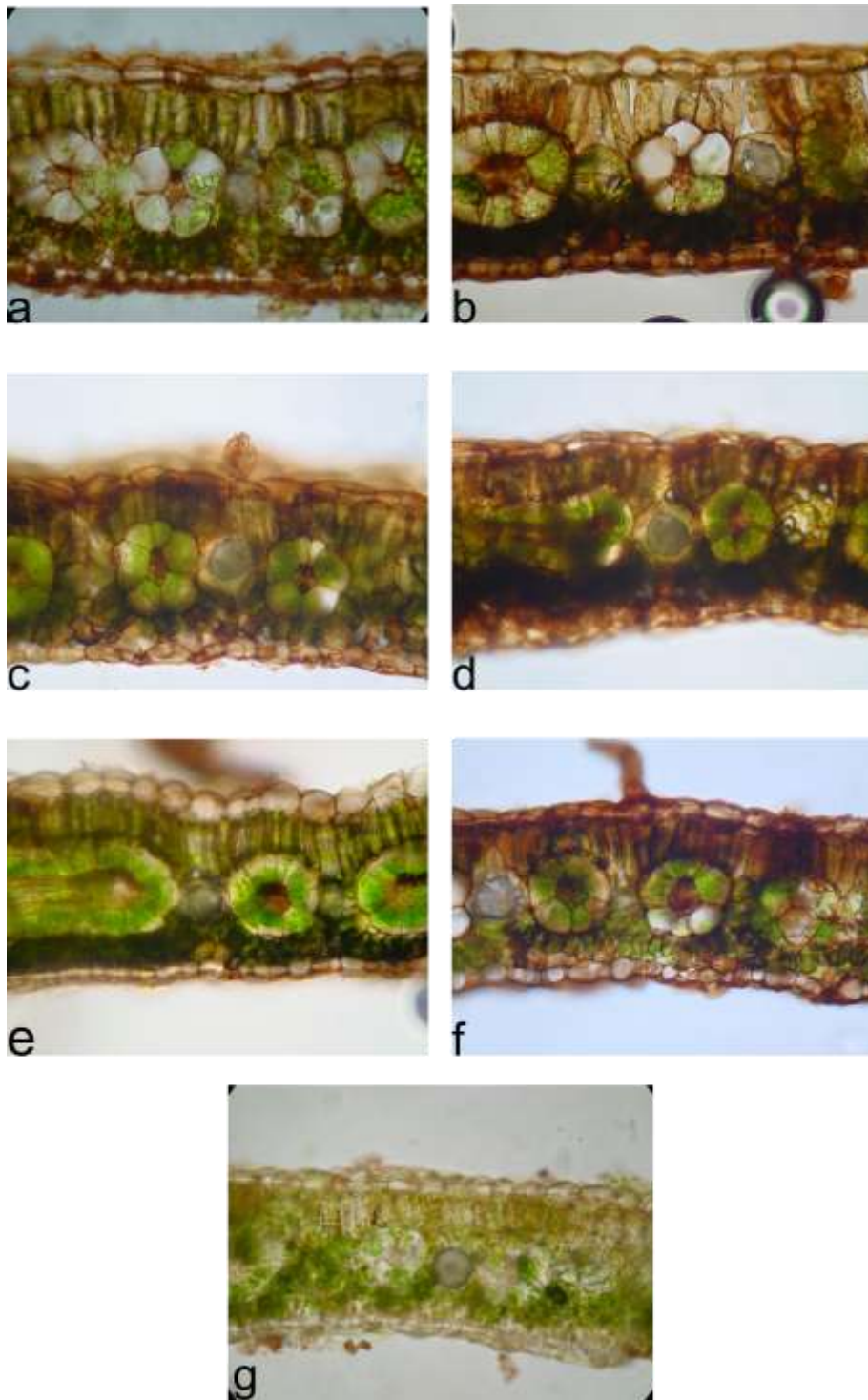
Πίνακας 3.1 Υδατικό δυναμικό, στοματική αγωγιμότητα, δραστικότητα οξαλικής οξειδάσης και όγκος κρυστάλλων των φύλλων φυτών σε καλή υδατική κατάσταση και φυτών σε υδατική καταπόνηση.

Επέμβαση	Υδατικό δυναμικό Ψ_w (MPa)	Στοματική αγωγιμότητα g_s mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹	Δραστικότητα οξαλικής οξειδάσης (nmoles H ₂ O ₂ min ⁻¹ gr v.β. ⁻¹)	Όγκος κρυστάλλων μm^3
Φυτά σε καλή υδατική κατάσταση	-0,976±0,077 ^α	0,33±0,019 ^α	39,2±1,8 ^α	11579,78±499,16 ^α
Φυτά σε υδατική καταπόνηση	-1,416±0,079 ^β	0,008±0,0007 ^β	120,9±26,9 ^β	560,18±19,49 ^β

Οι διαφορές που παρατηρούνται στη δραστικότητα της οξαλικής οξειδάσης μεταξύ των φύλλων control και των καταπονημένων είναι στατιστικά σημαντικές ($p<0.05$).

Πείραμα B4: Ο ιστοχημικός εντοπισμός της καταλάσης σε φύλλα που παρέμειναν για 24 ώρες σε SAP και σε SAP+ABA έδειξε πως το ένζυμο εντοπίζεται κυρίως στο σπογγώδες παρέγχυμα και πιθανότατα εδράζεται στις μεμβράνες ή στα κυτταρικά τοιχώματα. Ωστόσο, σε φύλλα που αναπτύχθηκαν στο σημείο αντιστάθμισης CO₂ η χρωστική έβαψε εντονότερα το πασσαλώδες παρέγχυμα. Όταν χρησιμοποιήθηκαν παρεμποδιστές της καταλάσης στο διάλυμα της χρωστικής, εμφανίστηκε ήπια χρώση των ιστών. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στη δράση ισοενζύμων καταλάσης που δεν παρεμποδίζονται από τους παρεμποδιστές της, είτε στη δράση της υπεροξειδάσης η οποία επίσης δύναται να σχηματίσει έγχρωμα σύμπλοκα με τη χρωστική (DAB) (Sexton and Hall, 1991; Ruzin, 1999). Σε όλες τις περιπτώσεις το ένζυμο δεν ανιχνεύτηκε στα κύτταρα του κολεού της δέσμης ή στους ιδιοβλάστες που σχηματίζουν τις δρούσες (εικόνα 3.23).

⁵ Αντίστοιχο πείραμα είχε πραγματοποιηθεί προκαταρκτικά και σε φύλλα στα οποία είχε γίνει εφαρμογή ABA και οι τιμές της δραστικότητας του ενζύμου ήταν ενδιάμεσα των τιμών του control και των καταπονημένων (84,05±23,97).



Εικόνα 3.23 Ιστοχημικός εντοπισμός της καταλάσης σε εγκάρσιες τομές φύλλων: **a)** φυτών μαρτύρων παρουσία παρεμποδιστή της καταλάσης στο διάλυμα της χρωστικής (τυφλό), **b)** φυτών μαρτύρων απουσία παρεμποδιστή της καταλάσης στο διάλυμα της χρωστικής, **c)** φυτών που παρέμειναν στο διάλυμα ABA παρουσία παρεμποδιστή στο διάλυμα της χρωστικής (τυφλό), **d)** φυτών που παρέμειναν στο διάλυμα ABA απουσία παρεμποδιστή στο διάλυμα της χρωστικής, **e)** φυτών που παρέμειναν στο ΣΑ παρουσία παρεμποδιστή στο διάλυμα της χρωστικής (τύφλο), **f)** φυτών που παρέμειναν στο ΣΑ απουσία παρεμποδιστή στο διάλυμα της χρωστικής και **g)** φυτών μαρτύρων απουσία H_2O_2 στο διάλυμα της χρωστικής (τυφλό) στο φυτό *A. hybridus*.

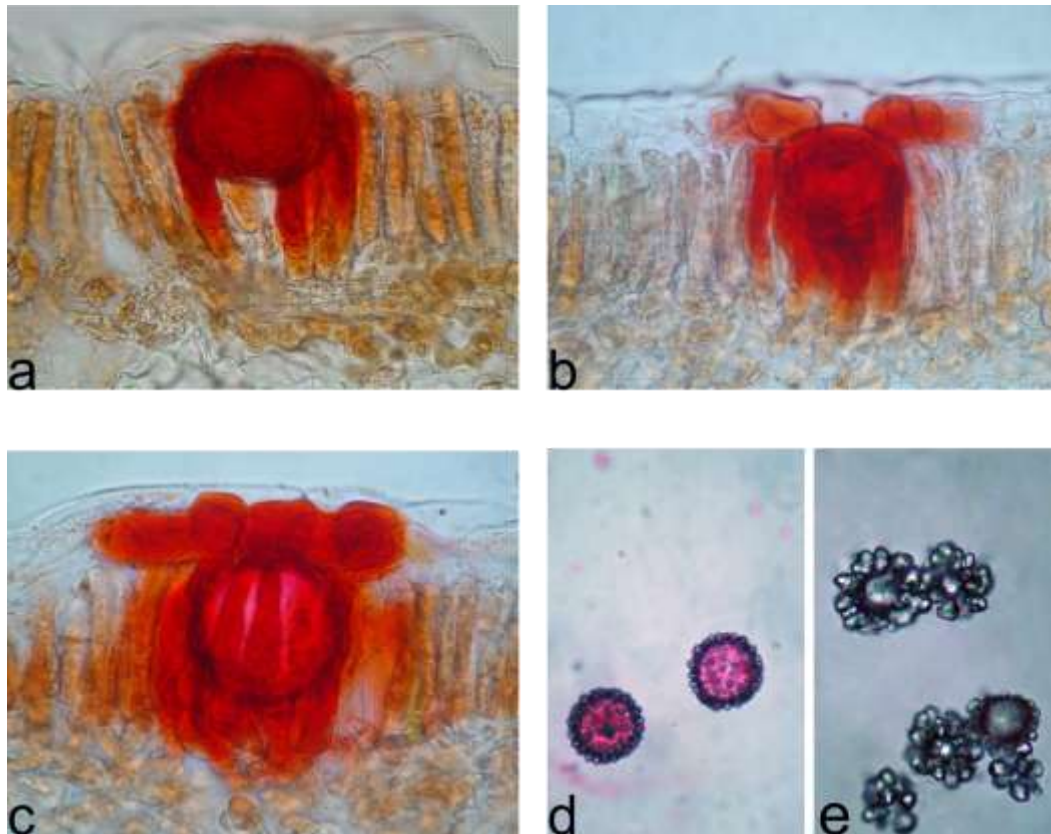
3.4. Ιστοχημικός εντοπισμός των κατιόντων Ca^{+2} σε τομές του *Partietaria judaica* και του *Amaranthus hybridus* με την χρωστική alizarine red-s.

Σύμφωνα με την διατυπωθείσα υπόθεση εργασίας, σε συνθήκες πείνας άνθρακα τα φυτά αποδομούν το οξαλικό ή το ανθρακικό ασβέστιο των κυτταρικών εγκλείστων και χρησιμοποιούν το παραγόμενο CO_2 για τη διατήρηση ικανοποιητικού φωτοσυνθετικού ρυθμού. Επειδή το πρώτο στάδιο στην αποδόμηση των κυτταρικών εγκλείστων αποτελεί η διάλυση του αντίστοιχου άλατος, αναμένεται αύξηση της συγκέντρωσης των κατιόντων Ca^{+2} πλησίον των κυτταρικών εγκλείστων. Για την επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής πραγματοποιήθηκε ιστοχημικός εντοπισμός των ιόντων Ca^{+2} με τη χρήση της χρωστικής Alizarine red-s, η οποία δημιουργεί έγχρωμα χηλικά σύμπλοκα με αυτά, σε φύλλα control και σε φύλλα που παρέμειναν σε συνθήκες πείνας άνθρακα (ABA ή ΣΑ).

3.4.1. Ιστοχημικός εντοπισμός των κατιόντων Ca^{+2} στο *Partietaria judaica* (περδικάκι) (Πείραμα Π3)

Στην εικόνα 3.24 φαίνεται η ανίχνευση των κατιόντων Ca^{+2} , όπως προκύπτει από την εμφάνιση χρώσης, σε φύλλα control, σε φύλλα που παρέμειναν σε ABA και σε φύλλα που παρέμειναν στο ΣΑ.

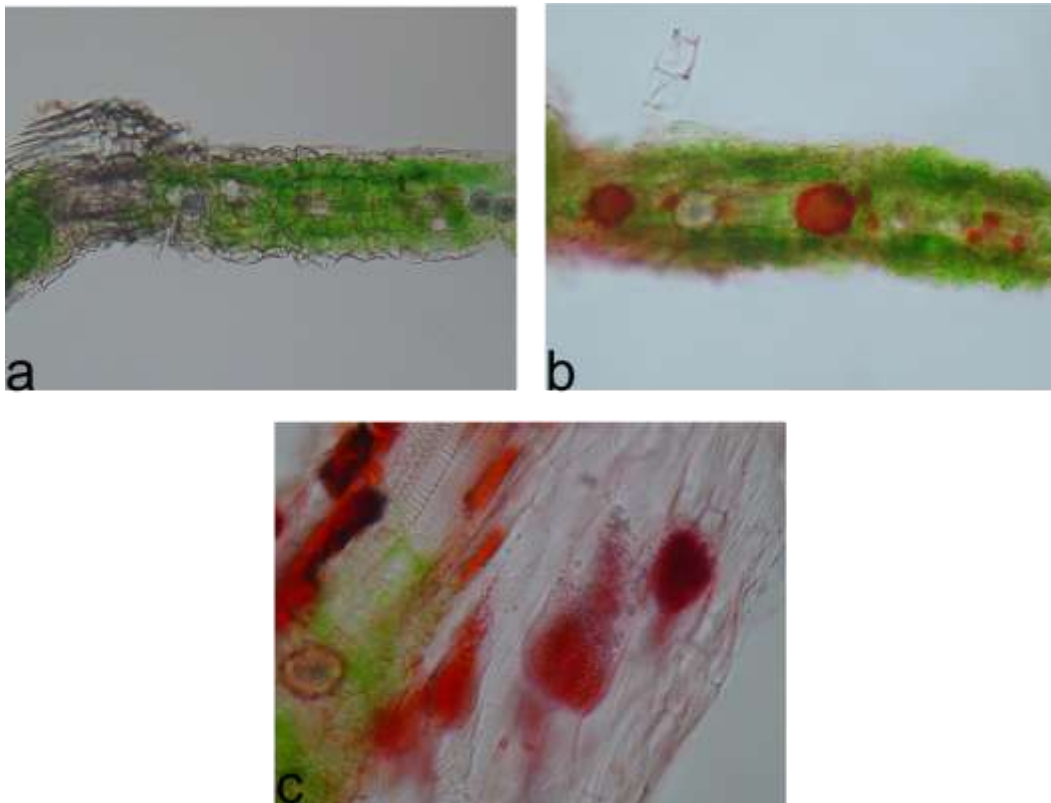
Είναι εμφανές πως η χρωστική δίνει θετική αντίδραση σε μια ομάδα κυττάρων που βρίσκονται σε άμεση επαφή με τη λιθοκύστη, καθώς και την ίδια. Η χρώση είναι εντονότερη στις επεμβάσεις πείνας άνθρακα (ABA και ΣΑ) απ' ότι στο control, ενώ στις μεταχειρίσεις αυτές φαίνεται να βάφονται και τα επιδερμικά κύτταρα που βρίσκονται σε επαφή με τη λιθοκύστη.



Εικόνα 3.24 Χρώση ιόντων Ca^{+2} με τη χρήση χρωστικής *alizarin red-s* σε εγκάρσιες τομές *P. judaica*: **a)** φύλλων control, **b)** φύλλων που παρέμειναν το ΣΑ και **c)** φύλλων που παρέμειναν σε διάλυμα ABA. **d)** Χρωματισμένοι απομονωμένοι κυστόλιθοι σε νερό. **e)** Απομονωμένοι κυστόλιθοι σε νερό χωρίς χρώση.

3.4.2. Ιστοχημικός εντοπισμός των κατιόντων Ca^{+2} στο *Amaranthus hybridus* (βλήτο) (Πείραμα B5).

Στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 3.25) φαίνονται οι θέσεις στις οποίες εμφανίζεται χρώση λόγω της ύπαρξης κατιόντων Ca^{+2} , σε τομές φύλλων από φυτά σε καλή υδατική κατάσταση (control) και από φυτά σε υδατική καταπόνηση. Στα control φυτά δεν εντοπίζεται χρώση ενώ στα καταπονημένα φυτά η χρωστική δίνει θετική αντίδραση στους ιδιοβλάστες και ορισμένα γειτονικά τους κύτταρα, καθώς και στην κρυσταλλική άμμο στα παρεγχυματικά κύτταρα των ηθμαγγειωδών δεσμίδων.



