

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
«Βιοδραστικά προϊόντα και πρωτεϊνική τεχνολογία»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διατριβή της Φοιτήτριας
Δανάης - Ευγενίας Ε. Μαυροειδή
με θέμα:

**Ανατομικές και ιστοχημικές διαφορές στα φύλλα του
Teucrium polium L. κατά τη διάρκεια του έτους και
χημική ανάλυση των αιθέριων ελαίων του.**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΦΑΣΣΕΑΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2011

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

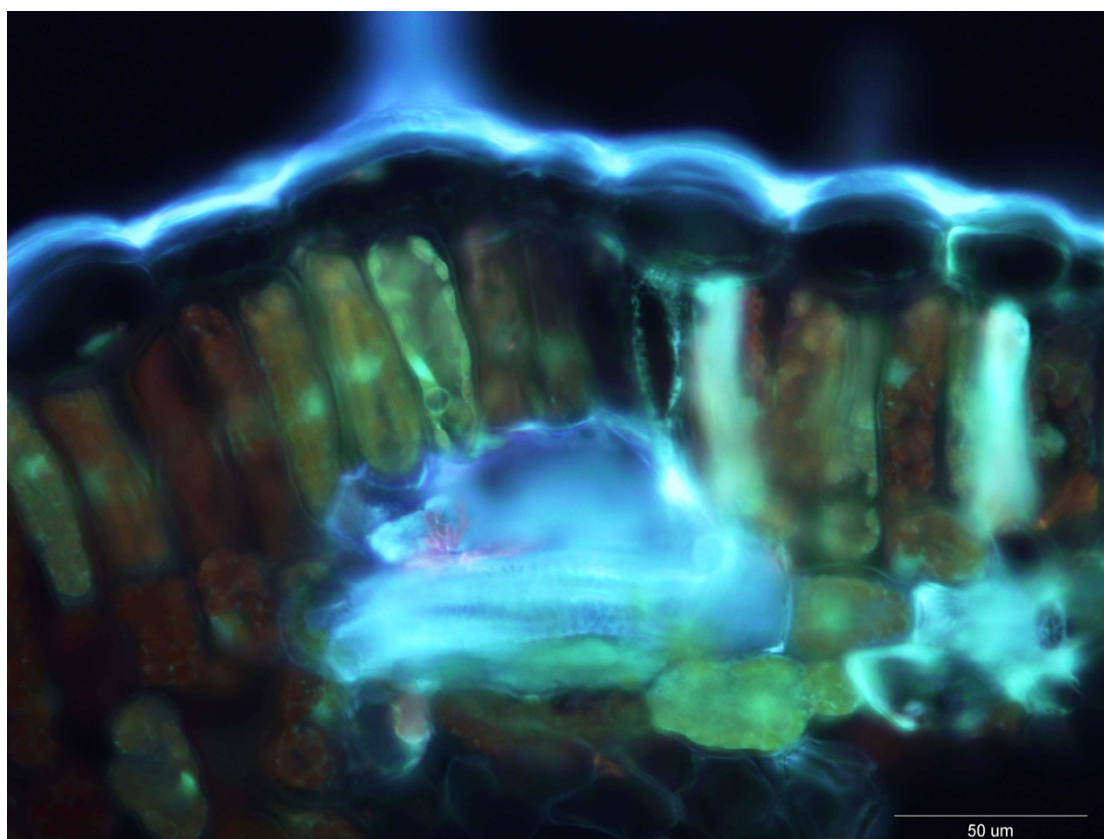
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών:
Βιοτεχνολογία και εφαρμογές στη γεωπονία
"Βιοδραστικά προϊόντα και πρωτεϊνική τεχνολογία"

Μεταπτυχιακή διατριβή της φοιτήτριας
Δανάης - Ευγενίας Ε. Μαυροειδή, με θέμα:

"Ανατομία και ιστοχημεία των φύλλων του φυτού *Teucrium polium* L. κατά τον ετήσιο κύκλο του και χημική ανάλυση των αιθέριων ελαίων του."



Επιβλέπων καθηγητής:
Κωνσταντίνος Φασσέας, Καθηγητής
ΑΘΗΝΑ, Μάρτιος 2011

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών:
"Βιοδραστικά προϊόντα και πρωτεϊνική τεχνολογία"

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ

Μεταπτυχιακή διατριβή της φοιτήτριας
Δανάης - Ευγενίας Ε. Μαυροειδή, με θέμα:

"Ανατομικές και ιστοχημικές διαφορές στα φύλλα του
Teucrium polium L. κατά τη διάρκεια του έτους και χημική
ανάλυση των αιθέριων ελαίων του."

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Φασσέας Κωνσταντίνος, Καθηγητής

ΜΕΛΗ:

Καραμπουρνιώτης Γεώργιος, Καθηγητής
Ταραντίλης Πέτρος, Επίκουρος Καθηγητής

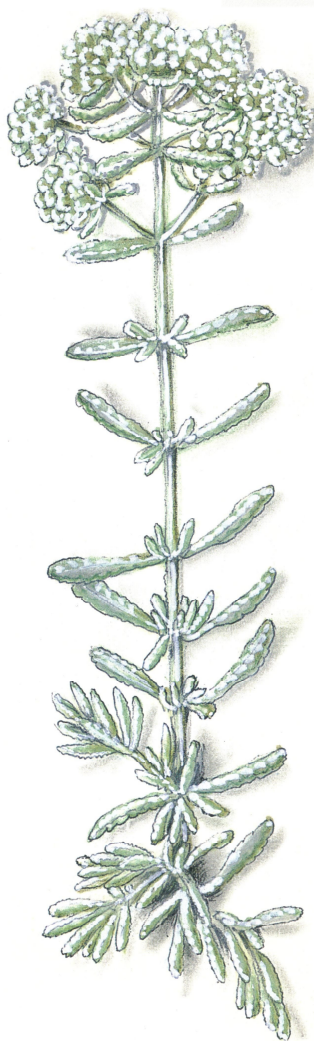
Teucrium polium

ΤΕΥΚΡΙΟΝ ΤΟ ΠΟΛΙΟΝ

Teucrium polium L.
(Labiatae ή Lamiaceae)

Τεύκριον τό πολιόν
(κ. Άσπρόχορτο ή Στομαχοβότανο)

Θαμνίον, άειθαλές, φρυγανῶδες,
20 – 30 εκ. ύψους, εκ τῶν χωρῶν τῆς
Μεσογείου, μέ φύλλα
λογχοειδῆ-σφηνοειδῆ, πριονωτά,
χνουδωτά και ἄνθη λευκά,
κατ' ἐπάκρια σφαιρικά κεφάλια,
ἐμφανιζόμενα κατά τήν περίοδον
Μαΐου-Ιουνίου. Τά φύλλα
καί τά ἄνθη τοῦ φυτοῦ ἔχουν
εὐχάριστον ἄρωμα,
μέ φαρμακευτικές ιδιότητες.



Από το λεύκωμα των έργων του κ. Εμμανουήλ Βάθη:
«ΤΑ ΦΥΤΑ ΤΟΥ ΠΑΡΚΟΥ ΤΗΣ ΑΡΧΑΙΑΣ ΑΓΟΡΑΣ»,
εκδόσεις ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ, 2002.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το *Teucrium polium* L. subsp. *capitatum* (L.), είναι ένας αειθαλής, πολυετής, φρυγανώδης θάμνος. Θεωρείται φαρμακευτικό φυτό και έχει μελετηθεί εκτενώς για τις βιολογικές του ιδιότητες. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκαν η ανατομία και ιστοχημεία των φύλλων του με τεχνικές μικροσκοπίας και εξετάστηκε το ενδεχόμενο να παρουσιάζει εποχικό διμορφισμό ή πολυμορφισμό. Επίσης, αναλύθηκαν τα αιθέρια έλαια του φυτού την εποχή της άνθισης με αέρια χρωματογραφία. Τα αιθέρια έλαια των ταξιανθιών και των φύλλων του *T. polium* παραλήφθηκαν χωριστά, με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης και βρέθηκε ότι οι ανθισμένες ταξιανθίες είχαν σχεδόν τριπλάσια απόδοση σε αιθέρια έλαια (1,65%) σε σχέση με τα φύλλα (0,45%). Αποτελούνται σχεδόν αποκλειστικά από μονοτερπένια και σεσκιτερπένια, οξυγονωμένα ή μη. Έχουν ως κύριο συστατικό το β-καρυοφυλλένιο, και στη συντριπτική πλειοψηφία τους τα συστατικά που συνιστούν τα αιθέρια έλαια είναι τα ίδια, αλλά ανιχνεύονται σε διαφορετικές αναλογίες.

Τα φύλλα του καλύπτονται από ένα πυκνό τρίχωμα που αποτελείται από μη αδενώδεις, δενδρώδους σχήματος και αδενώδεις τρίχες, πολλών τύπων, το οποίο προστατεύει τα φύλλα από τις συνθήκες καταπόνησης, του μεσογειακού κλίματος. Οι κεφαλοειδείς αδένες κατανέμονται ομοιόμορφα τόσο στην αποαξονική επιφάνεια όσο και στην προσαξονική, ενώ οι ασπιδοειδείς αδένες εμφανίζονται κυρίως στην αποαξονική. Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό του φύλλου είναι η παρουσία ιδιόβλαστων ελαιοκυττάρων-κοιλοτήτων που παρατηρούνται στο μεσόφυλλο, πάνω από τις δευτερεύουσες αγγειώδεις δεσμίδες. Φαίνεται να είναι κυτταρικής προέλευσης και πιθανά να σχετίζονται με τα κύτταρα του δεσμικού κολεού. Τα κυτταρικά τους τοιχώματα είναι ιδιαίτερα εμποτισμένα σε κουτίνη ή σουβερίνη, και φαίνεται πως συσσωρεύονται σε αυτούς κάποια λιπόφιλα συστατικά. Το γεγονός ότι μέσα σε αυτούς τους χώρους εντοπίζονται πλαστίδια μας επιτρέπει να υποθέσουμε ότι πρόκειται για ζωντανά εκκριτικά κύτταρα. Κάποια τέτοια δομή δεν βρέθηκε να αναφέρεται στη βιβλιογραφία για συγγενές ή άλλο είδος.