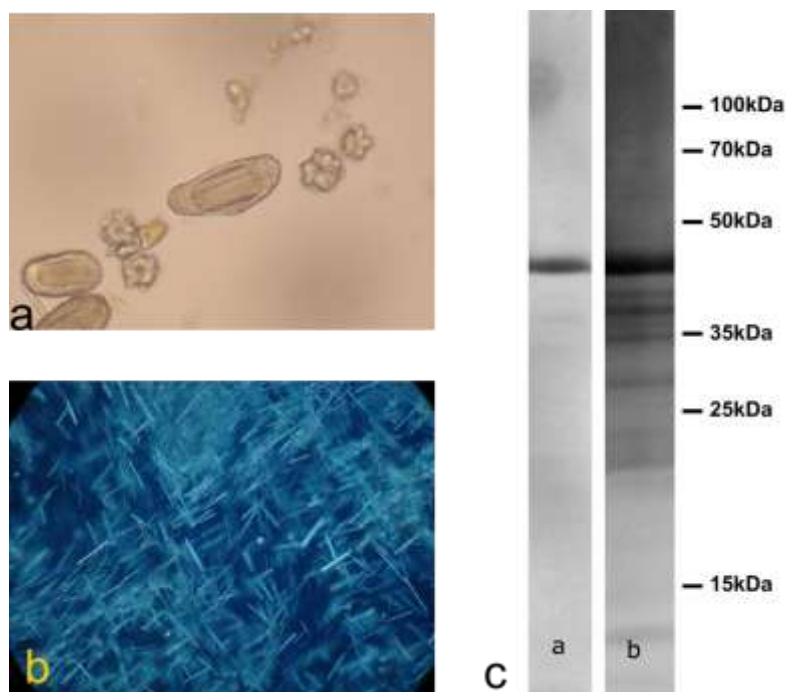
Εικόνα 3.25 Χρώση ιόντων Ca^{+2} στο *A. hybridus* με τη χρήση χρωστικής *alizarine red-s* σε εγκάρσιες τομές φύλλων: **a)** από φυτά σε καλή υδατική κατάσταση, **b)** από φυτά σε υδατική καταπόνηση (μεσόφυλλο) και **c)** από φυτά σε υδατική καταπόνηση (κρυσταλλική άμμος στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες).

3.5. Ανίχνευση πρωτεϊνών στο matrix των απομονωμένων ιδιοβλαστών στο *Vitis vinifera* (αμπέλι) (Πείραμα A1).

Οι ραφίδες του αμπελιού σχηματίζονται εντός ενός πρωτεϊνικού περιβλήματος (matrix). Το περίβλημα αυτό είναι αδιάλυτο σε οργανικούς διαλύτες (κατά την απομόνωση των ραφίδων σε ισοπροπανόλη παραμένει ανέπαφο) (εικόνα 3.26a), ενώ όταν έρθει σε επαφή με το νερό διαλύεται αμέσως απελευθερώνοντας τις ραφίδες (εικόνα 3.26b).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στο matrix εντοπίζονται πρωτεΐνες οι οποίες συμβάλλουν στην δόμηση και την αποδόμηση των κρυστάλλων του οξαλικού ασβεστίου. Για την επιβεβαίωση των βιβλιογραφικών πηγών πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση και χρώση των πρωτεϊνών του matrix που απομονώθηκε από τους ιδιοβλάστες νεαρών φυτών αμπελιού.

Στην εικόνα 3.26c φαίνονται οι ζώνες που εμφανίζονται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και με χρώση με Coomassie Blue (a) και AgNO₃ (b). Όπως προκύπτει στο matrix του αμπελιού εμπεριέχεται ένα πλήθος 20 περίπου πρωτεϊνών διαφορετικών μοριακών βαρών.



Εικόνα 3.26 **a)** Απομονωμένες ραφίδες και δρούσες στο αμπέλι. Διακρίνεται το matrix που περιβάλλει τις ραφίδες. **b)** Απελευθερωμένοι κρύσταλλοι μετά από την προσθήκη μιας σταγόνας νερού σε απομωνομένους ιδιοβλάστες φύλλων αμπελιού, λόγω της διάλυσης των συστατικών του matrix στο νερό. Εικόνα από μικροσκόπιο σε πεδίο πολωμένου φωτός. **c)** Οι ζώνες που προκύπτουν μετά την ηλεκτροφόρηση απομονωμένων ιδιοβλαστών φύλλων αμπελιού.

3.6. Τα χαρακτηριστικά του φθορισμού χλωροφύλλης σε διαφορετικές συνθήκες ατμόσφαιρας και φωτισμού παρουσία ή απουσία ABA

Διατυπώθηκε η υπόθεση εργασίας σύμφωνα με την οποία σε συνθήκες πείνας άνθρακα (κλειστά στόματα) τα φυτά αποδομούν τα κυτταρικά έγκλειστα και χρησιμοποιούν το παραγόμενο CO₂ για την διατήρηση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας. Για την επιβεβαίωση του δεύτερου σκέλους της υποθέσεως μετρήθηκαν τα χαρακτηριστικά του φθορισμού της χλωροφύλλης, σε μικροσκοπικό επίπεδο, σε φύλλα φυτών που είχαν παραμείνει σε διάλυμα παρουσία ή απουσία ABA (πείνα άνθρακα), υπό συνεχή φωτισμό. Η πειραματική διαδικασία, περιελάμβανε 5 στάδια, με δυνατότητα μεταβολής των συνθηκών φωτισμού και σύστασης της ατμόσφαιρας στο επίπεδο του φύλλου. Τα στάδια μπορούν να συνοψιστούν στα εξής:

- **Στάδιο 1**, τα φύλλα παρέμειναν σε ατμόσφαιρα με αναλογία αερίων ίδια με την ατμοσφαιρική (79%N, 21%O₂ και 380ppm CO₂), παρουσία ακτινικού φωτός μόνο στο οπτικό πεδίο.

- **Στάδιο 2**, Η σύσταση της ατμόσφαιρας μεταβάλλεται (99%N, 1%O₂ και 380ppm CO₂), με σκοπό να περιοριστεί η φωτοαναπνοή και η αντίδραση Mehler.

- **Στάδιο 3**, Η συγκέντρωση του CO₂ παραμένει ίδια (99%N, 1%O₂ και 0ppm CO₂), και εκτός από ακτινικό φως στο οπτικό πεδίο, το φύλλο φωτίζεται με εξωτερική πηγή φωτισμού. Ο στόχος του σταδίου αυτού είναι η πλήρης κατανάλωση του CO₂ από τους μεσοκυττάριους χώρους όχι μόνο στην περιοχή του οπτικού πεδίου αλλά και από τις γειτονικές.

- **Στάδιο 4**, Οι ατμοσφαιρικές συνθήκες παραμένουν ίδιες (99%N, 1%O₂ και 0ppm CO₂), παραμένει το ακτινικό φως στο οπτικό πεδίο χωρίς όμως την εξωτερική πηγή φωτισμού.

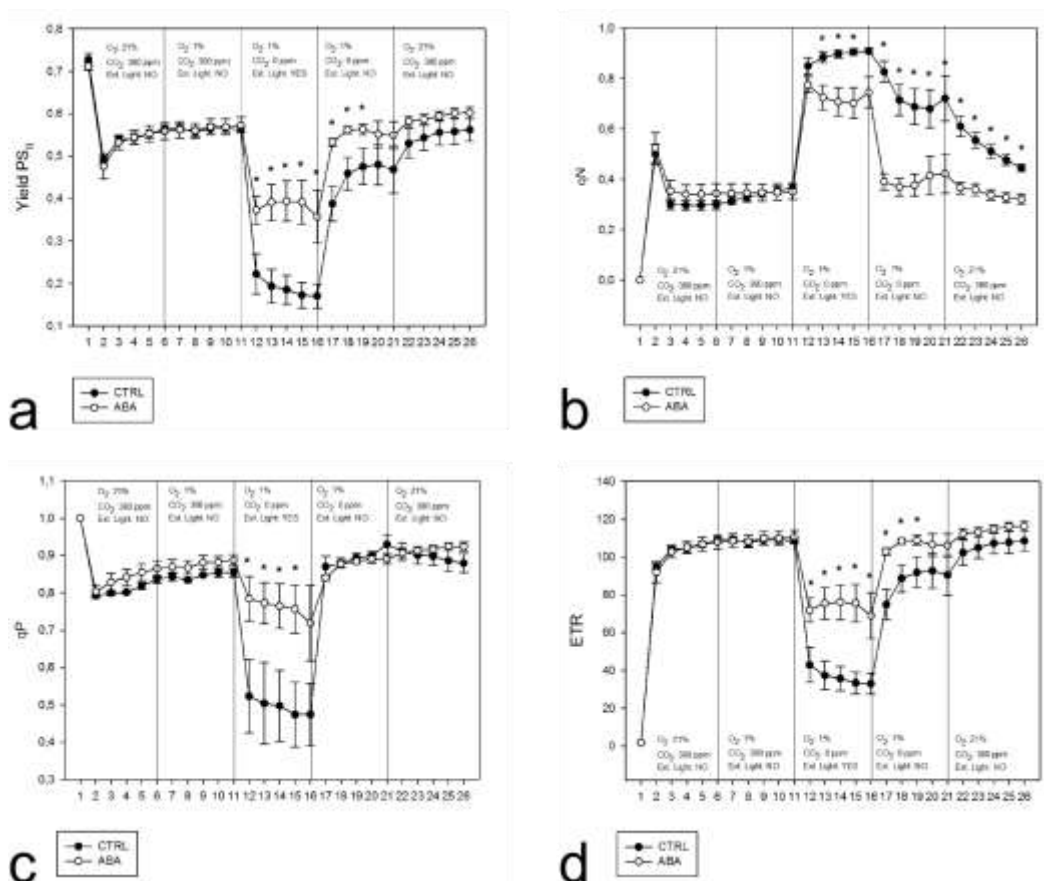
- **Στάδιο 5**, επαναφορά της ατμόσφαιρας στην αρχική αναλογία (79%N, 21%O₂ και 380ppm CO₂) με ακτινικό φως στο οπτικό πεδίο.

Τα σημαντικότερα στάδια του πειραματικού αυτού χειρισμού είναι το 3^ο, το 4^ο και το 5^ο αφού αντιπροσωπεύουν την επίδραση αντίξοων συνθηκών (πείνα άνθρακα) στη φωτοσυνθετική λειτουργία και ως εκ τούτου, σε αυτά αναμένονται οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις.

Οι παράμετροι που μετρήθηκαν ήταν η μέγιστη λειτουργική φωτοχημική ικανότητα (Yield), ο συντελεστής μη φωτοχημικής απόσβεσης (qN), ο συντελεστής φωτοχημικής απόσβεσης (qP) και ο ρυθμός μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETR) κατά τη φωτοσυνθετική ροή των ηλεκτρονίων.

3.6.1. Τα χαρακτηριστικά του φθορισμού της χλωροφύλλης σε διαφορετικές συνθήκες ατμόσφαιρας και φωτισμού παρουσία ή απουσία ABA στο *Parietaria judaica* (Πείραμα Π4).

Στην εικόνα 3.27 φαίνονται οι μεταβολές στα χαρακτηριστικά του φθορισμού της χλωροφύλλης σε φύλλα *P. judaica* που παρέμειναν σε συνεχή φωτισμό για 5 ώρες παρουσία ABA ή απουσία (control).



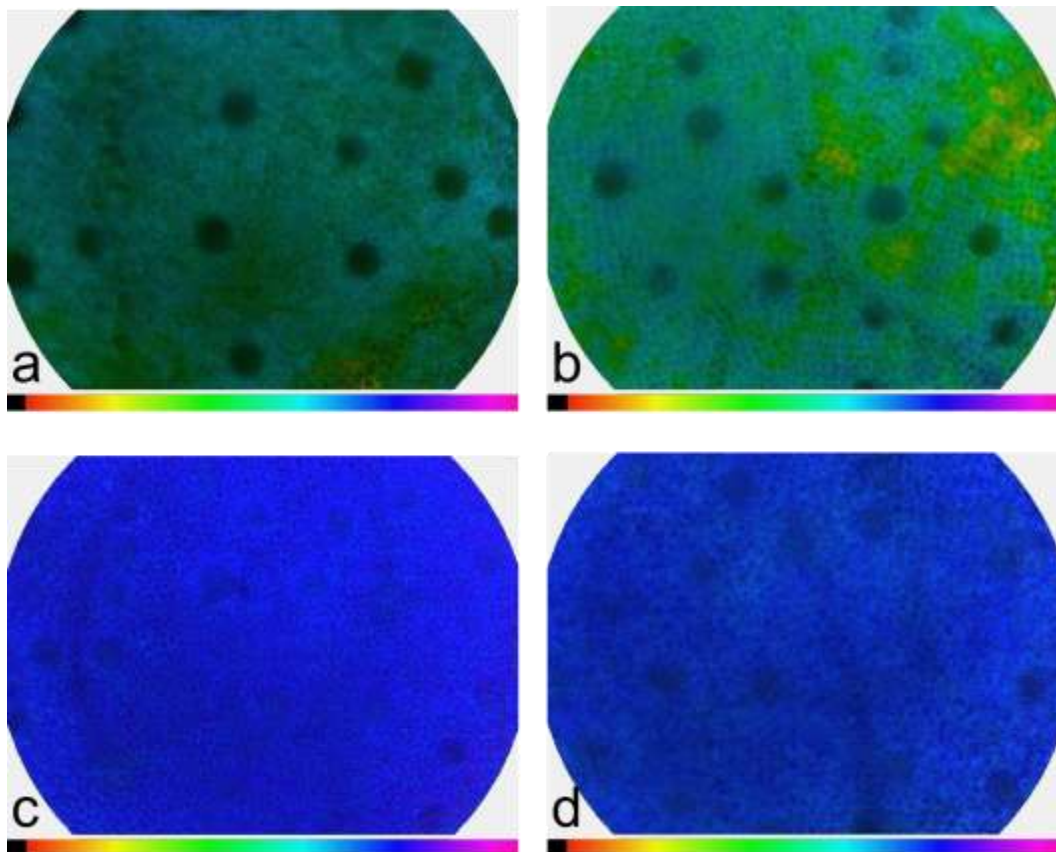
Εικόνα 3.27 **a)** Η λειτουργική φωτοχημική ικανότητα του PSII (yield PSII), **b)** ο συντελεστής μή φωτοχημικής απόσβεσης qN, **c)** Ο συντελεστής φωτοχημικής απόσβεσης qp και **d)** Ο φαινόμενος ρυθμός γραμμικής ροής ηλεκτρονίων ETR, σε φύλλα *P. judaica* που παρέμειναν για 5 ώρες υπό συνεχή φωτισμό σε control και ABA (Υλικά και Μέθοδοι: Κεφ. 2.8) στα πέντε πειραματικά στάδια. Στα σημεία που επισημαίνονται με * οι μέσοι διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.27, η μέγιστη δυναμική φωτοχημική ικανότητα (F_v/F_{max}) (σημείο 1 στον x άξονα) παρουσιάζει τις ίδιες τιμές και στις δύο επεμβάσεις. Στη συνέχεια, κατά το πρώτο και δεύτερο στάδιο, και οι δύο επεμβάσεις έχουν ίδιες τιμές μέγιστης λειτουργικής φωτοχημικής ικανότητας (yield). Ωστόσο, από την έναρξη του τρίτου σταδίου παρατηρείται διαφοροποίηση. Ειδικότερα, στο τρίτο στάδιο, τα φύλλα τα οποία είχαν παραμείνει σε διάλυμα ABA διατήρησαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές yield έναντι των φύλλων control ενώ ήδη από το τέταρτο στάδιο η παράμετρος φαίνεται πως ανακάμπτει στα φύλλα ABA και επανέρχεται στις αρχικές τιμές και διατηρείται σε αυτές μέχρι και το τέλος του 5ου σταδίου. Τα φύλλα control αντιθέτως εμφανίζουν μεγάλη πτώση του yield στο τρίτο στάδιο και μόνο προς το τέλος του 5ου σταδίου αποκτούν τιμές yield που προσεγγίζουν τις αρχικές.

Αντίστοιχες μεταβολές παρατηρούνται και στο γράφημα του ρυθμού μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETR), παράμετρος η οποία συνδέεται άμεσα με το yield. Οι τιμές του συντελεστή φωτοχημικής απόσβεσης (qP) είναι ίδιες και για τις δυο επεμβάσεις σε ολόκληρη την διάρκεια του πειράματος, εκτός από το στάδιο 3 στο οποίο το qP των φύλλων control μειώνεται και αποκτά στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες τιμές έναντι αυτού των φύλλων ABA.

Ο συντελεστής μη φωτοχημικής απόσβεσης (qN) των δύο επεμβάσεων παρουσιάζει τις ίδιες τιμές στα πρώτα δύο στάδια, αλλά στο τρίτο παρατηρείται αύξηση και φτάνει σε τιμές οι οποίες είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερες στα φύλλα control έναντι των φύλλων ABA. Στο επόμενο στάδιο οι τιμές του qN των φύλλων ABA μειώνονται ταχέως και προσεγγίζουν τις, τις οποίες και διατηρούν και στο πέμπτο στάδιο, ενώ στα φύλλα control εμφανίζουν ήπια μείωση και διατηρούνται σε υψηλότερα επίπεδα από τα αρχικά ακόμα και μέχρι το τέλος του πειράματος.

Οι τιμές F_v/F_{max} φύλλων control και ABA σε μικροσκοπικό επίπεδο, όπως απεικονίζονται σε επεξεργασμένες εικόνες μέσω του εξειδικευμένου προγράμματος του φθορισμομέτρου Microscopy PAM, δείχνουν ότι οι κυστόλιθοι των φύλλων στα οποία εφαρμόστηκε ABA επηρεάζουν το F_v/F_{max} των γειτονικών τους κυττάρων το οποίο παρουσιάζει υψηλότερες τιμές έναντι των κυττάρων που βρίσκονται σε απόσταση από αυτούς, ενώ στα φύλλα control οι τιμές της παραμέτρου παρουσιάζουν ομοιομορφία (εικόνα 3.28).



Εικόνα 3.28 Οι τιμές της παραμέτρου F_v/F_m των κυττάρων σε φύλλο ABA (**a και b**) και σε φύλλο control (**c και d**) στο *P. judaica*, σε ψευδοχρωματική απεικόνιση μέσω του εξειδικευμένου προγράμματος του οργάνου Microscopy PAM. Η έγχρωμη μπάρα στο κάτω τμήμα της εικόνας παρουσιάζει τη σχετική κλίμακα των τιμών της παραμέτρου.

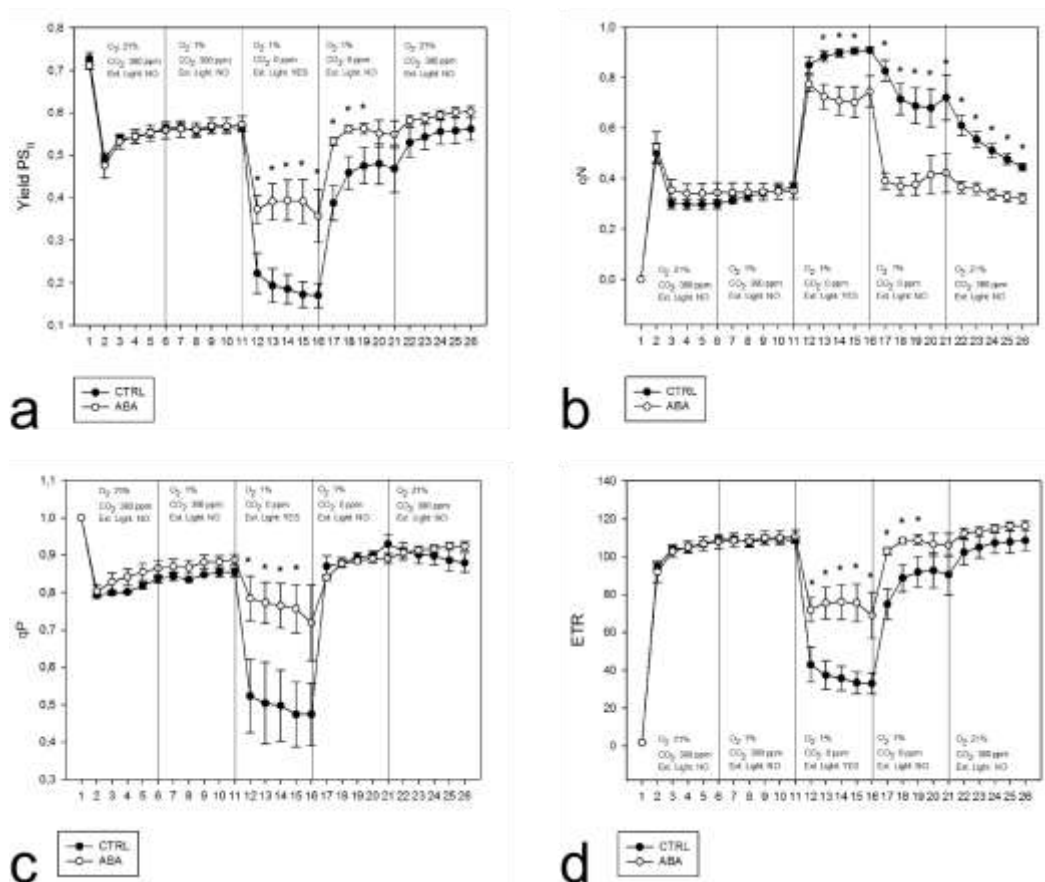
3.6.2. Τα χαρακτηριστικά του φθορισμού της χλωροφύλλης σε διαφορετικές συνθήκες ατμόσφαιρας και φωτισμού παρουσία ή απουσία ABA στο *Amaranthus hybridus* (Βλήτο) (Πείραμα B6)

Το πείραμα επαναλήφθηκε και στο *A. hybridus*, το οποίο όπως έχει ήδη αναφερθεί διαθέτει έγκλειστα οξαλικού ασβεστίου στα φύλλα του.

Η διακύμανση της λειτουργικής φωτοχημικής ικανότητας στα πέντε πειραματικά στάδια στο βλήτο (εικόνα 3.29a) έχει την ίδια μορφή με την αντίστοιχη στο περδικάκι (εικόνα 3.27a). Και σε αυτή την περίπτωση υπάρχει διαφορά στον τρόπο που γίνεται η ανάκαμψη των τιμών στις δύο επεμβάσεις κατά το 4ο και πέμπτο στάδιο, αφού τα φύλλα ABA ανακτούν τιμές αντίστοιχες με τις αρχικές πολύ συντομότερα από τα φύλλα control. Αντίστοιχη είναι και η εικόνα των μεταβολών του ETR (εικόνα 3.29d).

Όσον αφορά στο qP (εικόνα 3.29c), κατά το πρώτο και δεύτερο στάδιο, οι τιμές στα φύλλα control είναι ελαφρώς ψηλότερες έναντι αυτών των φύλλων ABA. Ωστόσο, κατά το τρίτο στάδιο η κατάσταση αντιστρέφεται, αφού το qP των φύλλων control

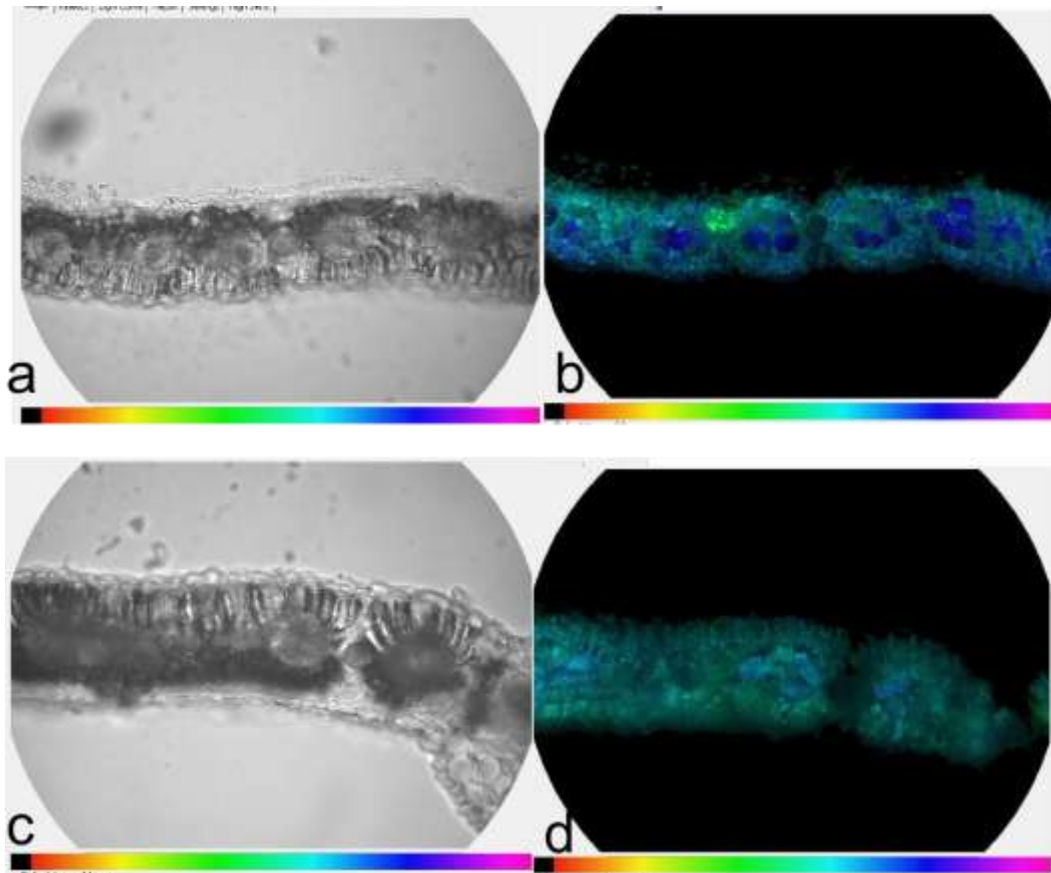
μειώνεται πολύ περισσότερο αυτού των φύλλων ABA. Στο τέταρτο στάδιο, στα φύλλα ABA επανέρχεται ταχέως στα αρχικά επίπεδα όπου και διατηρείται μέχρι και το τέλος του πέμπτου σταδίου. Αντιθέτως, στα φύλλα control η επαναφορά πραγματοποιείται σε δύο φάσεις και μόνο στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας αποκτά τιμές αντίστοιχες των αρχικών.



Εικόνα 3.29 **a)** Η λειτουργική φωτοχημική ικανότητα του PSII (yield PSII), **b)** ο συντελεστής μή φωτοχημικής απόσβεσης qN, **c)** Ο συντελεστής φωτοχημικής απόσβεσης qP και **d)** Ο φαινόμενος ρυθμός γραμμικής ροής ηλεκτρονίων ETR, σε φύλλα *A. hybridus* που παρέμειναν για 5 ώρες υπό συνεχή φωτισμό σε control και ABA (Υλικά και Μέθοδοι: Κεφ. 2.8) στα πέντε πειραματικά στάδια. Στα σημεία που επισημαίνονται με * οι μέσοι διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους.

Τέλος, όσον αφορά στο qN (εικόνα 3.28b), κατά την έναρξη του πρώτου σταδίου τα φύλλα control έχουν χαμηλότερες τιμές από αυτά του ABA, ωστόσο κατά το τέλος του σταδίου αυτού τα φύλλα control εμφανίζουν ελαφρώς υψηλότερες τιμές έναντι των φύλλων ABA, κατάσταση που επικρατεί μέχρι και τη λήξη του δευτέρου σταδίου. Στο τρίτο στάδιο παρατηρείται αύξηση του qN και στις δύο επεμβάσεις και στο τέλος του σταδίου οι τιμές τους έχουν εξισωθεί. Στο επόμενο στάδιο παρατηρείται ταχεία μείωση

των τιμών στα φύλλα ABA οι οποίες κατά το πέρας αυτού προσεγγίζουν τις αρχικές. Ωστόσο στο control οι τιμές παραμένουν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες από του ABA και μειούμενες ήπια μέχρις ότου προσεγγίσουν τις αρχικές τιμές στο τέλος και του πέμπτου σταδίου.



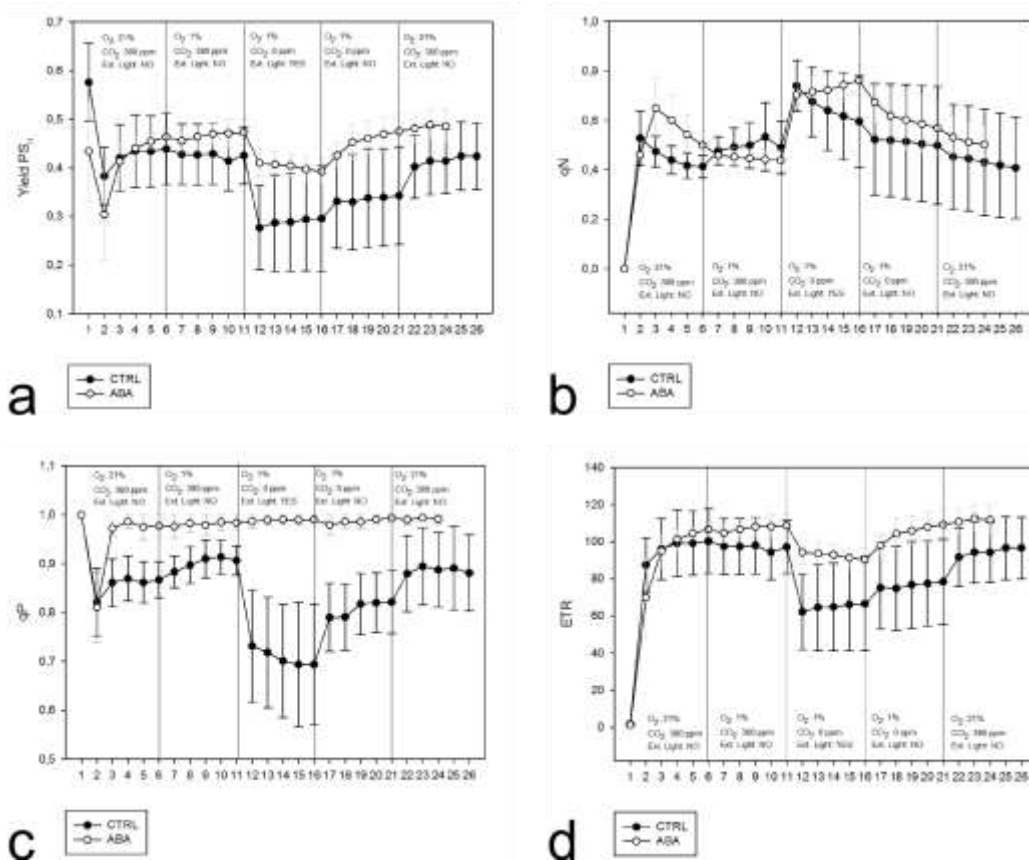
Εικόνα 3.30 Οι τιμές της παραμέτρου F_v/F_m των κυττάρων σε φύλλο ABA (d) και σε φύλλο control (b) στο *A. hybridus*, σε ψευδοχρωματική απεικόνιση μέσω του εξειδικευμένου προγράμματος του οργάνου Microscopy PAM. Η έγχρωμη μπάρα στο κάτω τμήμα της εικόνας παρουσιάζει τη σχετική κλίμακα τιμών της παραμέτρου. Στις εικόνες a και c παρουσιάζονται οι ίδιες τομές όπως φαίνονται στο οπτικό μικροσκόπιο.

Δεδομένου ότι οι ιδιοβλάστες που σχηματίζουν κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου στο βλήτο δεν είναι επιφανειακοί, όπως στο περδικάκι, προκειμένου να χαρτογραφηθούν οι τιμές της παραμέτρου F_v/F_{max} , πραγματοποιήθηκαν εγκάρσιες τομές οι οποίες τοποθετήθηκαν στο οπτικό πεδίο του Microscopy PAM. Στην εικόνα 3.30 απεικονίζεται η παράμετρος F_v/F_{max} σε τομές από φύλλα control και ABA σε επεξεργασμένες εικόνες μέσω του λογισμικού του φθορισμομέτρου. Όπως προκύπτει, τα control φύλλα έχουν υψηλότερες τιμές F_v/F_{max} έναντι των φύλλων ABA, ενώ τα κύτταρα του κολεού της

δέσμης παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές F_v/F_{max} από τα κύτταρα του μεσοφύλλου τόσο στα φύλλα control όσο και στα φύλλα ABA.

3.6.3. Τα χαρακτηριστικά του φθορισμού της χλωροφύλλης σε διαφορετικές συνθήκες ατμόσφαιρας και φωτισμού παρουσία ή απουσία ABA στο *Vitis vinifera* (Πείραμα A2)

Στην εικόνα που ακολουθούν φαίνονται οι μεταβολές των παραμέτρων φορισμού της χλωροφύλλης σε φύλλα αμπελιού που παρέμειναν υπό συνεχή φωτισμό παρουσία ή απουσία ABA.



Εικόνα 3.31 **a)** Η λειτουργική φωτοχημική ικανότητα του PSII (yield PSII), **b)** ο συντελεστής μή φωτοχημικής απόσβεσης qN, **c)** Ο συντελεστής φωτοχημικής απόσβεσης qP και **d)** Ο φαινόμενος ρυθμός γραμμικής ροής ηλεκτρονίων ETR, σε φύλλα *V. vinifera* που παρέμειναν για 5 ώρες υπό συνεχή φωτισμό σε control και ABA (Γλυκά και Μέθοδοι: Κεφ. 2.8) στα πέντε πειραματικά στάδια. Στα σημεία που επισημαίνονται με * οι μέσοι διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους.

Η τιμή της λειτουργικής φωτοχημικής ικανότητας στο αμπέλι (εικόνα 3.31a) εμφανίζει την ίδια μορφή μεταβολών που παρατηρήθηκε και στο περδικάκι (εικόνα

3.27a). Ωστόσο υπάρχει διαφοροποίηση στην αρχή του πρώτου σταδίου αφού στην περίπτωση του αμπελιού τα φύλλα ABA παρουσιάζουν μικρότερο F_v/F_{max} και χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη διάρκεια επαγωγής (induction) της φωτοσύνθεσης. Στα υπόλοιπα στάδια η λειτουργική φωτοχημική ικανότητα των φύλλων ABA έχει συνεχώς μεγαλύτερες τιμές έναντι των φύλλων control και στο τέταρτο στάδιο επανέρχεται ταχέως σε τιμές που προσεγγίζουν τις αρχικές. Αντιθέτως, τα φύλλα control φύλλων ανακτούν τις αρχικές τιμές αυτής της παραμέτρου μόνο κατά τη διάρκεια του πέμπτου σταδίου μέσω δύο διακριτών φάσεων ανάκαμψης.