Η ανατομία των φύλλων του *T. polium* είναι αρκετά απλή και παρουσιάζει αρκετές εποχικές διαφορές. Γενικά, τους καλοκαιρινούς μήνες ενισχύονται χαρακτηριστικά που μπορεί να βοηθούν στον περιορισμό των απωλειών νερού, όπως: αύξηση του πάχους του ελάσματος των φύλλων και αυξημένη συστροφή που ισοδυναμεί με μειωμένη εκτεθειμένη επιφάνεια, αύξηση του πάχους των κυτταρικών τοιχωμάτων της επιδερμίδας και της εφυμενίδας, αύξηση του τριχώματος του ελάσματος. Επίσης παρατηρείται αύξηση του αριθμού των στρώσεων του πασσαλώδους παρεγχύματος και, ανάπτυξη υποτυπώδους κολλεγχύματος στα καλοκαιρινά φύλλα. Τα κύτταρα του μεσόφυλλου φαίνεται να συσσωρεύουν ελαιοσταγονίδια, των οποίων ο αριθμός και το μέγεθος αυξάνεται σημαντικά, τους ζεστούς μήνες του έτους. Επιπλέον, παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στη λεπτή

δομή των χλωροπλαστών. Αυτές οι διαφορές, πιθανά αποτελούν ένα μέρος της αμυντικής αντίδρασης του φύλλου έναντι στο ξηρό, ζεστό περιβάλλον και με πολύ υψηλή ηλιακή ακτινοβολία της περιοχής της Μεσογείου.

Τα αποτελέσματα των ιστοχημικών δοκιμών έδειξαν ότι τα τερπένια, και οι ταννίνες παράγονται κυρίως στις αδενώδεις τρίχες αλλά και στα κύτταρα του φύλλου, ενώ φλαβόνες και φλαβανόλες εντοπίζονται στα αδενώδη και μη αδενώδη τριχώματα. Θα μπορούσαμε να πούμε ότι η παραγωγή τερπενίων, φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων φαίνεται να είναι - και πάλι - αμυντική αντίδραση του φύλλου έναντι στις καταπονήσεις που προκύπτουν λόγω του μεσογειακού οικοσυστήματος και αυτό κατά μια εκδοχή εξηγεί την ευρεία χρήση αυτού του φυτού για φαρμακευτικούς σκοπούς.

Λέξεις κλειδιά: *Teucrium polium*, ανατομία φύλλου, ιστοχημεία, διμορφισμός, ξηρομορφισμός, αιθέρια έλαια, ιδιόβλαστα ελαιοκύτταρα

ABSTRACT

Teucrium polium L., is an evergreen, perennial phryganean subshrub. It is considered to be a medicinal herb and has been extensively investigated for its biological properties. In this study, microscopy techniques along with histochemical tests were employed for the investigation of the leaf of this Mediterranean shrub and assess the possibility that this plant shows seasonal dimorphism or polymorphism. Also, the essential oils were analyzed by gas chromatography on the plant's bloom time/ at the stage of flowering. The essential oils of the inflorescences and the leaves of *T. polium* were analyzed separately and were received by the hydrodistillation method. The results showed that inflorescences had nearly three times the yield of essential oils (1.65%) compared with leaves (0.45%). Their main component was found to be β -caryophyllene, but the majority of all other components were found to be the same, but at different proportions. They consist almost exclusively of sesquiterpenes and monoterpenes, hydrocarbons and oxygenated.

The leaves are covered with a dense indumentum consisting of a large number of long, multicellular, dendroid, non-glandular hairs, producing a thick pubescence covering the leaf glandular hairs of many types, which protects the leaves from the stress conditions, the Mediterranean climate. The capitate glands are evenly distributed on both surfaces while peltate glands occur mainly on the abaxial side of the leaves. Another important feature is the presence of leaf idioblasts observed in the mesophyll above the secondary vascular bundles. These seem to be of cellular origin and possibly related to the bundle sheath cells. The cell wall is highly impregnated with cutin or suberin, and seems to accumulate lipophilic components. However the fact that within those areas plastids were identified, lead us to the assumption we can assume that they are living secretory cells. No such structures have been reported in the literature for this or other related species.

The anatomy of the leaves of *T. polium* is quite simple and has several seasonal differences. Overall, during the summer the plant develops features that help the reduction of water losses, such is the increase of the thickness of the leaf lamina, increased curving of the leaf resulting in the decrease of the exposed area, increased thickness of cell walls of epidermis and cuticle and increase of the leaf indumentum. Also an increasing number of layers of palisade parenchyma and rudimentary development of collenchyma is observed in the summer leaves. Mesophyll cells appear to accumulate oil bodies, whose number and size increased significantly during the hot and dry months of the year. Moreover, there are significant differences in the ultrastructure of the chloroplasts. These differences constitute, probably part of a defensive reaction of the leaf to the dry, warm environment with very high solar radiation in the Mediterranean region.

The results of the histochemical tests showed that the terpenes and tannins are mainly produced in glandular hairs and mesophyll cells, while flavones and flavanols found in non-glandular and glandular trichomes. The production of terpenes, flavonoids and phenolic compounds appears to be a defensive reaction of the leaf against the stresses arising from the Mediterranean ecosystem and this can partly explain the widespread use of this plant for medicinal purposes.

Key words: *Teucrium polium*, leaf anatomy, histochemistry, dimorphism, xeromorphism, essential oils, idioblasts

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Μια πτυχιακή μελέτη δεν αποτελεί έργο μόνο του φοιτητή που την εκπονεί, αλλά και πολλών άλλων, των οποίων η συμβολή είναι καθοριστική για την ολοκλήρωση της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Κωνσταντίνο Φασσέα, Καθηγητή και διευθυντή του εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας και εισηγητή της μελέτης αυτής, για την επιλογή του θέματος το οποίο κίνησε ιδιαίτερα το ενδιαφέρον μου. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την επιστημονική καθοδήγηση και την υποστήριξη του και πάνω απ' όλα για την πολύ καλή συνεργασία μας, τόσο κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας όσο και καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Ακόμη θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για τις πολύτιμες γνώσεις που αποκόμισα φοιτώντας κοντά του, τόσο αναφορικά με τη θεωρητική κατάρτιση όσο και με τις τεχνικές μικροσκοπίας.

Επίσης, ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στον κ. Ι. Ψαροκωστόπουλο, Ε.Τ.Ε.Π. του Εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, για την τεχνική του υποστήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές του αλλά και τη γενικότερη παρουσία του στο εργαστήριο, την αξιοπιστία του, τη σταθερότητά του και την προθυμία του, με τη μακρόχρονη εμπειρία του, να βοηθήσει στην επίλυση κάθε είδους τεχνικού προβλήματος που αντιμετωπίζουν όλοι οι φοιτητές του εργαστηρίου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον κ. Πέτρο Ταραντίλη, επίκουρο καθηγητή, για την πρόσκληση του στο εργαστήριο της χημείας και την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το πολύ ενδιαφέρον αντικείμενο της ενόργανης ανάλυσης. Τον ευχαριστώ για τη συνδρομή του, το χρόνο του καθώς και για τις πολύ εύστοχες και χρήσιμες παρατηρήσεις του.

Από καρδιάς θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον κ. Μόσχο Πολυσίου, καθηγητή και διευθυντή του εργαστηρίου της Χημείας, καθώς και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου της Χημείας για τη φιλοξενία και την πολύτιμη συνδρομή τους. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην κ. Δήμητρα Δαφερέρα, για τη πολύτιμη βοήθειά της, την τεχνική υποστήριξη και τις συμβουλές της καθώς επίσης και για το χρόνο που αφιέρωσε.

Θα ήταν μεγάλη παράλειψη να μην ευχαριστήσω θερμά τον κ. Νικόλαο Χριστοδουλάκη, αναπληρωτή καθηγητή, για τη πολύτιμη συνεργασία του, αποτέλεσμα της οποίας ήταν και μια δημοσίευση που αποτελεί μέρος της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, κ. Γεώργιο Καραμπουρνιώτη, καθηγητή και κ. Πέτρο Ταραντίλη, επίκουρο καθηγητή, για τον χρόνο που διέθεσαν για την αξιολόγηση της εργασίας καθώς και τις υποδείξεις τους.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Σμαράγδα Κόλλια και όλους τους φοιτητές του εργαστηρίου για την συνεργασία και για το ευχάριστο κλίμα μέσα στο οποίο εκπονήθηκε αυτή η εργασία.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ την οικογένειά μου που με στήριξε με κάθε τρόπο στην προσπάθειά μου αυτή καθώς επίσης καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Πίνακας περιεχομένων:

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	Βοτανική ταξινόμηση	1
1.1.1	Το <i>Teucrium polium</i> ως φαρμακευτικό φυτό από την αρχαιότητα	4
1.1.2	Βιολογικές δράσεις του <i>Teucrium polium</i> L.....	5
1.1.3	Αντιοξειδωτικές ιδιότητες	8
1.2	Η σύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών και η σχέση τους με την αντιμετώπιση των βιοτικών παραγόντων καταπόνησης.	9
1.2.2	Δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν ανιχνευτεί στο <i>Teucrium polium</i>	17
1.2.3	Φυσικά προϊόντα ως πηγή νέων φαρμάκων	17
1.3	Το <i>Teucrium polium</i> ανήκει στη φρυγανώδη βλάστηση.....	18
1.3.1	Τα φρύγανα αντιμετωπίζουν τις καταπονήσεις του Μεσογειακού οικοσυστήματος.....	21
1.3.2	Διμορφισμός φύλλων	24
1.4	Η συμβολή των μορφολογικών χαρακτήρων στην θεμελιώδη άμυνα.	27
1.4.1	Τα επιδερμικά εξαρτήματα συνεισφέρουν στην προστασία των φυτικών ιστών:	30
1.4.2	Αιθέρια έλαια	38
1.4.3	Πιθανοί ρόλοι των αιθέριων ελαίων για το φυτό.	39
1.5	Αιθέρια έλαια του <i>Teucrium polium</i> L.....	40
1.6	Ανατομικά χαρακτηριστικά του <i>Teucrium polium</i>	43
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	47
2.1	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ-ΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	47
2.1.1	Προετοιμασία παρασκευασμάτων για παρατήρηση ημίλεπτων τομών με το οπτικό μικροσκόπιο(Ο.Μ) και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (Η.Μ.Δ)	47
2.1.2	Προετοιμασία παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Η.Μ.Σ.).....	48
2.1.3	Τμήση τομών και χρώση μονιμοποιημένων παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το Οπτικό Μικροσκόπιο (Ο.Μ.) και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (Η.Μ.Δ).....	50
2.1.4	Προετοιμασία νωπών παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το Οπτικό Μικροσκόπιο (Ο.Μ.)	52
2.1.5	Ιστοχημεία	53
2.1.6	Μικροσκόπια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τις μορφολογικές, ανατομικές και ιστοχημικές παρατηρήσεις	56
2.1.7	Φωτογράφιση	56