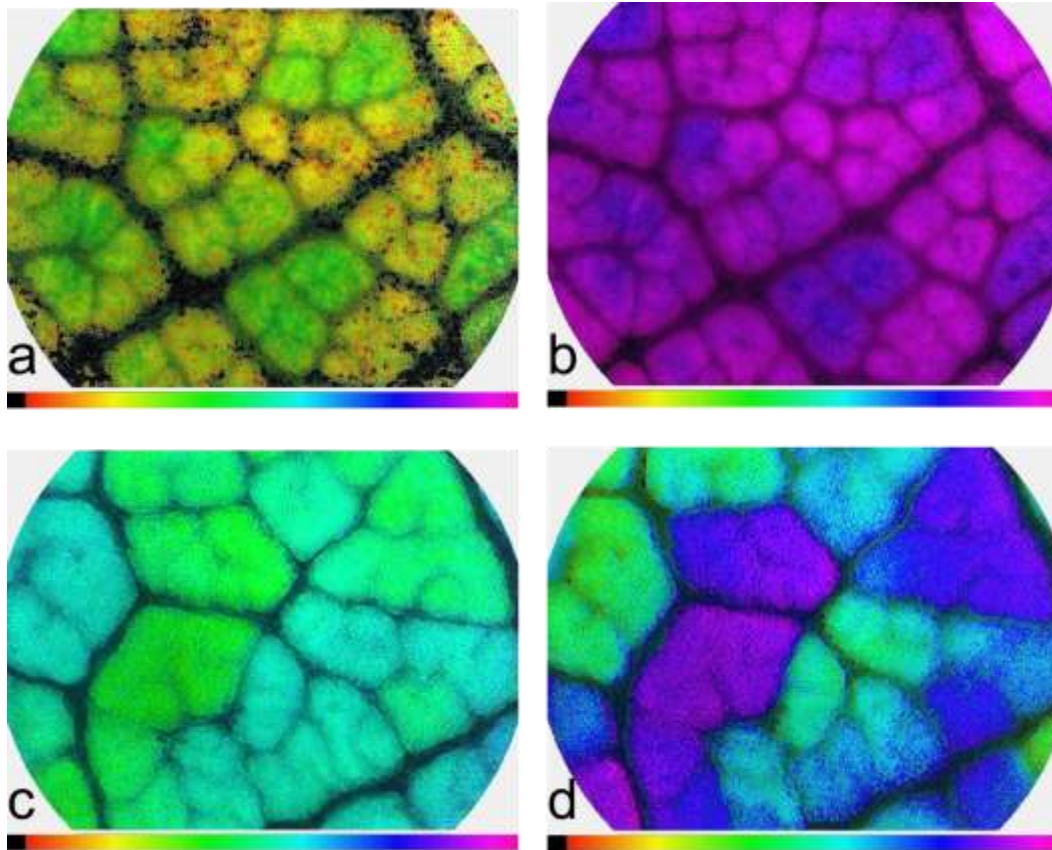
Αντίστοιχες είναι και οι μεταβολές του ETR και για τους δύο πειραματικούς χειρισμούς (εικόνα 3.31d).

Η παράμετρος qP των φύλλων control εμφανίζει καμπύλη όμοια με της λειτουργικής φωτοχημικής ικανότητας, η τιμή, ωστόσο, της παραμέτρου αυτής στα φύλλα ABA παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (εικόνα 3.31c).

Η παράμετρος qN (εικόνα 3.31b) ακολουθεί αντίστροφη πορεία από αυτή της λειτουργικής φωτοχημικής ικανότητας στα φύλλα και των δύο χειρισμών, με τα φύλλα ABA να έχουν υψηλότερη τιμή της παραμέτρου έναντι των φύλλων control. Ωστόσο, οι διαφορές των τιμών ανάμεσα στο control και το ABA στην κάθε χρονική στιγμή δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

Από την παρατήρηση των παραμέτρων του φθορισμού σε μικροσκοπικό επίπεδο μέσω του λογισμικό του φθορισμόμετρου, προκύπτει πως διαφορετικοί αεροθάλαμοι (aerols)⁶ παρουσιάζουν διαφορετικές τιμές της μετρούμενης παραμέτρου φθορισμού την ίδια χρονική στιγμή (εικόνα 3.32).

⁶ Το αμπέλι έχει ετεροβαρή φύλλα.



Εικόνα 3.32 Οι τιμές της λειτουργικής φωτοχημικής ικανότητας (**a και c**) και της παραμέτρου qN (**b και d**), δύο οπτικών πεδίων σε φύλλα *control* αμπελιού σε ψευδοχρωματική απεικόνιση μέσω του εξειδικευμένου προγράμματος του οργάνου *Microscopy PAM*. Η έγχρωμη μπάρα στο κάτω τμήμα της εικόνας παρουσιάζει τη σχετική κλίμακα τιμών της παραμέτρου

3.7. Υπολογισμός της χρονικής διάρκειας που δύναται να υποστηριχθεί η φωτοσύνθεση από την αποδόμηση των κυτταρικών εγκλείστων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε συνθήκες πείνας άνθρακα τα φύλλα και των δύο πειραματόφυτων (περδικάκι και βλήτο) τα κυτταρικά εγκλείστα αποδομούνται και ότι το CO₂ που παράγεται συμβάλλει ενδεχομένως στη διατήρηση μέρους τουλάχιστον του φωτοσυνθετικού ρυθμού στις αντίξοες αυτές συνθήκες. Γεννάται όμως το ερώτημα: για πόσο χρονικό διάστημα μπορούν τα κυτταρικά εγκλείστα να υποστηρίξουν την φωτοσύνθεση σε τέτοιες συνθήκες;

Για την απάντηση σε αυτό το ερώτημα μετρήθηκε η ειδική μάζα των φύλλων (LMA) στο περδικάκι και στο βλήτο, το ποσοστό % της μάζας των εγκλείστων ανά μάζα φύλλου και ο μέσος όρος του φωτοσυνθετικού ρυθμού σε φυσιολογικές συνθήκες φωτισμού, θερμοκρασίας και υδατικής κατάστασης.

3.4.1. Υπολογισμός του χρονικού διαστήματος που δύναται να υποστηριχθεί η φωτοσύνθεση από την αποδόμηση των κυστόλιθων στο *Parietaria judaica*.

Το LMA στο περδικάκι⁷ υπολογίστηκε στα 24,09 gr m⁻². Επίσης, από το ίδιο πείραμα προέκυψε πως οι κυστόλιθοι αποτελούν το 10% του ξηρού βάρους των φύλλων. Συνδυάζοντας τα δεδομένα αυτά και δεχόμενοι ένα μέσο ρυθμό φωτοσύνθεσης 14,27 μmol m⁻² s⁻¹, εκτιμάται πως οι κυστόλιθοι ενός φύλλου μπορούν να υποστηρίξουν την φωτοσύνθεση (στον παραπάνω ρυθμό) για τη χρονική διάρκεια των 28 λεπτών περίπου.

3.7.1. Υπολογισμός της χρονικής διάρκειας που δύναται να υποστηριχθεί η φωτοσύνθεση από την αποδόμηση των κρυστάλλων στο *Amaranthus hybridus* (Βλήτο).

Παρομοίως, το LMA του βλήτου υπολογίστηκε στα 23,55 gr m⁻². Οι κρύσταλλοι αποτελούν το 15% περίπου του ξηρού βάρους και ο μέσος ρυθμός φωτοσύνθεσης ανέρχεται σε 13,01 μmol m⁻² s⁻¹. Λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές αυτές εκτιμάται ότι οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου μπορούν να υποστηρίξουν την φωτοσύνθεση σε αυτόν το ρυθμό για 70 λεπτά περίπου.

⁷ Από τη διενέργεια προκαταρκτικών πειραμάτων και στα δύο αυτά πειραματόφυτα.

Πίνακας 3.2 Το LMA, Βάρος εγκλείστων % του ξηρού βάρους του φύλλου, ο μέσος όρος του φωτοσυνθετικού ρυθμού και το χρονικό διάστημα για το οποίο τα κυτταρικά έγκλειστα μπορούν να τον υποστηρίξουν μέσω της παραγωγής CO₂.

Πειραματόφυτο	LMA (gr m ⁻²)	Βάρος εγκλείστων % του ξηρού βάρους του φύλλου	Μέσος όρος φωτοσυνθετικού ρυθμού (μmol m ⁻² s ⁻¹)	Χρονικό διάστημα υποστήριξης του φωτοσυνθετικού ρυθμού από το CO ₂ που παράγεται
<i>P. judaica</i>	24,09	10%	14,27	28 min
<i>A. hybridus</i>	23,55	15%	13,01	70 min

Συζήτηση

4. Συζήτηση

Η ύπαρξη κυτταρικών εγκλείστων στα φύλλα των φυτικών οργανισμών αποτελεί τον κανόνα με ελάχιστες εξαιρέσεις. Οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου έχουν εντοπιστεί σε περισσότερες από 250 φυτικές οικογένειες (Metcalf, 1985; Franceschi and Nakata, 2005; Nakata, 2012) και μόνο σε ένα μικρό αριθμό οικογενειών η ύπαρξή τους δεν έχει επιβεβαιωθεί (Solleder, 1908). Από την άλλη πλευρά οι κυστόλιθοι ανθρακικού ασβεστίου έχουν μεν περιορισμένη εξάπλωση σε ορισμένες μόνο οικογένειες, ορισμένες όμως εξ αυτών παρουσιάζουν ιδιαίτερο γεωργικό ενδιαφέρον όπως οι: Moraceae, Urticaceae, Acanthaceae, Cucurbitaceae και Cannabaceae (Haberlandt, 1914; Metcalf, 1985; Fahn, 1990; Dickinson, 2000). Η ταξινομική κατανομή των κυτταρικών εγκλείστων, ο επαναλαμβανόμενος εντοπισμός τους στα φυτικά όργανα, η μορφολογική τους σταθερότητα και ο σχηματισμός τους μέσω σύνθετων και πολύπλοκων διεργασιών υποδεικνύει πως ο σχηματισμός των κυτταρικών εγκλείστων υπόκειται σε γενετικό έλεγχο από πλήθος γενετικών τόπων (Webb, 1999; Nakata and McConn, 2000; Nakata and McConn, 2002; Monje and Baran, 2002; Nakata, 2012). Ως επί το πλείστον, ο σχηματισμός κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου, σε φυτά τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν τους σχηματίζουν, με την μεταφορά βακτηριδιακών γονιδίων που κωδικοποιούν την βιοσύνθεση του οξαλικού οξέως, υποδεικνύει πως οι επαγόμενοι μηχανισμοί σχηματισμού των κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου είναι συντηρημένοι, ενώ ο σχηματισμός των κρυστάλλων αποτελεί αρχέγονο χαρακτηριστικό των φυτών (Nakata, 2012). Οι φυσιολογικοί ρόλοι που αποδίδονται στα κυτταρικά αυτά έγκλειστα ποικίλουν. Η αποθήκευση και ρύθμιση της συγκέντρωσης του Ca, η φυτοπροστασία, η αποτοξίνωση βαρέων μετάλλων, η αδρανοποίηση του οξαλικού οξέως στους φυτικούς ιστούς και η αποτελεσματικότερη διάδοση της ακτινοβολίας στους φυτικούς ιστούς θεωρούνται ως οι σημαντικότεροι εξ αυτών (Metcalf, 1985; Nakata, 2003; Franceschi and Nakata, 2005 και η σχετική βιβλιογραφία που αναφέρεται στα άρθρα αυτά). Στις περισσότερες περιπτώσεις η λειτουργία των εγκλείστων εστιάζεται στα ιόντα Ca και όχι στο ανθρακικό τους τμήμα.

Στην εργασία αυτή επιχειρήθηκε να δοθεί απάντηση στην υπόθεση εργασίας σύμφωνα με την οποία τα κυτταρικά έγκλειστα (κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου και κυστόλιθοι ανθρακικού ασβεστίου) αποτελούν δυναμικά συστήματα που εξυπηρετούν κατά προτεραιότητα την διαχείριση των αποθεμάτων του ανόργανου άνθρακα και όχι του ασβεστίου. Μέρος της υπόθεσης εργασίας έχει επιβεβαιωθεί από προηγούμενες μελέτες

της ερευνητικής μας ομάδας, οι οποίες έχουν καταλήξει στην ύπαρξη του φαινομένου της «φωτοσύνθεσης κινδύνου», όπως θα μπορούσε να ονομαστεί (Λουρίδα, 2005; Τοουλάκου, 2006; Ρέππα, 2012; Τοουλάκου, 2013). Ωστόσο επιχειρήθηκε να δοθούν απαντήσεις σε ερωτήματα που μέχρι την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας είχαν παραμείνει αναπάντητα.

Τα φύλλα καλούνται να διαχειριστούν το CO₂ από τα πρώτα κιόλας στάδια της ανάπτυξής τους. Στα πολύ νεαρά φύλλα τα στομάτια δεν είναι πλήρως λειτουργικά και έτσι η ανταλλαγή αερίων αναμένεται να είναι περιορισμένη. Στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης τα φύλλα συμπεριφέρονται ως ετερότροφα όργανα. Ωστόσο, η αναπνοή πραγματοποιείται κανονικά και έτσι αναμένεται συσσώρευση CO₂ η οποία θα πρέπει να ελέγχεται ώστε να μην έχει τοξική δράση για τα φύλλα. Σύμφωνα με την υπόθεση εργασίας ο σχηματισμός κυτταρικών εγκλείστων αποτελεί έναν μηχανισμό ελέγχου της περίσσειας του CO₂ στα νεαρά φύλλα. Για τον έλεγχο της υπόθεσης αυτής πραγματοποιήθηκαν πειράματα τα οποία είχαν ως στόχο την μέτρηση του αριθμού των κυτταρικών εγκλείστων σε σχέση με την επιφάνεια, τον φωτοσυνθετικό ρυθμό και τον ρυθμό διαπνοής των φύλλων κατά τη διάρκεια τη έκπτυξης. Όπως προέκυψε, τα κυτταρικά έγκλειστα (ραφίδες στο αμπέλι, δρούσες στο βλήτο και κυστόλιθοι στο περδικάκι) σχηματίζονται από τα πρώτα κιόλας στάδια έκπτυξης. Η πυκνότητά τους είναι υψηλή στα νεαρά φύλλα και κατόπιν μειώνεται, ενώ ο συνολικός αριθμός των κυτταρικών εγκλείστων ανά φύλλο αυξάνεται στην αρχή ενώ στη συνέχεια σταθεροποιείται. Ο πεπερασμένος μέγιστος αριθμός εγκλείστων ανά φύλλο σε συνδυασμό με την αύξηση της φυλλικής επιφάνειας εξηγεί τη μείωση της πυκνότητας τους. Μοναδική εξαίρεση αποτελούν οι δρούσες του αμπελιού οι οποίες δεν σχηματίζονται στα αρχικά στάδια της έκπτυξης αλλά αφού τα φύλλα έχουν αποκτήσει το 10% της συνολικής τους επιφάνειας. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται από την καμπύλη της πυκνότητας των δρουσών συναρτήσει της φυλλικής επιφάνειας όπου παρατηρείται μέγιστο, αντίθετα με τις αντίστοιχες καμπύλες των υπολοίπων κυτταρικών εγκλείστων. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα παλιότερων εργασιών (Kriedemann et al, 1970; Finley, 1999; Prychid et al, 2008). Όσον αφορά στο αμπέλι, οι φωτογραφίες των αποχρωματισμένων φύλλων έδειξαν πως οι ραφίδες εντοπίζονται σε ιδιόβλαστα κύτταρα του μεσοφύλλου ενώ οι δρούσες εκατέρωθεν των ηθμαγγειωδών δεσμίδων. Το δεδομένο αυτό, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι δρούσες δεν προϋπάρχουν αλλά σχηματίζονται μετέπειτα, οδηγεί στο συμπέρασμα πως τα δύο είδη κρυστάλλων έχουν διαφορετικό ρόλο στα φύλλα. Είναι πιθανό οι ραφίδες να σχηματίζονται τάχιστα με σκοπό την

απομάκρυνση της περίσσειας CO₂ στους πολύ νεαρούς ιστούς και οι δρούσες να συμβάλλουν στη διαχείριση των αποθεμάτων Ca ή οξαλικού οξέος που μεταφέρεται από τη ρίζα. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν εξάγει οι Prychid et al (2008) για το φυτό *Amorphophallus sp.* το οποίο εμφανίζει όπως και το αμπέλι ραφίδες και δρούσες, ωστόσο, κρίνουν πως ο ρόλος των ραφίδων είναι φυτοπροστατευτικός για τους πολύ νεαρούς ιστούς. Η έλλειψη λειτουργικών στοματίων στα νεαρά φύλλα (άρα και η αδυναμία ανταλλαγής αερίων) υποδεικνύει πως ο C των κυτταρικών εγκλείστων δεν προέρχεται από το CO₂ της ατμόσφαιρας αλλά πιθανότατα από το CO₂ που παράγεται μέσω της αναπνοής, ή από τα ανθρακικά ή οξαλικά ανιόντα του εδάφους τα οποία μεταφέρονται στα φύλλα μέσω του διαπνευστικού ρεύματος. Σε αυτό συνηγορούν και τα αποτελέσματα προηγούμενων πειραμάτων της πειραματικής μας ομάδας σύμφωνα με τα οποία τόσο οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου όσο και οι κυστόλιθοι ανθρακικού ασβεστίου έχουν λιγότερο αρνητικές τιμές δ¹³C σε σχέση με την βιομάζα (Τουσιάκου, 2006; Ρέππα 2012), σε συνδυασμό με μελέτες που αποδεικνύουν πως το CO₂ που αποβάλλεται μέσω της αναπνοής είναι περισσότερο εμπλουτισμένο σε ¹³C (Ghashgaie et al, 2001).