2.2	ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΚΑΙ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ	57
2.2.1	Συλλογή φυτικού υλικού	57
2.2.2	Παραλαβή αιθέριου ελαίου με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης	57
2.2.3	Συνθήκες ανάλυσης αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών.	58
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	61
3.1	ΑΝΑΤΟΜΙΚΑ – ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	61
3.1.1	Μακροσκοπικές παρατηρήσεις	61
3.1.2	Ιστοχημεία	62
3.1.3	Ανατομία φύλλου	64
3.2	Χημική Ανάλυση του Αιθέριου Ελαίου του <i>Teucrium polium</i>	69
3.3	ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	76
3.3.1	Χειμώνας. (Ιανουάριος).....	82
3.3.2	Χειμώνας προς άνοιξη (Μάρτης).....	83
3.3.3	Άνθιση - Μάιος	84
3.3.4	Ιούλιος	85
3.3.5	Σεπτέμβρης	87
4	Συζήτηση.....	97
4.1	Αιθέρια έλαια	97
4.2	Ανατομικά χαρακτηριστικά.....	100
5	Βιβλιογραφία:.....	109

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το *Teucrium polium* L. subsp. *capitatum* (L.) Arcangeli, ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae και το γένος *Teucrium*. Είναι ένας αειθαλής, πολυετής, φρυγανώδης θάμνος με ύψος 20-45 cm.. Τα φύλλα του είναι λογχοειδή–σφηνοειδή, πριονωτά, πολύ χνουδωτά με συστρεφόμενα χεῖλη. Τα άνθη του είναι μικρά και λευκά και φύονται σε πυκνά, σχεδόν σφαιρικά κεφάλια επάκρια (Ζερλέντης 1981, Βάθης 2002, Antunes et al. 2004).

Αυτοφύεται σε άγονα, πετρώδη μέρη και λόφους των μεσογειακών χωρών, αλλά εμφανίζεται μέχρι και σε υψόμετρο 2100 m.. Το *T. polium*, ευδοκμεί σε ασβεστολιθικά και σερπεντινικά εδάφη (Lakusic et al. 2010). Όλα τα εναέρια μέρη του φυτού καλύπτονται από αδενώδη και μη αδενώδη τριχώματα (Antunes et al. 2004). Το φύλλωμα απελευθερώνει ένα ευχάριστο άρωμα.

1.1 Βοτανική ταξινόμηση

ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ

Βασίλειο: *Plantae* - Haeckel, 1866 - Plants

Υποβασίλειο: *Viridaeplantae* - Cavalier-Smith, 1981

Φύλο: *Tracheophyta*- Sinnott, 1935 Ex Cavalier-Smith, 1998 - Vascular Plants

Υποφύλο: *Radiatopses* - Kenrick & Crane, 1997

Κλάση: *Magnoliopsida* - Brongniart, 1843 - Dicotyledons

Υποκλάση: *Lamiidae*- Takhtajan Ex Reveal, 1992

Υπόταξη: *Lamianae*- Takhtajan, 1967

Τάξη: *Lamiales*- Bromhead, 1838

Οικογένεια: *Lamiaceae* - Lindley, 1836, Nom. Cons. - Mint Family

Υπο-οικογένεια: *Ajugoiideae*

Τριττύς: *Teucriae*

Γένος: *Teucrium*- Linnaeus, Sp. Pl. 2: 562. 1753.

Είδος: *polium*

Υποείδος: *capitatum*

Botanical name: - *Teucrium polium capitatum* (L.) Arcang. (≡) *Teucrium capitatum* L. (basionym)

Η οικογένεια Lamiaceae

Η οικογένεια Lamiaceae ανήκει στην τάξη Lamiales, μια πολυπληθή τάξη που περιλαμβάνει κυρίως ποώδη και θαμνώδη φυτά με φύλλα αντίθετα. Μαζί με τα φυτά της τάξης Scrophulariales, έχουν κοινό χαρακτηριστικό την ζυγομορφία των ανθέων (Βαρδαβάκης 1993, Μπαμπαλωνάς και Κοκκίνη 2004).

Η οικογένεια των Χειλανθών, περιλαμβάνει κυρίως ποώδη (ετήσια ή πολυετή) φυτά και φρύγανα που ευδοκιμούν σε θερμά και ξηρά κλίματα όπως οι παραμεσόγειες χώρες, και αριθμεί περίπου 3500 είδη ευρύτατης εξάπλωσης χρήσιμα ως αρωματικά, φαρμακευτικά, μελισσοτροφικά, αρτυματικά και καλλωπιστικά. Η οικογένεια Lamiaceae έχει σαφείς φυλογενετικές σχέσεις με την οικογένεια Verbenaceae (Σαρλής Γ. 1999).

Τα φυτά της οικογένειας Lamiaceae έχουν κάποια χαρακτηριστικά γνωρίσματα που τα διακρίνουν. Τα φύλλα και οι βλαστοί καλύπτονται συνήθως με αδενώδεις τρίχες από τις οποίες εκκρίνονται αιθέρια έλαια. Ο βλαστός σε εγκάρσια τομή είναι τετράγωνος. Τα φύλλα είναι αντίθετα και ανά ζεύγος σταυροειδώς τοποθετημένα (Μπαμπαλωνάς και Κοκκίνη 2004).

Τα άνθη είναι ζυγόμορφα, με δίχειλη στεφάνη, δομή που εξυπηρετεί την επικονίαση με τα έντομα. Διατάσσονται στις μασχάλες των φύλλων ή επάκρια και σχηματίζουν συνήθως μονοχάσια ή διχάσια και σπάνια βότρυ ή στάχυ. Οι στήμονες είναι δυο ή τέσσερεις, συχνά διδύναμοι, δηλαδή σχηματίζουν 2 ανισοϋπή ζεύγη. Η ωοθήκη αποτελείται από δυο καρπόφυλλα και χωρίζεται με ψευδοδιαφράγματα σε 4 χώρους στους οποίους περιέχεται μια ανάτροπη σπερματική βλάστη. Ο στύλος είναι απλός και καταλήγει σε δισχιδές στίγμα. Ο ξηρός καρπός διασπάται σε τέσσερα μονόσπερμα κάρυα (Σαρλής 1999, Βαρδαβάκης 1993).

Το γένος *Teucrium*

Το γένος *Teucrium* της υποοικογένειας *Ajugoidea* της οικογένειας Lamiaceae (Harley et al. 2004), χαρακτηρίζεται από ζυγόμορφη δίχειλη στεφάνη τύπου 0/5 (Σαρλής 1999). Το γένος αυτό περιλαμβάνει περίπου 340 είδη, (Brown 1995) κυρίως φρύγανα και χαμηλούς θάμνους, τα περισσότερα από τα οποία υπάρχουν σε αφθονία στην Ευρώπη και κυρίως στην παραμεσόγειο περιοχή. Σύμφωνα με τους Greuter et al. (1986) στην περιοχή της Μεσόγειου υπάρχουν 195 ταξινομικές μονάδες στο επίπεδο του είδους και υποείδους. Η διαίρεση του *Teucrium* σε τομείς, στηρίχθηκε κατά πολύ σε μορφολογικούς χαρακτήρες (κάλυκες και ταξιανθίες). Θεωρείται ταξινομικά δύσκολο γένος (Marin et al. 1994, Jurisic-Grubestic et al. 2007).

Έχουν δημοσιευθεί πολλές εργασίες στις οποίες μελετάται η ταξινόμηση του γένους, ως προς κάποιους μικρομορφολογικούς χαρακτήρες, καρυολογικά δεδομένα και άλλα χαρακτηριστικά όπως η σύνθεση κάποιων δευτερογενών μεταβολιτών. Πρόσφατα, έχει

καταδειχθεί ότι τα φλαβονοειδή και κάποια «neoclerodane» διτερπένια μπορεί να είναι καλοί χημειοταξινομικοί δείκτες (Harborne et al. 1986). Οι μικρομορφολογικοί χαρακτήρες όπως τα τριχώματα σε όλα τα εναέρια μέρη του φυτού, το ανάγλυφο των καρπών (nutlets) καθώς και της γύρης συμβάλουν στην ταξινόμηση αυτού του γένους (Navarro & El Oualidi 2000, Jurisic-Grubescic et al. 2007, Marin et al. 1994, Diej et al. 1993). Προβλήματα όμως εξακολουθούν να υπάρχουν ως προς την ταξινόμηση του γένους και ποικίλει ο τρόπος που χωρίζεται σε τομείς και υποτομείς από τους διάφορους ερευνητές (Marin et al. 1994, Navarro 1997).

Το γένος *Teucrium* είναι μεγάλο και πολυμορφικό. Περιλαμβάνει είδη φυτών που ευδοκιμούν σε όλες τις ηπείρους, ωστόσο η παραμεσόγειος περιοχή αντιπροσωπεύει το σημαντικότερο τομέα της διανομής του γένους, όπου και εμφανίζονται τα περισσότερα είδη (Navarro & El Oualidi 2000, Lakusic 2010). Πολλά από τα φυτά του γένους, όπως και το *Teucrium polium*, θεωρούνται φαρμακευτικά από πολύ παλιά και χρησιμοποιούνται για την παρασκευή αφεψημάτων αλλά και ως βελτιωτικά γεύσης ή καρυκεύματα (Tardio et al. 2006, Facciola 1990). Η σημασία αυτού του γένους σε βιομηχανίες τροφίμων έγκειται επίσης στο γεγονός, ότι πολλά είδη έχουν αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντιμυκητιακές δράσεις και είναι χρήσιμα ως φυσικά συντηρητικά. Το γένος *Teucrium* αποτελεί μια από τις πλουσιότερες πηγές διτερπενίων (πάνω από 220 είδη έχουν περιγραφεί ως τώρα) (Menichini et al. 2009). Το γένος *Teucrium* είναι πλούσιο σε «clerodane» διτερπένια - ένα είδος διτερπενίων, τα οποία έχουν τοξική δράση για τα έντομα, αποτρέποντάς τα από το να καταναλώνουν τους φυτικούς ιστούς που τα περιέχουν, ενώ έχουν σημαντικό ρόλο στις φαρμακολογικές ιδιότητες των φυτών (Hanson 1995).

Τομέας *Polium*

Το *T. polium* ανήκει στον τομέα *Polium* (Mill.) Schreb (Marin et al. 1994). Ο τομέας *Polium* χαρακτηρίζεται από (1) πυκνή επάκρια (capitate), βοτρυώδη ταξιανθία (2) ελικοειδώς τοποθετημένα άνθη (3) υποακτινόμορφο (subactinomorphic) κάλυκα και (4) συστρεφόμενα στα άκρα φύλλα. Πολλά είδη έχουν ευρεία εξάπλωση και είναι πολυτυπικά. Οι διάφοροι πληθυσμοί των ειδών του τομέα *Polium* παρουσιάζουν αξιόλογη μορφολογική ποικιλία, αλλά και εντός των πληθυσμών πολλά μορφολογικά χαρακτηριστικά θεωρούνται ασταθή (El Oualidi et al. 1997). Οι El Oualidi et al. (1997), μελετώντας τον τομέα *Polium* παρατήρησαν ότι τα διάφορα είδη παρουσίαζαν έντονη παραλλακτικότητα και διαπίστωσαν ότι περιλαμβάνονταν τετραπλοειδείς πληθυσμοί στην Ισπανία και τη Γαλλία.