Σύμφωνα με την υπόθεση εργασίας, τα κυτταρικά εγκλείστα αποτελούν αποθήκες άνθρακα των οποίων τα αποθέματα μπορούν να τροφοδοτήσουν τον κύκλο Calvin-Benson σε συνθήκες πενίας άνθρακα διατηρώντας ένα στοιχειώδη ρυθμό φωτοσύνθεσης. Για την επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής πραγματοποιήθηκαν πειράματα κατά τα οποία εφαρμόστηκε τεχνητή πενία άνθρακα (είτε με παραμονή σε αέρα με συγκέντρωση CO₂ στο σημείο αντιστάθμισης, είτε με την εφαρμογή ABA στο υπόστρωμα) σε φυτά *P. judaica* και *A. hybridus* και μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα μετρήθηκε ο όγκος των κυτταρικών εγκλείστων σε σχέση με φυτά control. Και στα δύο πειραμάτοφυτα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του όγκου των κυτταρικών εγκλείστων και στους δύο πειραματικούς χειρισμούς. Στο *P. judaica* η μείωση αυτή έφτασε στο 40-50% του αρχικού όγκου και στο *A. hybridus* το 50-60%. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αυτά αντίστοιχων πειραμάτων της ερευνητικής μας ομάδας (Γκιάφη, 2003; Λουρίδα, 2005; Τουσιάκου, 2006; Ρέππα, 2012). Η προσθήκη ανθρακικών ανιόντων στο υπόστρωμα φυτών του *P. judaica* που είχαν παραμείνει στο σημείο αντιστάθμισης του CO₂ για 5 ώρες προκάλεσε τη σχεδόν πλήρη αντιστροφή του φαινομένου και ο όγκος των κυστόλιθων ο οποίος είχε μειωθεί στο 75% του αρχικού, αυξήθηκε και ανέκτησε τις αρχικές σχεδόν τιμές μετά από 10 ώρες. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με αποτελέσματα προηγούμενης έρευνας της επίδρασης των ανθρακικών ανιόντων στο μέγεθος των κυστόλιθων φυτών *P. judaica* στα οποία εφαρμόστηκε πενία άνθρακα

(Λιακόπουλος, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Στην ίδια έρευνα προέκυψε πως εκτός από το μέγεθος των κυστόλιθων, η απουσία ανθρακικών ανιόντων στο υπόστρωμα προκάλεσε και ποιοτική υποβάθμιση των κυστόλιθων αφού στο Η.Μ.Σ. φαίνονται πορώδεις σε αντίθεση με τους κυστόλιθους από φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα παρουσία ανθρακικών οι οποίοι εμφανίστηκαν συμπαγείς. Από τα παραπάνω γίνεται σαφές πως τα κυτταρικά έγκλειστα είναι δυναμικές αποθήκες κυρίως άνθρακα, αφού όπως φαίνεται οι μεταβολές του CO₂ στο περιβάλλον (εναέριο και εδαφικό) επηρεάζουν άμεσα το μέγεθος τους.

Στο *P. judaica* η αποδόμηση των κυστόλιθων θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με ελεύθερη διάλυση του ασταθούς ανθρακικού ασβεστίου στο υδατικό διάλυμα (Λουρίδα, 2005). Αντιθέτως, το οξαλικό ασβέστιο των κρυστάλλων είναι αδιάλυτο στο νερό αλλά ακόμα και σε ασθενή οξέα (ειδικά η μονοϋδρική μορφή η οποία απαντάται στις δρούσες του *A. hybridus*) (Arnott, 1982; Webb, 1999; Franceschi and Nakata, 2005; Τουολάκου, 2006; Nakata, 2012). Γι αυτό το λόγο εικάζεται ότι η διάλυση του πραγματοποιείται με τη μεσολάβηση πρωτεϊνών με ισχυρή συγγένεια ως προς τα ιόντα Ca²⁺ (Webb et al, 1995). Ορισμένες από τις πρωτεΐνες που ανιχνεύτηκαν στο matrix των ιδιοβλαστών του αμπελιού στην παρούσα μελέτη πιθανόν αφορούν σε τέτοιους ρόλους. Η διάσπαση του οξαλικού οξέος πιθανόν πραγματοποιείται με την δράση του ενζύμου οξαλική οξειδάση η οποία καταλύει την οξειδωση του οξαλικού οξέως προς CO₂ και H₂O₂. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν πειράματα ιστοχημικού εντοπισμού της οξαλικής οξειδάσης σε τομές φύλλων βλήτου από φυτά control και από φυτά στα οποία είχε εφαρμοστεί υδατική καταπόνηση. Αυτά έδειξαν πως αφενός, η οξαλική οξειδάση είναι όντως το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την διάλυση του οξαλικού οξέως, και αφετέρου πως το ένζυμο εντοπίζεται κυρίως στα κύτταρα του σπογγώδους παρεγχύματος (και ιδιαίτερα στα κυτταρικά τοιχώματα) των φύλλων των καταπονημένων φυτών. Η χρωστική έδωσε θετική αντίδραση και στο σπογγώδες παρέγχυμα των φύλλων του control, ωστόσο ο βαθμός χρώσης ήταν κατά πολύ μικρότερος σε σχέση με αυτόν των φύλλων των καταπονημένων φυτών. Σε κάθε περίπτωση δεν παρατηρήθηκε έντονη χρώση των κυττάρων του κολεού της δέσμης αλλά ούτε των κυττάρων του πασσαλώδους παρεγχύματος. Ο εντοπισμός του ενζύμου στο σπογγώδες παρέγχυμα αποτελεί σημαντική ένδειξη πως το ένζυμο ενεργοποιείται και διασπά το οξαλικό οξύ παράγοντας CO₂ το οποίο στη συνέχεια δεσμεύεται από την PEP-C και όχι από την RubisCO. Πραγματοποιήθηκε επίσης ιστοχημικός εντοπισμός της καταλάσης σε τομές φύλλων βλήτου από φυτά control και από φυτά στα οποία είχε εφαρμοστεί πενία άνθρακα με τη

χρήση ABA και την παραμονή σε ατμόσφαιρα με συγκέντρωση CO₂ στο σημείο αντιστάθμισης. Η καταλάση εντοπίστηκε στα ίδια κύτταρα στα οποία εντοπίστηκε και η οξαλική οξειδάση. Ωστόσο, η χρωστική έδωσε θετική αντίδραση και στα φύλλα control ενώ ασθενής αντίδραση παρατηρήθηκε και στα κύτταρα του πασσαλώδους παρεγχύματος. Εξαίρεση αποτέλεσε η περίπτωση των φύλλων των φυτών στο σημείο αντιστάθμισης στα οποία δεν εμφανίστηκε ισχυρή χρώση στο σπογγώδες παρέγχυμα αλλά μόνο στο πασσαλώδες. Στην περίπτωση του ABA και του control, ο εντοπισμός του ενζύμου στα ίδια κύτταρα που εντοπίστηκε η οξαλική οξειδάση αιτιολογείται από την ανάγκη της δράσης του ενζύμου για την άμεση κατανάλωση του H₂O₂ που προκύπτει από την δράση της οξαλικής οξειδάσης ώστε να αποφευχθεί η πρόκληση ζημιών στα κύτταρα αυτά λόγω της τοξικότητάς του. Για τον υπολογισμό της δραστηριότητας της οξαλικής οξειδάσης πραγματοποιήθηκε ενζυμική δοκιμή σε εκχύλισμα φύλλων φυτών control, ABA και φυτών σε υδατική καταπόνηση. Όπως προέκυψε, τα φύλλα από τα καταπονημένα φυτά εμφάνισαν εντονότερη δραστηριότητα του ενζύμου (σχεδόν τριπλάσια units ενζύμου ανά gr νωπού βάρους φύλλου) σε σχέση με τα φυτά control, ενώ τα φύλλα από φυτά που παρέμειναν σε ABA εμφάνισαν ενεργότητα οξαλικής οξειδάσης σε τιμές ενδιάμεσες των άλλων επεμβάσεων. Επίσης, η ενζυμική δοκιμή επιβεβαίωσε τις παρατηρήσεις ιστοχημικού εντοπισμού πως το ένζυμο εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες ή/και τα κυτταρικά τοιχώματα αφού το υπερκείμενο της φυγοκέντρισης του εκχυλίσματος (κυτταρικός χυμός) δεν εμφάνισε δραστηριότητα του ενζύμου. Τα αποτελέσματα του ιστοχημικού προσδιορισμού και της ενζυμικής δοκιμής της οξαλικής οξειδάσης επιβεβαιώνουν και αιτιολογούν τα αποτελέσματα της Τοουλάκου (2013) σύμφωνα με τα οποία, στα φύλλα φυτών βλήτου σε καθεστώς πενίας άνθρακα δεν παρατηρείται συσσώρευση ελεύθερου οξαλικού οξέως. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας σχετικά με τη δραστηριότητα της οξαλικής οξειδάσης στα φύλλα των φυτών συμφωνούν με τα αποτελέσματα παλαιότερων σχετικών ερευνών (Pundir and Kuchhal, 1989; Dumas et al, 1995; Goyal et al, 1999; Vuletić et al, 2000; Davoine et al, 2001; Sathisraj and Augustin, 2012), ενώ οι παρατηρήσεις που αφορούν στον ιστοχημικό εντοπισμό του ενζύμου στα φύλλα είναι πρωτότυπες.

Κατά τη διάλυση του οξαλικού ασβεστίου των κυτταρικών εγκλείστων σε συνθήκες πενίας άνθρακα αναμένεται η απελευθέρωση κατιόντων Ca⁺², η τύχη του οποίου είναι προς το παρόν άγνωστη. Γι το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα ιστοχημικού εντοπισμού των κατιόντων Ca⁺² σε τομές φύλλων φυτών *P. judaica* στα οποία είχε εφαρμοστεί πενία άνθρακα με τη χρήση ABA και με την παραμονή σε

ατμόσφαιρα με συγκέντρωση CO₂ στο σημείο αντιστάθμισης, και *A. hybridus* στα οποία είχε εφαρμοστεί υδατική καταπόνηση. Στο περδικάκι τα κατιόντα Ca⁺² εντοπίστηκαν στην λιθοκύστη και στα κύτταρα του πασσαλώδους παρεγχύματος που είναι σε άμεση επαφή με αυτή τόσο στα φυτά της πενίας άνθρακα όσο και στα control. Ωστόσο, στα φυτά που βρίσκονταν υπό καθεστώς πενίας άνθρακα η χρώση ήταν σαφώς εντονότερη και εμφανίστηκε σε μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων πλησίον της λιθοκύστης ενώ κατιόντα ασβεστίου εντοπίστηκαν και στα επιδερμικά κύτταρα που βρίσκονταν σε επαφή με αυτή. Στο βλήτο θετική αντίδραση στη χρώση έδωσαν μόνο τα φυτά σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης στα οποία τα ελεύθερα κατιόντα ασβεστίου εντοπίστηκαν στους ιδιοβλάστες και σε ένα μικρό αριθμό γειτονικών κυττάρων καθώς και στα κύτταρα στα οποία εντοπιζόταν η κρυσταλλική άμμος. Εφόσον δεν εντοπίζονται κατιόντα ασβεστίου σε άλλα κύτταρα πέραν αυτών που αναφέρθηκαν, είναι πιθανό τα φυτά, σε συνθήκες πενίας άνθρακα, να τα διατηρούν κοντά στα σημεία σχηματισμού των κυτταρικών εγκλείστων έτσι ώστε όταν οι συνθήκες πενίας αρθούν να πραγματοποιηθεί εκ νέου σχηματισμός τους. Ένα άλλο δεδομένο που προέκυψε από τα πειράματα της χρώσης του ασβεστίου με την χρωστική alizarine red-s αποτελεί η παρατήρηση πως η χρώση απομονωμένων κυστόλιθων ανθρακικών ασβεστίου λειτουργεί προστατευτικά και παρεμποδίζει τη διάλυση των κυστόλιθων στο υδατικό περιβάλλον. Το δεδομένο αυτό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον σχεδιασμό ενός νέου πρωτοκόλλου απομόνωσης των κυστόλιθων σε υδατικό περιβάλλον.

Από τα προαναφερθέντα προκύπτουν σοβαρές ενδείξεις πως όταν τα φυτά υποβάλλονται σε συνθήκες πενίας άνθρακα αποδομούν τα κυτταρικά εγκλείστα των φύλλων τους παράγοντας CO₂. Σύμφωνα με την υπόθεση εργασίας, το παραγόμενο CO₂ εισέρχεται στον κύκλο Calvin-Benson έτσι ώστε να καθιστά δυνατή τη διατήρηση ενός στοιχειώδους ρυθμού φωτοσύνθεσης σε συνθήκες όπου κανονικά η φωτοσύνθεση δε θα πραγματοποιούταν. Για τον έλεγχο της θεωρίας αυτής πραγματοποιήθηκαν πειράματα σύγκρισης των παραμέτρων του φθορισμού της χλωροφύλλης του PSII σε δίσκους φύλλων φυτών και των τριών πειραματόφυτων τα οποία παρέμειναν σε συνθήκες πενίας άνθρακα (εφαρμογή ABA) και φυτών μαρτύρων. Κατά τη πειραματική διαδικασία οι φυλλικοί δίσκοι όλων των χειρισμών υποβλήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες φωτισμού και σύστασης αερίων και πραγματοποιήθηκε μέτρηση του φθορισμού χλωροφύλλης από τον οποίο υπολογίστηκε το Φ_{PSII} , το qP , το qN και το ETR . Από την ανάλυση των καμπυλών που προέκυψαν γίνεται εμφανές πως κατά τη διάρκεια των σταδίων στα οποία εφαρμόστηκε πενία άνθρακα (στάδια 3 και 4), τα φυτά στα οποία είχε προστεθεί ABA

παρουσίασαν υψηλότερες τιμές σε όλες τις παραμέτρους εκτός από το qN σε σχέση με τα φυτά control. Ειδικότερα, στο στάδιο 3 όπου ο παρεχόμενος αέρας είχε μηδενική συγκέντρωση CO_2 και ολόκληρο το τμήμα του υπό παρατήρηση φύλλου φωτιζόταν ώστε να περιοριστεί η πλάγια διάχυση CO_2 από τις γειτονικές περιοχές, τα φυτά της πενίας άνθρακα παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερες τιμές τόσο στο Φ_{PSII} και το qP όσο και στο **ETR** εν αντιθέσει με τα φυτά control που παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές. Στο επόμενο στάδιο, που απενεργοποιούνταν η εξωτερική φωτεινή πηγή και φωτιζόταν μόνο το οπτικό πεδίο από το ακτινικό φως, τα φυτά της πενίας άνθρακα εμφάνισαν ταχεία αύξηση των τιμών των τριών αυτών παραμέτρων και αντίστοιχη ταχεία μείωση στο qN , ενώ στο τέλος του σταδίου αυτού οι τιμές όλων των παραμέτρων προσέγγισαν τις αρχικές (τιμές του σταδίου 2). Τα φυτά control αντιθέτως εμφάνισαν πιο βραδεία επαναφορά των τιμών των παραμέτρων του φθορισμού και προσέγγισαν τις αρχικές μόνο κατά το τέλος του 5ου σταδίου. Η διαφορά αυτή μεταξύ των φυτών της πενίας άνθρακα και των μαρτύρων υποδεικνύει πως στα πρώτα ήταν ενεργοποιημένοι μηχανισμοί οι οποίοι συμβάλλουν στην ταχύτερη επανεκκίνηση της φωτοσυνθετικής διαδικασίας. Σε συνδυασμό με τα προηγούμενα αποτελέσματα υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις πως ο προτεινόμενος ρόλος των κυτταρικών εγκλείστων θα μπορούσε να αποτελεί έναν (και ίσως τον σημαντικότερο) από τους μηχανισμούς αυτούς. Επίσης, κατά το τρίτο στάδιο παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ανάμεσα στις τιμές της παραμέτρου qP μεταξύ των πειραματικών χειρισμών, με τις τιμές των φύλλων ABA να είναι σαφώς υψηλότερες από αυτών των φύλλων του control. Αυτό υποδεικνύει πως στα φυτά ABA υπήρχε η δυνατότητα πραγματοποίησης φωτοχημικού έργου, ενώ στα φύλλα του control η δυνατότητα αυτή ήταν περιορισμένη. Λόγω του ότι κατά το στάδιο αυτό η φωτοαναπνοή είχε παρεμποδιστεί, μοναδικός παράγοντας που θα μπορούσε να συμβάλλει σε αυτό αποτελούσε η «φωτοσύνθεση κινδύνου». Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από την παρατήρηση πως στις ψευδοχρωματικές απεικονίσεις της θεμελειώδους φωτοχημικής ικανότητας σε φύλλα πενίας άνθρακα στο περδικάκι είναι άμεσα εμφανές πως τα κύτταρα πλησίον των κυστόλιθων έχουν υψηλότερες τιμές από αυτά που βρίσκονται πιο μακριά από αυτούς. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής ομάδας (Ρέππα, 2012; Λιακόπουλος, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Στην περίπτωση που ισχύει η υπόθεση εργασίας γεννάται το ερώτημα για ποιο χρονικό διάστημα είναι ικανά τα κυτταρικά εγκλείστα να υποστηρίξουν την φωτοσυνθετική διαδικασία μέσω της «φωτοσύνθεσης κινδύνου». Μέσω της γνώσης των τιμών του LMA των *P. judaica* και *A. hybridus* καθώς και του ποσοστού του βάρους των

κυτταρικών εγκλείστων επί του ξηρού βάρους μπορεί να υπολογιστεί πως στο περδικάκι τα κυτταρικά έγκλειστα μπορούν να υποστηρίξουν έναν φωτοσυνθετικό ρυθμό $14,27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για μισή ώρα περίπου, και στο βλήτο έναν φωτοσυνθετικό ρυθμό $13,01 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για 70 λεπτά. Ωστόσο, εικάζεται πως σε συνθήκες πενίας άνθρακα τα φυτά διατηρούν κατά πολύ μικρότερους φωτοσυνθετικούς ρυθμούς και έτσι τα κυτταρικά έγκλειστα θα μπορούσαν να υποστηρίξουν την φωτοσύνθεση για πολύ μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα. Από την άλλη πλευρά οι υπολογισμοί αυτοί ενδεχομένως υποεκτιμούν τη «φωτοσύνθεση κινδύνου», αφού δεν συμπεριλαμβάνουν τα έγκλειστα των ηθμαγγειωδών δεσμίδων, αλλά και τη μεταφορά ανθρακικών ιόντων και οξαλικού οξέως από τη ρίζα.