Ο τομέας *Polium* είναι σχετικά ομοιογενής και τα είδη παρουσιάζουν παρόμοια άνθη και ταξιανθίες, ενώ χαρακτηρίζονται από τρίχωμα στα φύλλα και το βλαστό. Γενικά, οι διακλαδισμένες μη αδενώδεις τρίχες παραπέμπουν στον τομέα *Polium* (Navarro & El Oualidi

2000). Σύμφωνα με τους El Oualidi et al. (1996a), θεωρείται ο περισσότερο εξελεγμένος τομέας λόγω της παρουσίας της πυκνής βοτρυνώδους ταξιανθίας, των διακλαδισμένων τριχών, κάλυκα με δόντια που έχουν κάλυμμα ή καταλήγουν σε αιχμές και το υψηλό ποσοστό πολυπλοειδίας σε κάποια είδη· όπως αναφέρεται στους El Oualidi et al. (1999).

1.1.1 Το *Teucrium polium* ως φαρμακευτικό φυτό από την αρχαιότητα

Το *Teucrium polium* έχει χρησιμοποιηθεί για πάνω από 2000 χρόνια στην παραδοσιακή ιατρική ως χολαγωγικό, τονωτικό, διουρητικό και για διάφορους τύπους παθολογικών καταστάσεων, όπως γαστρεντερικές διαταραχές και φλεγμονές (Abdollahi et al 2003).

Το *T. polium*, παίρνει το όνομά του από το χρώμα του. Πολιός σημαίνει λευκός-υπόλευκος, αυτός που έχει ψαρόλευκα μαλλιά (Μπαμπινιώτης 2005). Ο Διοσκουρίδης κατά την περιγραφή του *T. polium* αναφέρεται σε ένα λευκό φυτό το οποίο φέρει λευκά τριχίδια 'ΕΧΟΝΤΑΣ ΤΙ ΩΣ ΠΟΛΙΑΣ ΤΡΙΧΑΣ' (Διοσκουρίδης 77μ.Χ.). Κατά μία άλλη εκδοχή παίρνει το όνομά του από τα λευκά του άνθη που φύονται επάκρια και παρομοιάζονται με τα λευκά μαλλιά. Το λατινικό όνομα του γένους *Teucrium* προέρχεται από τον Τεύκρο, βασιλιά της Τροίας, ο οποίος λέγεται ότι ήταν ο πρώτος που το χρησιμοποίησε σαν θεραπευτικό (Baumann H. 1999).

Συναντάται με πολλές κοινές ονομασίες όπως: Τεύκριον το πολιόν, Πολιό, Ασπρόχορτο Στομαχοβότανο, Λαγοκοιμιθιά, Πολιόν του βουνού, Αγαποβότανο, Παναγιόχορτο, Σπληνοβότανο, Αντωναΐδα, της Κυράς το χόρτο, Λιβανόχορτο.

Στο φυτολογικό λεξικό του Θεόφραστου (1998), γίνεται μία λεπτομερής περιγραφή του φυτού και αναφέρεται ότι στην λαϊκή θεραπευτική χρησιμοποιείται για παθήσεις της αναπνευστικής οδού και για δερματικά προβλήματα. Μια ωραία περιγραφή του πολύχρηστου παναγιόχορτου, μας άφησε και ο Πλίνιος (21.19.84). Κατά τον Μουσαίο και τον Ησίοδο, συνιστάται να αλείφεται με «πόλιον» όποιος επιδιώκει δόξα και αξία και το φυτό να καλλιεργείται και να βρίσκεται πάντα διαθέσιμο για τα δαγκώματα των φιδιών. Οι γιατροί το έδιναν με ξύδι στους σπληνοπαθείς και με κρασί σε αυτούς που υπόφεραν από το συκώτι. Στις γυναίκες το βότανο κάνει καλό στους πόνους του στομαχιού, εκκενώνει την κύστη και επιδρά στα ερεθισμένα μάτια. Το κοινό όνομα «παναγιόχορτο» οφείλεται στις θεραπευτικές και προστατευτικές ιδιότητες του φυτού. Στη σύγχρονη λαϊκή ιατρική το έκχυμα του φυτού συνιστάται για το έλκος του στομάχου και γι αυτό υπάρχει και το όνομα «στομαχοβότανο». (Baumann 1999)

Οι αρχαίοι Έλληνες εκτιμούσαν πολύ τις ευεργετικές θεραπευτικές ιδιότητες του μικρού αυτού αρωματικού βοτάνου και πίστευαν ότι γιατρεύει τα πάντα, ήταν κάτι σαν πανάκεια. Ο Διοσκουρίδης (77μ.Χ.) το συνιστούσε σαν φάρμακο για στομαχόπονους, πυρετούς και

κρυολογήματα. Μέσα σε κρασί εθεωρείτο φάρμακο για τον ίκτερο και αποτελεσματικό διουρητικό. Ο Ησίοδος, αρχαίος Έλληνας ποιητής, συμβούλευε να καλλιεργείται το τεύκριο και να είναι πάντα πρόχειρο για δαγκωματιές από φίδια και διάφορα άλλα δηλητήρια. (Baumann 1999)

Το κοινό Ελληνικό όνομα για το τεύκριο «Παναγιόχορτο» - χορτάρι της Παναγίας – δείχνει πόσο πολύτιμο το θεωρούσαν. Στην Ελλάδα σήμερα χρησιμοποιείται για το ζάχαρο, το βήχα, το κρυολογήμα, ως επουλωτικό του έλκους και κατά της χοληστερίνης. Θεωρείται επίσης άριστο τονωτικό (Simson 2003).