Αξίζει να σημειωθεί πως στην παρούσα εργασία δεν κατέστη δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός των κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου του αμπελιού (άρα και η πιθανή συνεισφορά τους σε συνθήκες πενίας άνθρακα) αφού, τόσο η παρουσία δύο μορφών κρυστάλλων στο ίδιο όργανο, όσο και η ανομοιομορφία των ραφίδων, καθιστά πολύ δύσκολη την μέτρηση της επιφάνειάς τους. Το φαινόμενο κατά το οποίο οι διαφορετικοί αεροθάλαμοι στα φύλλα του αμπελιού μπορούν να εμφανίσουν διαφορετική συμπεριφορά στοματίων στις ίδιες συνθήκες, καθιστά ακόμα δυσκολότερο τον πειραματικό χειρισμό για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Στην περίπτωση που η υπόθεση εργασίας είναι αληθής τότε θα μπορούσε να ειπωθεί πως τα κυτταρικά έγκλειστα αποτελούν ένα συμπληρωματικό βιολογικό προσάρτημα της φωτοσυνθετικής διαδικασίας παρόμοιο της CAM φωτοσυνθετικής οδού. Δηλαδή θα μπορούσαν τα κυτταρικά έγκλειστα να λειτουργούν ως αποθήκες CO_2 κατά αντιστοιχία με το μηλικό οξύ των CAM φυτών εμπλουτίζοντας τους φωτοσυνθετικούς ιστούς με CO_2 όταν τα στομάτια κλείνουν λόγω συνθηκών καταπόνησης. Ωστόσο, οι δύο μηχανισμοί διαφέρουν σημαντικά, διότι το μηλικό οξύ στα CAM φυτά σχετίζεται με την αφομοίωση ατμοσφαιρικού CO_2 , ενώ τα κυτταρικά έγκλειστα χρησιμοποιούν κατά κύριο λόγο εσωτερικό CO_2 . Ο μηχανισμός της «φωτοσύνθεσης κινδύνου» θα ήταν σε θέση να αποτελεί ένα εργαλείο επιβίωσης, τόσο στα C4 όσο και στα C3 φυτά με τα συνεπακόλουθα πλεονεκτήματα:

1. Περιορίζονται οι απώλειες νερού, αφού μπορεί εξασφαλιστεί ως ένα βαθμό η συντήρηση τουλάχιστον του φυτού παρουσία κλειστών ή μισόκλειστων στοματίων.
2. Αποτρέπεται η φωτοαναστολή. Το φαινόμενο της φωτοαναστολής μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες για τη φωτοσυνθετική συσκευή όταν σε συνθήκες άπλετου

φωτισμού (δηλ. πλήρους ενεργειακής παροχής) η διαθεσιμότητα CO₂ είναι περιορισμένη (όταν δηλ. τα στομάτια παραμένουν κλειστά) (Καραμπουρνιώτης και άλλοι, 2011).

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

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

Η προτεινόμενη "φωτοσύνθεση κινδύνου" δεν έρχεται σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς ρόλους που έχουν ήδη προταθεί σχετικά με την λειτουργία των κυτταρικών εγκλείστων, αντιτίθεται όμως στην θεώρηση πως αυτά αποτελούν αποθήκες άχρηστων παραπροϊόντων του μεταβολισμού.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα προαναφερθέντα μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα πως υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις για την ορθότητα και την ισχύ της υπόθεσης εργασίας. Ωστόσο, παραμένουν αρκετά αναπάντητα ερωτήματα για να διασαφηνιστούν πλήρως όλες οι πτυχές του φαινομένου. Είναι επίσης αναγκαίο να πραγματοποιηθούν πειράματα σε βάθος χρόνου ώστε να καταστεί δυνατό να διευκρινιστεί ο φυσιολογικός ρόλος και η πιθανή συμμετοχή στη "φωτοσύνθεση κινδύνου" των διαφορετικών τύπων/μορφών εγκλείστων που μπορούν να απαντούν στο ίδιο φυτικό είδος. Πρόκειται για ένα ενδιαφέρον θέμα με πολλές πιθανές προεκτάσεις που αξίζει να μελετηθεί κάνοντας χρήση του "οπλοστασίου" των σύγχρονων τεχνικών που είναι ήδη ή που θα είναι διαθέσιμες στο προσεχές μέλλον στην έρευνα της φυσιολογίας φυτών.

Βιβλιογραφία

5. Βιβλιογραφία

1. **Adamski, J.M. and Coelho, G.C. 2008.** Biomass, Mineral Accumulation and Calcium Crystals in *Trema micrantha* (L.) Blume as a Function of Calcium Carbonate Addition. *Journal of Plant Nutrition* 31: 205-217.
2. **Ahmed, A.K. and Johnson, K.A. 2000.** The effect of the ammonium Nitrate nitrogen ratio, total nitrogen, salinity and calcium on the oxalate levels of *Tetragonia tetragonoides* Pallas Kunz. *Journal of Horticultural Science* 75:533-538.
3. **Albersmeyer, M., Hilge, R., Schröttle, A., Weiss, M., Sitter, T. and Vielhauer V. 2012.** Acute kidney injury after ingestion of rhubarb: secondary oxalate nephropathy in a patient with type 1 diabetes. *BMC Nephrology* 13: 141.
4. **Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. 2008.** *Molecular Biology of the Cell*. 5th Edition. Garland Science.
5. **Allen, J.F., Mullineaux, C.W., Sanders, C.E. and Melis, A. 1989.** State transitions, photosystem adjustment and non-photochemical quenching in cyanobacterial cells acclimated to light absorbed by photosystem I or photosystem II. *Photosynthesis Research* 22: 157-166.
6. **Allen, J.F. and Whatley, F.R. 1978.** Effects of Inhibitors of Catalase on Photosynthesis and on Catalase Activity in Unwashed Preparations of Intact Chloroplasts. *Plant Physiology* 61: 957-960.
7. **Andersen, K.S., Bain, J.M., Bishop, D.G. and Smillie, R.M. 1972.** Photosystem II Activity in Agranal Bundle Sheath Chloroplasts from *Zea mays*. *Plant Physiology* 49: 461-466.
8. **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.
9. **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.
10. **Arnott, H.J. and Webb, M.A. 2000.** Twinned raphides of calcium oxalate in grape (*Vitis*): implications for crystal stability and function. *Internationa Journal of Plant Sciences* 161:133-142.
11. **Baker, N.R. 2008.** Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biology* 59: 89-113.
12. **Barboni, D. and Bremond, L. 2009.** Phytoliths of East Africian grasses: An assessment of their environmental and taxonomic significance based on floristic data. *Review of Paleobotany and Palynology* 158: 29-41.
13. **Beck, C.B. 2010.** *An Introduction to Plant Structure and Development*. 2nd Edition. Cambridge University Press.
14. **Bercu, R. 2009.** Cytomorphological aspects of ergastic materials in some Magnoliatae and Liliatae species. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology* 14: 184-192.

15. **Billard, C. and Inouye, I. 2004.** What is new in coccolithophore biology? In: *Coccolithophores: From molecular Processes to Global Impact*. Thierstein, H.R and Young, J.R. (eds).
16. **Bishop D.G., Andersen, K.S. and Smillie, R.M. 1972.** Photoreduction and Oxidation of Cytochrome *f* in Bundle Sheath Cells of Maize. *Plant Physiology* 49: 467-470.
17. **Bouropoulos, N., Weiner, S. and Addadi, L. 2001.** Calcium oxalate crystals in tomato and tobacco plants: morphology and in vitro interactions of crystal-associated macromolecules. *Chemistry* 9: 1881-1888.
18. **Casano, L.M., Zapata, J.M., Martin, M and Sabater, B. 2000.** Chlororespiration and Poising of Cyclic Electron Transport: Plastoquinone as electron transporter between thylacoid nadh dehydrogenase and peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 942-948.
19. **Chance, B. 1952.** Effect of pH kinetics of the enzyme-substrate compounds of catalase. *The Journal of Biological Chemistry* 194: 471-481.
20. **Chang, C.C. and Beevers, H. 1968.** Biogenesis of Oxalate in Plant Tissues. *Plant Physiology* 43: 1821-1828.
21. **Cheavin, W.H.S. 1938.** The crystals and cystolites found in plant cells. Part 1: crystals. *Microscope* 2: 155-158.
22. **Choi, Y.E., Harada, E., Wada, M., Tsuboi, H., Morita, Y., Kusano, T. and Sano H. 2001.** Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. *Planta* 213: 45-50.
23. **Colombo, P., Bonura, A., Costa, M., Izzo, V., Passantino, R., Locorotondo, G., Amoroso, S. and Geraci, D. 2003.** The alergens of *Parietaria*. *International Archives of Allergy and Immunology* 130: 173-179.
24. **Coté, G.G. and Gibernau, M. 2012.** Distribution of calcium oxalate crystals in floral organs of Araceae in relation to pollination strategy. *American Journal of Botany* 99: 1231-1242.
25. **Creasy, G.L. and Creasy L.L. 2009.** *Grapes (Crop Production Science in Horticulture)*. CABI.
26. **da Costa, L.M., Tronto, J., Regina, V., Constantino, L., Fonseca, M.K.A., Oliveira, A.P. and da Costa, M.R. 2009.** Extraction and concentration of biogenic calcium oxalate from plant leaves. *The Revista Brasileira de Ciência do Solo* 33: 729-733.
27. **Damián, M., Cernadas, E., Formella, A. and Sa-Otero, M.P. 2002.** Pollen classification of three types of plants of the family Urticaceae. *Proceedings of the 12th Portuguese Conference on Pattern Recognition, RecPad 2002, Aveiro*.
28. **Davies, D.D. and Asker, H. 1983.** Synthesis of Oxalic Acid Enzymes from Lettuce Leaves. *Plant Physiology* 72: 134-138.
29. **Davoin, C., Le Deunff, E., Ledger, N., Avice, J.-C., Billard, J.-P., Dumas, B. and Huault, C. 2001.** Specific and constitutive expression of oxalate oxidase during the ageing of leaf sheaths of ryegrass stubble. *Plant, Cell and Environment* 24: 1033-1043.
30. **DeBolt, S., Hardie, J, Tyerman, S. and Ford C.M. 2004.** Composition and synthesis of raphide crystals and druse crystals in berries of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon: Ascorbic acid as precursor for both oxalic and tartaric acid as revealed by radiolabeling studies. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 10: 134-142.

31. **Dickison, W.C. 2000.** *Integrative Plant Anatomy*. Academic Press. San Diego.
32. **Dietzel, L., Bräutigam, K., Steiner, S., Schöffler, K., Lepedit, B., Grimm, B., Schöttler, M.A. and Pfanschmidt, T. 2011.** Photosystem II Supercomplex Remodelling Serves as an Entry Mechanism for State Transitions in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 23: 2964-2977.
33. **Dixon, D.C., Cutt, 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.
34. **Doege, S.J. 2003.** The role of natural calcium oxalate crystals in plant defense against chewing insects. *The Inquiry Undergraduate Research Journal* 4: 88-94.
35. **Dumas, B., Freyssinet, G. and Pallet K.E. 1995.** Tissue-Specific Expression of Germin-Like Oxalate Oxidase during Development and Fungal Infection of Barley Seedlings. *Plant Physiology* 107: 1091-1096.
36. **Edwards, G.E. and Baker, N.R. 1993.** Can CO₂ assimilation in maize leaves be predicted accurately from chlorophyll fluorescence analysis? *Photosynthesis Research* 37: 89-102.
37. **Elheringer, J.R., Cerling, T.E and Helliker, B.R. 1997.** C₄ photosynthesis, atmospheric CO₂, and climate. *Oecologia* 112: 285-299.
38. **Fabbri, A., Benelli, C and di Collato, G. 1992.** Calcium oxalate crystals in vegetative and reproductive organs of the grapevine. *Acta Horticulturae (ISHS)* 292: 107-112.
39. **Faheed, F., Mazen, A. and Abd Elmohsen, S. 2013.** Physiological and ultrastructural studies on calcium oxalate crystal formation in some plants. *Turkish Journal of Botany* 37: 139-152.
40. **Fahn, A. 1990.** *Plant anatomy*. 4th Edition. Oxford: Pergamon Press.
41. **Fernández, E., Boyd, P., Holligan, P.M. and Harbou, D.S. 1993.** Production of organic and inorganic carbon within a large-scale coccolithophore bloom in the northeast Atlantic Ocean. *Marine Ecology Progress Series* 97: 271-285.
42. **Finley D.S. 1999.** Patterns of calcium oxalate in young tropical leaves: a possible role as an anti-herbivory defense. *Revista De Biologia Tropical* 47: 27-31.
43. **Fitter, A. and Hay, R. 2001.** *Environmental Physiology of Plants*. 3rd Edition. Academic Press, London.
44. **Fortin, E., Mailley, P., Lacroix, L. and Szunerits, S. 2006.** Microscopic polypyrrole patterns using scanning electrochemical microscopy (SECM): the HRP bio-catalyzed oxidation of 4-chloro-1-naphthol. *Analyst* 131: 186-193.
45. **Foster, A.S. 1956.** Plant Idioblasts: Remarkable Examples of Cell Specialization. *Protoplasma* 46: 184-193.
46. **Fotiou, C., Damialis, A., Krigas, N., Halley, J.M. and Vokou, D. 2011.** *Parietaria Judaica* flowering phenology, pollen production, viability and atmospheric circulation, and expansive ability in the urban environment: Impacts of environmental factors. *International Journal of Biometeorology* 55: 35-50.
47. **Fracheboud, Y. 2006.** Using Chlorophyll Fluorescence to Study Photosynthesis. *Institute of Plant Sciences ETH, Universitätstrasse 2, CH-8092 Zürich*.
48. **Franceschi, V.R. and Horner, H.T. 1980.** Calcium oxalate crystals in plants. *The Botanical Review* 46: 360-427.

49. **Franceschi, V.R. and Nakata, P.A. 2005.** Calcium Oxalate in PLants: Formation and Function. *Annual Review of Plant Biology* 56: 41-71.
50. **Franceschi V.R., Li X., Zhang, D. and Okita, T.W. 1993.** Calsequestrinlike calcium-binding protein is expressed in calcium-accumulating cells of *Pistia stratiotes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90: 6986-6990.
51. **Frederick S.E. and Newcomb, E.H. 1969.** Chytochemical Localization of catalase in leaf microbodies (peroxisomes). *The Journal of Cell Biology* 43: 343-353.
52. **Freisleben, R. 1933.** Untersuchungen über Bildung und Auflösung von Cystolithen beiden Urticales. *Flora* 27: 1-45.
53. **Fry-Wyssling, A. 1981.** Crystallography of the two hydrates of crystalline calcium oxalate in plants. *American Journal of Botany* 68:130-141.
54. **Gal, A., Brumfeld, V., Weiner, S., Addadi, L. and Oron, D. 2012.** Certain biominerals in leaves function as light scatterers. *Advanced Materials* 24: 77-83.
55. **Gal, A., Hisch, A., Siegel, S., Li, C., Aichmayer, B., Politi, Y., Fratzl, P., Weiner, S. and Addadi, L. 2012.** Plant Cystoliths: A Complex Functional Biocomposite of Four Distinct Silica and Amorphous Calcium Carbonate Phases. *Chemistry A european Journal* 18: 10262-10279.
56. **Gallati, H. 1979.** Horshradish peroxidase: a study of the kinetics and the determination of optimal reaction conditions, using hydrogen peroxide and 2,2'-azinobis-3-ethylbenzthiazolonone-6-sulfonic acid (ABTS) as substrates (author's translation). *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 17: 1-7.
57. **Genty, B., Briantais, J.M. and Baker, N.R. 1989.** The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 990: 87-92.
58. **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 C₃ plants. *Phytochemistry Reviews* 2: 145-161.
59. **Goyal, L., Thakur, M. and Pundir, C.S. 1999.** Purification and properties of a membrane bound oxalate oxidase from *Amaranthus* leaves. *Plant Science* 142: 21-28.
60. **Gowik, U. and Westhoff, P. 2011.** The Path from C₃ to C₄ Photosynthesis. *Plant Physiology* 155: 56-63.
61. **Guidi, L. and Degl'Innocenti, E. 2011.** Imaging of Chlorophyll a Fluorescence: A Tool to Study Abiotic Stress in Plants. In: *Abiotic Stress in Plants - MEchanisms and Adaptations*. Shanker, A. and Vekanteswarlu, B. (eds).
62. **Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A. and Saegner, W. 2009.** Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nature Structural & Molecular Biology* 16: 334-342.
63. **Haberlandt, G. 1914.** *Physiological Plant Anatomy*. Forgotten Books, London.
64. **Haines, A. 2011.** *Flora Novae Angliae*. New Englands Wild Flower Society. Framingham.
65. **Han, Y., Joosten, H.J., Niu, W., Zhao, Z., Mariano, P.S., McCalman, M., van Kan, J., Schaap, P.J. and Dunaway-Mariano, D. 2007.** Oxaloacetate Hydrolase, the C-C Bond Lyase of Oxalate Secreting Funghi. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 9581-9590.

66. Hand, D.W., Warren, W. and Acock, B. 1993. Effects of Light and CO₂ on Net Photosynthetic Rates of Stands of Aubergine and *Amaranthus*. *Annals of Botany* 71: 209-216.
67. Harvey, E.K. and Fuller, D.Q. 2005. Investigating crop processing using phytolith analysis: the example of rice and millets. *Journal of Archaeological Science* 31: 739-752.
68. Harwood, R.K. and Palmer, J. 2011. Amaranthaceae. In: *Flora of the Darwin Region*. Short, P.S. and Cowie, I.D. (eds).
69. Havir, E.A. 1992. The *in Vivo* and *in Vitro* Inhibition of Catalase from Leaves of *Nicotiana glauca* by 3-Amino-1,2,4-Triazole. *Plant Physiology* 99: 533-537.
70. He, H., Bleby, M., Veneklaas E.J., Lambers, H. and Kuo J. 2012. Morphologies and elemental compositions of calcium crystals in phyllodes and branchlets of *Acacia roborum* (Leguminosae: Mimosoidae). *Annals of Botany* 109: 887-896.
71. Hibberd, J.M. and Quick, W.P. 2002. Characteristics of C₄ photosynthesis in stems and petioles of C₃ flowering plants. *Nature* 415: 451-453.
72. Hoagland, D.R. and Arnon, D.I. 1950. *The water-culture method of growing plants without soil*. College of Agriculture, University of California. Berkeley.
73. Horner, H.T. 2012. *Peromia* leaf cell wall interface between the multiple hypodermis and crystal-containing photosynthetic layer displays unusual pit fields. *Annals of Botany* 109: 1307-1315.
74. 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.
75. 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.
76. Hunt, S. 2003. Measurements of photosynthesis and respiration in plants. *Physiologia Plantarum* 117: 314-325.
77. Ilarslan, H., Palmer, R.G. and Horner, H.T. 2001. Calcium Oxalate Crystals in Developing Seeds of Soybean. *Annals of Botany* 88: 243-257.
78. Iwai, M., Takahashi, Y. and Minagawa, J. 2008. Molecular Remodeling of Photosystem II during State Transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell* 20: 2177-2189.
79. Iwai, M., Yokono, M., Inada, N. and Minagawa, J. 2010. Live-cell imaging of photosystem II antenna dissociation during state transitions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 2337-2342.
80. Jani, S. and Rudrappa, H. 2014. Morphological, structural and micrometric study of cystolith of family Acanthaceae. *International Journal of Green Pharmacy* 8:13-17.
81. Jáuruegi-Zúñiga, D., Ferrer, M.A., Calderón, A.A., Muñoz, R. and Moreno, A. 2005. Heavy metal stress reduces the deposition of calcium oxalate in leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Plant Physiology* 162: 1183-1187.
82. Jáuruegi-Zúñiga, D., Reyes-Grajeda, J.P. and Moreno, A. 2005. Modifications on the morphology of synthetically-grown calcium oxalate crystals by crystal-associated proteins isolated from bean seed coats (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Science* 168: 1163-1169.
83. Jáuruegi-Zúñiga, D., Reyes-Grajeda, J.P., Sepulveda-Sanchez, J.D., Whitaker, J.R. and Moreno, A. 2003. Crystallochemical characterization of calcium oxalate crystals

- isolated from seed coats of *Phaseolus vulgaris* and leaves of *Vitis vinifera*. *Journal of Plant Physiology* 160: 239-245.
84. Keates, S.E., Tarlyn, N.M., Loweus, F.A. and Franceschi, V.R. 2000. L-Ascorbic acid and L-Galactose are sources for oxalic acid and calcium oxalate in *Pistia stratiotes*. *Phytochemistry* 53: 433-440.
85. Keeley J.E., Osmond C.B., Raven J.A. 1984. *Stylites*, a vascular land plant without stomata absorbs CO₂ via its roots. *Nature* 310: 694-695.
86. Khan, A.S. and Siddiqui R. 2014. Environmental factors affect calcium oxalate crystals formation in *Tradescantia pallida* (Commelinaceae). *Pakistan Journal of Botany* 46: 477-482.
87. Klanrist, P. and Webb, M.A. 2006. Functional Characterization of Hsc-70-Interacting Protein (Hip) and Chaperone Interactions in *Vitis labrusca* and *Arabidopsis thaliana*. PhD Thesis. *Purdue University Graduate School*.
88. 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).
89. Kolb, C.A, Käser, M.A., Kopecký, J., Zotz, G., Riederer, M and Pfündel, E.E. 2001. Effects of Natural Intesities of Visible and Ultraviolet Radiation on Epidermal Ultraviolet Screening and Photosynthesis in Grape Leaves. *Plant Physiology* 127: 863-875.
90. Korth, K.L., Doege, S.J., Park, S-H., Goggin, F.L., Wang, Q., Gomez, K., Liu, G., Jia, L. and Nakata, P. 2006. *Medicago truncatula* Mutants Demonstrate the Role of Plant Calcium Oxalate Crystals as an Effective Defense against Chewing Insects. *Plant Physiology* 141: 188-195.
91. Kostman, T.A. and Franceschi, V.R. 2000. Cell and calcium oxalate crystal growth is coordinated to achieve high-capacity calcium regulation in plants. *Protoplasma* 214: 166-179.
92. Kostman, T.A., Franceschi, V.R. and Nakata P.A. 2003. Endoplasmic reticulum sub-compartments are involved in calcium sequestration within raphide crystal idioblasts of *Pistia stratiotes* L. *Plant Science* 165: 205-212.
93. Kostman, T.A. and Koscher, J.R. 2003. L-Galactono-γ-lacone dehydrogenase is present in calcium oxalate crystal idioblasts of two plant species. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 201-206.
94. Kostman, T.A., Tarlyn, N.M., Loweus, F.A. and Franceschi, V.R. 2001. Biosynthesis of L-Ascorbic Acid and Conversion of Carbons 1 and 2 of L-Ascorbic Acid to Oxalic Acid Occurs within Individual Calcium Oxalate Crystal Idioblasts. *Plant Physiology* 125: 634-640.
95. Krall, J.P. and Edwards, G.E. 1992. Relationship between photosystem II activity and CO₂ fixation in leaves. *Physiologia Plantarum* 86: 180-187.
96. Kriedemann, P.E., Kliwer, W.M. and Harris, J.M. 1970. Leaf age and photosynthesis in *Vitis vinifera* L. *Vitis* 9: 97-104.
97. Krieger-Liszkay, A. 2005. Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 56:337-346.
98. Kubicek, C.P, Schreferl-Kunar, G., Wöhrer, W. and Röhr, M. 1988. Evidence for a Cytoplasmic Pathway of Oxalate Biosynthesis in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 633-637.

99. **Kuo-Huang, L.L., Ku, M.S.B. and Franceschi, V. 2007.** Correlations between calcium oxalate crystals and photosynthetic activities in palisade cells of shade-adapted *Peperomia glabella*. *Botanical Studies*: 155-164.
100. **Laker, M.F., Hofmann, A.F. and Meeuse, B.J.D. 1980.** Spectrophotometric Determination of Urinary Oxalate with Oxalate Oxidase Prepared from Moss. *Clinical Chemistry* 26: 827-830.
101. **Lester, J.N. and Goldsworthy, A. 1973.** The Occurrence of High CO₂-Compensation Points in *Amaranthus* Species. *Journal of Experimental Botany* 24: 1031-1034.
102. **Li, X.X. and Franceschi, 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
103. **Li, X.P., Gilmore, A.M., Caffarri, S., Bassi, R., Golan, T., Kramer, D. and Niyogi, K.K. 2004.** Regulation of photosynthetic Light Harvesting Involves Intrathylakoid Lumen pH Sensing by the PsbS Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 22866-22874.
104. **Li, X., Zhang, D., Lynch-Holm, V.J., Okita, T.W. and Franceschi, V. 2003.** Isolation of a Crystal Matrix Protein Associated with Calcium Oxalate Precipitation in Vacuoles of Specialized Cells. *Plant Physiology* 133: 549-559.
105. **Libert, B. and Franceschi, V.R. 1987.** Oxalate in Crop Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35: 926-938.
106. **Lin, M.L., Yen, T.B. and Kuo-Huang, L.L. 2004.** Formation of Calcium Carbonate Deposition in the Cotyledons during the Germination of *Justicia procumbens* L. (Acanthaceae) Seeds. *Taiwania* 49: 250-262.
107. **Logan, B.A., Adams III, W.W. and Demming-Adams, B. 2007.** Avoiding common pitfalls of chlorophyll fluorescence analysis under field conditions. *Functional Plant Biology* 34: 853-859.
108. **Long, S.P., Farage, P.K. and Garcia, R.L. 1996.** Measurement of leaf and canopy photosynthetic CO₂ exchange in the field. *Journal of Experimental Botany* 304: 1629-1642.
109. **Loweus, F.A. 1999.** Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochemistry* 52: 193-210.
110. **Lucas, P.W., Turner, I.M., Dominy, N.J. and Yamashita, N. 2000.** Mechanical Defences to Herbivory. *Annals of Botany* 86:913-920.
111. **Ma, J.F., Ryan, P.R. and Delhaize E. 2001.** Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *TRENDS in PlantScience* 6: 273-278.
112. **Ma, J.F., Hiradate, S. and Matsumoto, H. 1998.** High Aluminum Resistance in Buckwheat. *Plant Physiology* 117: 753-759.
113. **Margoliash, E. and Novogrodsky, A. 1957.** A Study of the Inhibition of Catalase by 3-Amino-1,2,4-Triazole. *Biochemistry Journal* 68: 468-475.
114. **Massey L.K. 2003.** Dietary influences on urinary oxalate and risk of kidney stones. *Frontiers in Bioscience* 8: 584-594.
115. **Maxwell, K and Johnson, G.N. 2000.** Chlorophyll fluorescence- a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.

116. Mazen, A.M.A. 2004. Calcium Oxalate Deposits in Leaves of *Corchorus olitorius* as Related to Accumulation of Toxi Metals. *Russian Journal of Plant Physiology* 51: 281-285.
117. Mazen, A.M.A. and Maghraby, O.M.O. 1997. Accumulation of cadmium, lead and strontium, and a role of calcium oxalate in water hyacinth tolerance. *Biologia Plantarum* 40: 411-417.
118. Mazen, A.M.A., Zhang, D. and Franceschi, V.R. 2003. Calcium oxalate formation in *Lemna minor*: physiological and ultrastructural aspects of high capacity calcium sequestration. *New Phytologist* 161: 435-448.
119. McGee-Russel, S.M. 1958. Histochemical mehtods for calcium. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 6: 22-42.
120. 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), 2nd Edition. Oxford, 82- 91.
121. Minagawa, J. 2005. Chlorophyll fluorescence of photosynthetic organisms. In: *Recent Progress of Bio/Chemiluminesence Analysis in Photosynthesis*. Wada, N. and Mimuro, M. (eds).
122. Mojne, P.V. and Baran, E.J. 2002. Characterization of Calcium Oxalates Generated as Biominerals in Cacti. *Plant Physiology* 128: 707-713.
123. Molano-Flores, B. 2001. Herbivory and Calcium Concentrations Affect Calcium Oxalate Crystal Formation in Leaves of *Sida* (Malvaceae). *Annals of Botany* 88: 387-391.
124. Morison, J.I.L. and Lawson, T. 2007. Does lateral gas diffusion in leaves matter? *Plant, Cell and Environment* 30: 1072-1085.
125. Nakata, P.A. 2003. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science* 164: 901-909.
126. Nakata, P.A. 2012. Engineering Calcium Oxalate Crystal Formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* 53: 1275-1282.
127. Nakata, P.A. 2012. Plant calcium oxale crystal formation, function, and its impact on human health. *Frontiers in Biology* 7: 254-266.
128. Nakata, P.A., Kostmann, T.A. and Franceschi V.R. 2003. Calreticulin is enriched in the crystal idioblasts of *Pistia stratiotes*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 425-430.
129. Nakata, P.A. and McConn, M. 2000. Isolation of *Medicago truncatula* Mutants Defective in Calcium Oxalate Crystal Formation. *Plant Physiology* 124: 1097-1104.
130. Nakata, P.A. and McConn, M. 2003. Calcium oxalate crystal formation is not essential for growth of *Medicago truncatula*. *Plant Phsysiology and Biochemistry* 41: 325-329.
131. Neto, M.M., Silva, G.E.B., Costa, R.S., Osvaldo, M., Neto, V., Garcia-Caraisco, N., Lopes, N.P., Haendchen, F.C., Silveira, C., Mendes, A.R., Filho, R.R. and Dantas, M. 2009. Star fruit: simultaneous neurotoxic and nephrotoxic effects in people with previously normal renal function. *NDT Plus* 2: 485-488.
132. Nitta, I., Kida, A., Fujibayashi, Y., Katayama, H. and Sugimura, Y. 2006. Calcium carbonate deposition in a cell wall sac formed in mulberry idioblasts. *Protoplasma* 228: 201-208.

133. Nixon, P.J. 2000. Chlororespiration. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 355: 1541-1547.
134. Niyogi, K.K. 2000. Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 455-460.
135. Okazaki, M., Setoguchi, H. and Hisanaga, E. 1991. Inorganic Composition of Cystoliths Isolated from Leaves of Higher Plants. In: *Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems*. Suga, S. and Nakahara, H. (eds)
136. Palaniswamy, U.R, Bible, B. and McAvoy, R.J. 2002. Effect of Nitrate:Ammonium Nitrogen Ratio on Oxalate Levels of Purslane. In: *Trends in new crops and new uses*. Janick, J. and Whipkey, A. (eds). *ASHS Press, Alexandria, VA*: 453-355.
137. Palaniswamy, U.R, Bible, B. and McAvoy, R.J. 2004. Oxalic Acid Concentrations in Purslane (*Portulaca oleracea* L.) is Altered by the Stage of Harvest and the Nitrate to Ammonium Ratios in Hydroponics. *Scientia Horticulture* 102: 267-275.
138. Pennisi, S.V., McConell, D.B., Gower, L.B., Kane, M.E. and Lucansky, T. 2001. Intracellular calcium oxalate crystal structure in *Dracaena sanderiana*. *New Phytologist* 150: 111-120.
139. Peterson, R.L., Peterson, C.A. and Melville, L.H. 2008. *Teaching Plant Anatomy Through Creative Laboratory Exercises*. National Research Council of Canada, Ottawa.
140. Pinzauti, G., Giachetti, E., Camici, G., Manao, G., Cappugi, G. and Vanni, P. 1986. An Isocitrate Lyase of Higher Plants: Analysis and Comparison of Some Molecular Properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 244: 85-93.
141. Piperno, D.R. 2006. *Phytoliths: a comprehensive guide for archaeologists and paleoecologists*. AltaMira Press, Oxford.
142. Polya, G.M. and Osmond, C.B. 1972. Photophosphorylation by Mesophyll and Bundle Sheath Chloroplasts of C₄ Plants. *Plant Physiology* 49: 267-269.
143. Proia, A.D. and Brinn, N.T. 1985. Identification of calcium oxalate crystals using alizarin red S stain. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 109: 186-189.
144. Prychid, C.J., Jabaily, R.S. and Rudall, P.J. 2008. Cellular Ultrastructural Crystal Development in *Amorphophallus* (Araceae). *Annals of Botany* 101: 983-995.
145. Puchtler, H., Meloan, S.N. and Terry, M.S. 1969. On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 17: 110-121.
146. Pundir, C.S. and Kuchhal, N.K. 1989. Detection of an oxalate oxidase in grain Sorghum roots. *Phytochemistry* 28: 2909-2912.
147. Purves, W.K., Sadava, D., Orians, H. and Heller, H.C. 2003. *Life: The science of Biology*. 7th Edition. Freeman & Company, W.H.
148. Ramos, J.B, Müller, M.N. and Riebesell, U. 2010. Short-term response of the coccolithophore *Emmiliania huxleyi* to an abrupt change in seawater carbon dioxide concentrations. *Biogeosciences* 7: 177-186.
149. Raven, J.A., Griffiths, H., Glidewell, M. and Preston, T. 1982. The mechanism of oxalate biosynthesis in higher plants: investigations with the stable isotopes ¹⁸O and ¹³C. *Proceedings of the Royal Society, London*, B216: 87-101.
150. 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.

151. **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.
152. **Rost, B. and Riebesel, U. 2004.** Coccolithophores and the biological pump: responses to environmental changes. In: *Coccolithophores: From molecular Processes to Global Impact*. Thierstein, H.R and Young, J.R. (eds).
153. **Ruiz, N., Ward, D. and Saltz, D. 2002.** Calcium oxalate crystals in leaves of *Pancreatium sickenbergeri*: constitutive or induced defence? *Functional Ecology* 16: 99-105.
154. **Rutheford, A.W. and Faller, P. 2003.** Photosystem II: evolutionary perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 358: 245-253.
155. **Ruzin, S.E. 1999.** *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University press, Oxford, New York.
156. **Sathishraj, R. and Augustin, A. 2012.** Oxalic acid and oxalate oxidase enzyme in *Cosus pictus* D. Don. *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 657-667.
157. **Schroeder, J.I, Kwak, J.M. and Allen, G.J. 2001.** Guard cell abscisic acid signaling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* 410: 327-330.
158. **Seal, S.N. and Sen, S.P. 1970.** The photosynthetic production of oxalic acid in *Oxalis corniculata*. *Plant and Cell Physiology* 11: 119-128.
159. **Sexton, R. and Hall, J.L. 1991.** Peroxidase and Catalase. In: *Electron Microscopy of Plant Cell*. Hall, J.L. and Hawes, C. (eds).
160. **Siener, R., Hönow, R., Seidler, A., Voss, S. and Hesse, A. 2006.** Oxalate content of species of the Polygonaceae, Amaranthaceae and Chenopodiaceae families. *Food Chemistry* 98: 220-224.
161. **Smirnoff N., Conklin, P.L. and Loweus, F.A. 2001.** Biosynthesis of ascorbic acid in plants: A Renaissance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 437-467.
162. **Sobhakumari, I. and Kumarasamy, D. 2014.** Studies on Phytolith morphotypes of some members of *Phyllostachys* of the subfamily Bambusoide (Poaceae). *International Journal of Current Biotechnology* 2: 11-14.
163. **Solereder, H. 1908.** *Systematic anatomy of the dicotyledons*. English edition, translated by Boodle, L.A and Fritsch, F.E., Clarendon press, Oxford.
164. **Stern, K.R., Bidlack, J.E. and Jansky, S.H. 2008.** *Introductory Plant Biology*. 11th Edition. McGraw-Hill, New York.
165. **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.
166. **Suha, O.A., Babiker, E.M. and Babiker E.E. 2013.** Thermostability at different pH levels of peroxidase extracted from four vegetables. *International Food Research Journal* 20: 715-719.
167. **Svedružić, D., Jónson, S., Toyota, C.G., Reinhardt, L.A., Ricagno, S., Lindqvist, Y. and Richards, G.J. 2005.** The enzymes of oxalate metabolism: unexpected structures and mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433: 176-192.
168. **Switala, J. and Loewen, P.C. 2002.** Diversity of properties among catalases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 401: 145-154.

169. Taiz, L. and Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*. 5th edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company.
170. Townsend, C.C. 1968. *Parietaria officinalis* and *P. judaica*. *Watsonia* 6: 365-370.
171. Twiss, P.C., Suess, E. and Smith, R.M. 1969. Morphological Classification of Grass Phytoliths. *The Soil Science Society of America Proceedings* 33: 109-115.
172. Volk, G.M, Goss, L.J. and Franceschi V.R. 2004. Calcium Channels are Involved in Calcium Oxalate Crystal Formation in Specialized Cells of *Pistia stratiotes* L. *Annals of Botany* 93: 741-753.
173. 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.
174. Vuletić, M., and Šukalović, V.H.-T. 2000. Characterization of cell wall oxalate oxidase from maize roots. *Plant Science* 157: 257-263.
175. Ward, D., Spiegel, M. and Saltz, D. 1997. Gazelle herbivory and interpopulation differences in calcium oxalate content of leaves of a desert lily. *Journal of Chemical Ecology* 23: 333-346.
176. Wayne, R.O. 2009. *Plant Cell Biology: From Astronomy to Zoology*. Elsevier/Academic Press.
177. Webb, M.A. 1999. Cell-Mediated Crystallization of Calcium Oxalate in Plants. *The Plant Cell* 11: 751-761.
178. 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*. *The Plant Journal* 7: 633-648.
179. Welle, B.J.H. 1980. Cystoliths in the secondary xylem of *Sparattanthelium* (Hernandiaceae). *IAWA Bulletin n.s.* 1: 43-48.
180. Wilkinson, S. and Davies, W.J. 1997. Xylem Sap pH Increase: A Drought Signal Received at the Apoplastic Face of the Guard Cell That Involves the Suppression of Saturable Abscisic Acid Uptake by the Epidermal Symplast. *Plant Physiology* 113: 559-573.
181. Wrischer, M. 1989. Ultrastructural localization of photosynthetic activity in thylakoids during chloroplast development in maize. *Planta* 177: 18-23.
182. Wu, C.C., Chen, S.J., Yen, T.B. and Kuo-Huang, L.L. 2006. Influence of calcium availability on deposition of calcium carbonate and calcium oxalate crystals in the idioblasts of *Morus australis* Poir. leaves. *Botanical Studies* 47: 119-127.
183. Yu, L., Jiang, J., Zhang, C., Jiang, L., Ye, N., Lu, Y., Yang, G., Liu, E., Peng, C., He, Z. and Peng, X. 2010. Glyoxylate rather than ascorbate is an efficient precursor for oxalate biosynthesis in rice. *Journal of Experimental Botany* 61: 1625-1634.
184. Zhang, Y., Lin, X., Zhang, Y., Zheng, S.J. and Du, S. 2005. Effects of Nitrogen Levels nad Nitrate/Ammonium Rations on Oxalate Concentrations od Different Forms in Edible Parts of Spinach. *Journal of Plant Nutrition* 28: 2011-2025.
185. Zhou, F., Zigao, Z., Gregersen P.L., Mikkelsen, J.D., de Neergaard, E., Collinge, D.B. and Thordla-Christensen, H. 1998. Molecular Characterization of the Oxalate Oxidase Involved in the Response of Barley to the Powdery Mildew Fungus. *Plant Physiology* 117: 33-41.

186. Zindler-Frank, E. 1991. Calcium Oxalate Crystal Formation and Growth in Two Legume Species as Altered by Strontium. *Botanica Acta* 104: 229-232.
187. 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.
188. Αϊβαλάκης, Γ., Καραμπουρνιώτης, Γ. και Φασσέας, Κ. 2005. *Γενική Βοτανική*. Εκδόσεις Έμβρυο. Αθήνα.
189. Βαρδαβάκης, Μ. 1993. *Συστηματική Βοτανική: (Κρυπτόγαμα-Σπερματοφύτα)*. Εκδόσεις Σαλονικίδης, Θεσσαλονίκη.
190. Βολιώτης, Δ. και Αθανασιάδης, Ν. 1994. *Δένδρα και Θάμνοι*. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
191. Γκιάφη Ζ. 2003. Ανατομικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των λιθοκύστεων του φυτού *Parietaria judaica*. Πτυχιακή μελέτη. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα.
192. Δροσόπουλος, Ι. 1998. *Φυσιολογία φυτών*. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα.
193. Καραμπουρνιώτης, Γ., Λιακόπουλος, Γ. και Νικολόπουλος, Δ. 2012. *Φυσιολογία Καταπονήσεων των φυτών*. Εκδόσεις Έμβρυο. Αθήνα.
194. Καράταγλης, Σ. 1999. *Φυσιολογία Φυτών*. Art of Text. Θεσσαλονίκη.
195. Λουριδά, Β. 2005. *Πιθανοί φυσιολογικοί ρόλοι των λιθοκύστεων σε αντιπροσωπευτικά είδη*. Μεταπτυχιακή εργασία. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα.
196. Μανέτας, Ι. (επ.). 2005. *Φυσιολογία φυτών*. Εκδόσεις Ίων.
197. Νικολάου, Ν.Α. 2012. *Αμπελογραφία*. Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.
198. Ρέππα, Χ. 2012. *Φωτοσύνθεση κινδύνου: Αξιοποίηση των αποθεμάτων άνθρακα των λιθοκύστεων για φωτοσυνθετική αφομοίωση σε συνθήκες καταπόνησης*. Μεταπτυχιακή εργασία. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
199. Σταυρακάκης, Μ.Ν. *Ειδική Αμπελοργία: III Θέματα Αμπελογραφίας*. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
200. Τοουλάκου, Γ. 2006. *Ανατομικά και Φυσιολογικά Χαρακτηριστικά των Ιδιοβλαστών που Σχηματίζουν Κρυστάλλους στο Μεσόφυλλο του Βλήτου (Amaranthus sp.)*. Μεταπτυχιακή εργασία. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
201. Τοουλάκου Γ. 2013. *Η επίδραση της πενίας άνθρακα στους κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου και στο μεταβολικό πρότυπο του Amaranthus sp (κ.ν. βλήτο): μεταβολομική ανάλυση*. Διδακτορική εργασία. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
202. Τσέτουρας, Π.Α. 2014. *Η τέχνη της Αμπελοργίας: Αμπέλι Οινοποιείας*. Επικαιροποιημένη Έκδοση. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.
203. Ψύχαλου, Μ. 2009. *Το Αμπέλι*. Εκδόσεις Ψύχαλου, Αθήνα.
204. *Encyclopaedia Britannica*. <http://www.britannica.com>
205. *Flora of North America*. <http://floranorthamerica.org/>
206. Unknown Author. 2011. *Pellitory: Parietaria judaica. Fact Sheet :Weeds of Australia. Biosecurity Queensland Edition. Queensland Government.*

Παράρτημα

6. Παράρτημα

6.1. Διαγραμματική Απεικόνιση των πειραμάτων

6.1.1. Πειράματα συσχέτισης της οντογένεσης των κυτταρικών εγκλείστων με τις λειτουργικές παραμέτρους των φύλλων (και για τα τρία πειραματόφυτα)

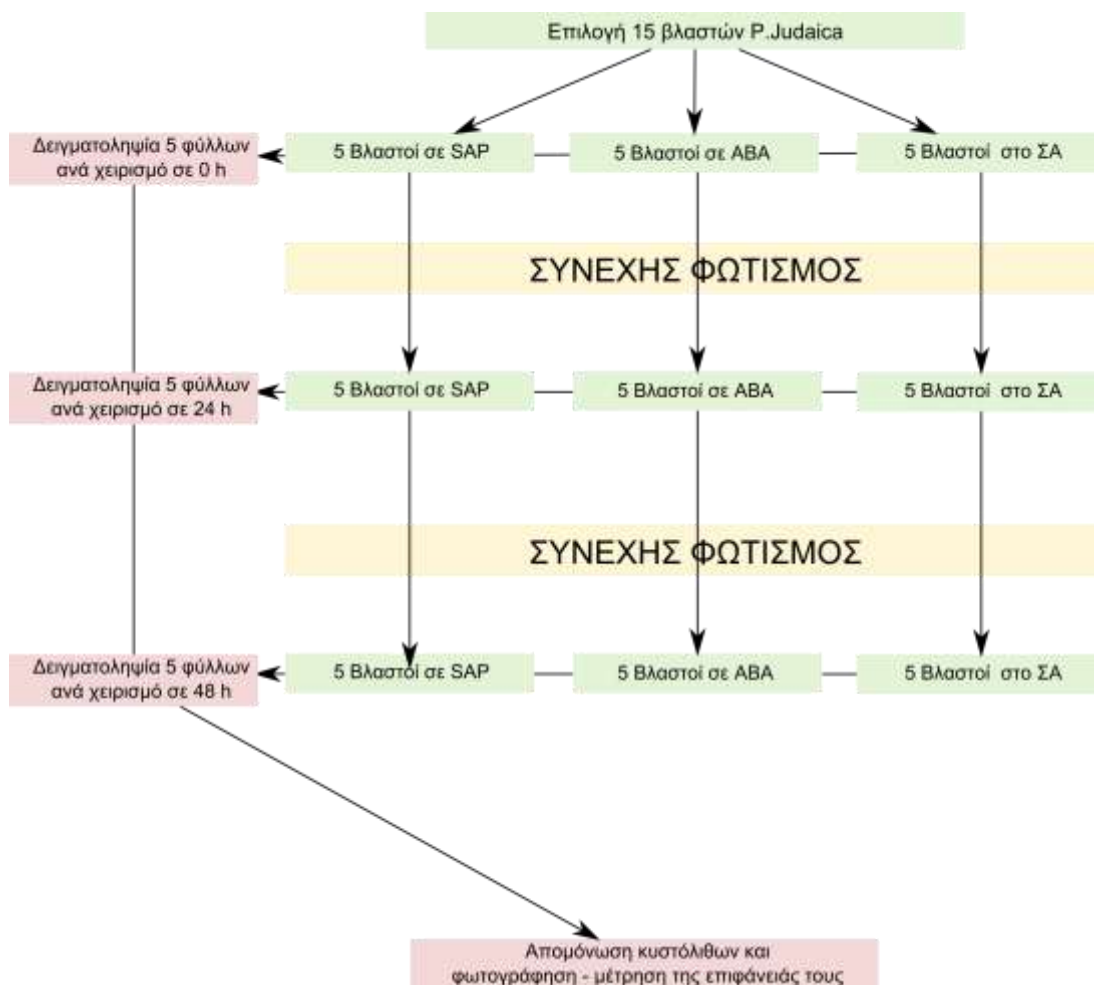


6.1.2. Εφαρμογή σημείου Αντιστάθμισης CO₂ (Πειράματα Π0 και Β0)

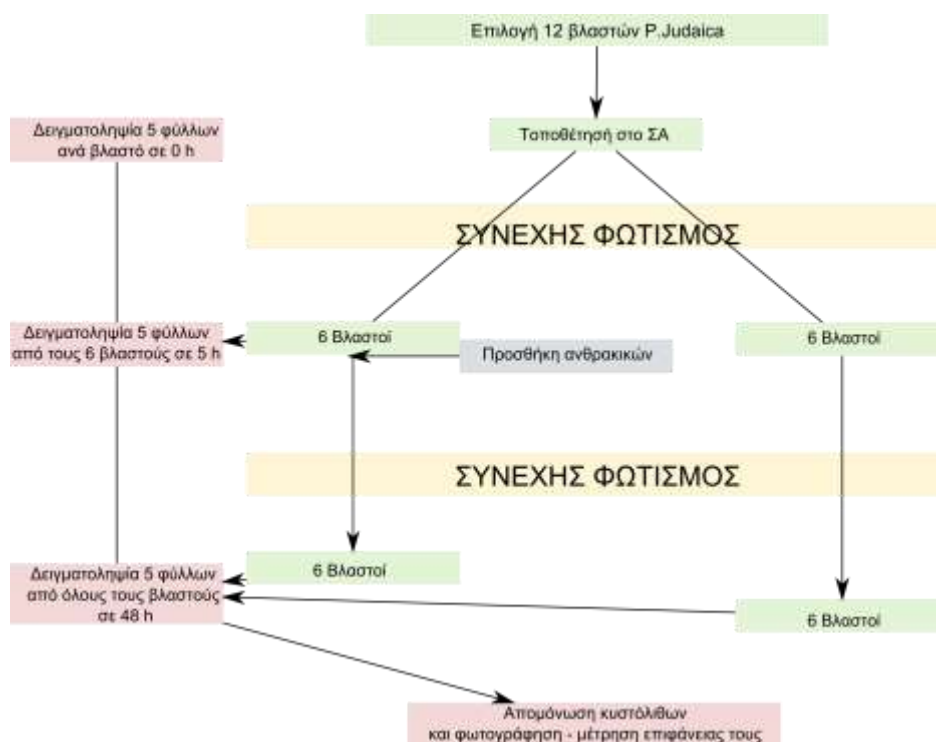


6.1.3. Αλλαγές στο μέγεθος των κυτταρικών εγκλείστων σε συνθήκες πείνας άνθρακα

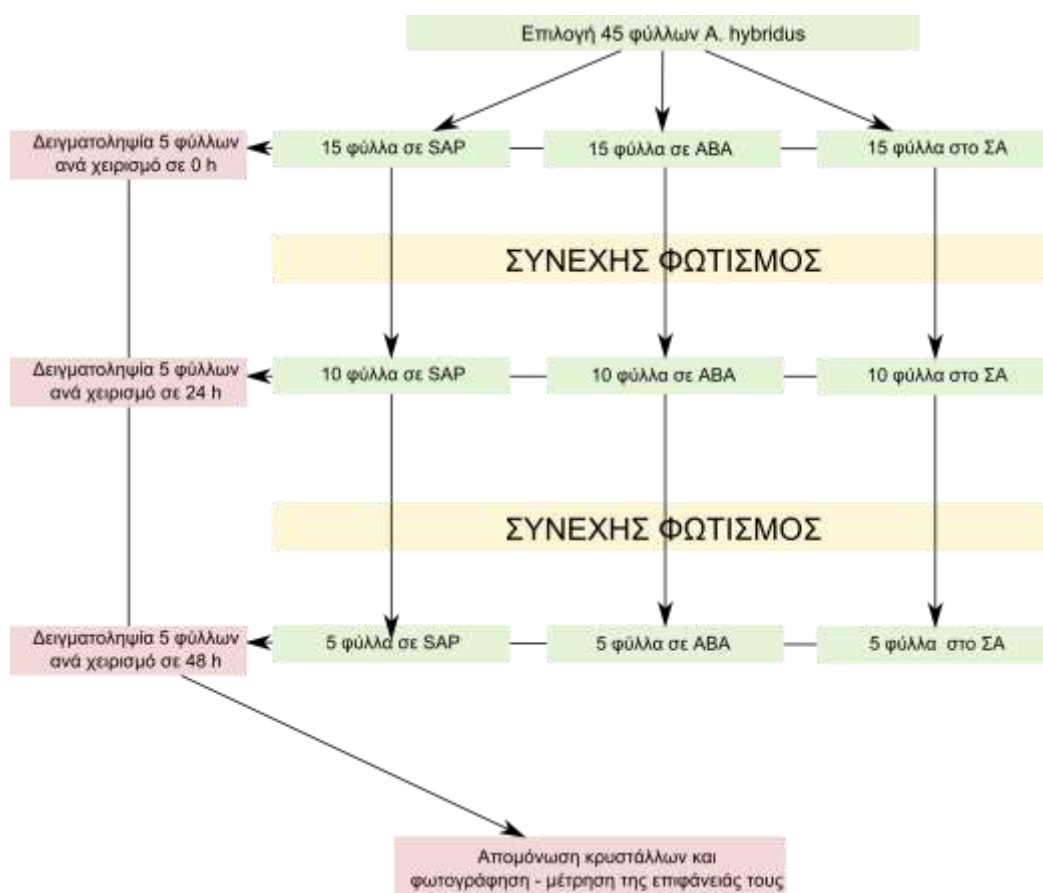
6.1.3.1. Πείραμα Π1



6.1.3.2. Πείραμα Π2



6.1.3.3. Πείραμα Β1



6.1.4. Τα στάδια των πειραμάτων των χαρακτηριστικών φθορισμού της χλωροφύλλης