Εικόνα 1. *Teucrium polium* στην περιοχή του Υμηττού.

1.1.2 Βιολογικές δράσεις του *Teucrium polium* L.

Αναφέρονται στη βιβλιογραφία πλήθος ιδιότητες και βιολογικές δράσεις που αποδίδονται στο *Teucrium polium* L.. Από σχετικές μελέτες που έχουν γίνει, το αιθανολικό εκχύλισμα της ανθισμένης ταξιανθίας, φαίνεται να έχει αντιβακτηριδιακές ιδιότητες και αντιπυρετικούς παράγοντες (Autore et al. 1984). Το υδατικό εκχύλισμα των φύλλων μπορεί να ρίξει την πίεση του αίματος (Suleiman et al. 1988), ενώ το αιθέριο έλαιο του φυτού φαίνεται να είναι δραστικό ως αναλγητικό, καθώς επίσης και ως σπασμολυτικό (Abdollahi et al. 2003). Οι Baluchnejadmojarad et al. (2005) προτείνουν ως θεραπευτική ιδιότητα του εκχυλίσματος *T. polium*, τη θεραπεία της διαβητικής υπεραλγησίας καθώς διαπίστωσαν ότι είχε αντιερεθιστική-αναλγητική κατευναστική δράση σε διαβητικά ποντίκια που τους χορηγήθηκε το εκχύλισμα του φυτού. Τα αποτελέσματα των Shakhaneh & Atrouse (2000) δείχνουν ότι το *T. polium* περιέχει έναν ή περισσότερους ισχυρούς και μη επιλεκτικούς νευροτοξικούς παράγοντες με αντιφλεγμονώδη δράση.

Οι Menichini et al. (2009) διαπίστωσαν την αντιφλεγμονώδη δράση, καθώς και την *in vitro* κυτοτοξική δράση έναντι τριών σειρών ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων, των αιθέρων ελαίων του *T. polium* ssp. *capitatum*. Το αιθανολικό εκχύλισμα του *T. polium*, σε δόση 500 mg/kg βάρους σώματος, ανέστειλε σημαντικά κάποια προκαλούμενη φλεγμονή (Tariq et al. 1989). Οι Carasso et al. (1983), σε αντίστοιχο πείραμα, αξιολογούν τη δράση του αιθανολικού εκχυλίσματος, ως συγκρίσιμη με αυτή της ινδομεθακίνης.

Πρόσφατα, η αξιολόγηση της κυτοτοξικής επίδρασης του αιθανολικού εκχυλίσματος του *T. polium* σε τέσσερις σειρές καρκινικών κυττάρων, έδειξε ότι το εκχύλισμα καταστέλλει την ανάπτυξη όλων των κυτταρικών σειρών (Nematollahi-Mahani et al. 2007). Τα αποτελέσματα αντίστοιχης έρευνας, δείχνουν ότι το υδατικό εκχύλισμα του *T. polium*, μπορεί να έχει κάποιο θεραπευτικό ρόλο στη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τη μετάσταση (εισβολή- κινητικότητα) των καρκινικών κυττάρων (Kandouz et al. 2009). Το μεθανολικό εκχύλισμα του *T. polium* φαίνεται να μπορεί να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας του καρκίνου δρώντας ως παράγοντας ευαισθητοποίησης σε κάποια αντικαρκινικά φάρμακα (Rajabalian 2008), ενώ σε εργασία των Badisa et al. (2003) δεν έδειξε κάποια κυτοτοξική δραστηριότητα στις σειρές των κυττάρων που δοκιμάστηκε (κανονικών και καρκινικών).

Το υδατικό εκχύλισμα εναέριων τμημάτων *T. polium*, έδειξε να έχει υπολιπιδαιμική δράση σε μοντέλο υπερλιπιδαιμικών ζώων στα οποία χορηγήθηκε (ενδοπεριτοναϊκώς) και μείωσε σημαντικά τα επίπεδα της χοληστερόλης (29-46%) και των τριγλυκεριδίων (έως 34%) σε υπερλιπιδαιμικούς αρουραίους (Rasekh et al. 2001).

Το πρωτογενές εκχύλισμα του *T. polium* (αιθανόλη:νερό, 7:3, v/v), φαίνεται να έχει σημαντική υπογλυκαιμική δράση, όπως έδειξαν πειράματα σε διαβητικά ποντίκια, που υποβλήθηκαν σε κατάλληλη αγωγή και σημειώθηκε μεγάλη μείωση στα επίπεδα της γλυκόζης και ταυτόχρονη αύξηση στα επίπεδα της ινσουλίνης στο αίμα. (Esmaeili & Yazdanparast 2004). Οι Gharaibeh et al. (1988) έδειξαν ότι το υδατικό εκχύλισμά του, προκάλεσε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα 4h μετά από την ενδοφλέβια χορήγηση και 24h μετά από την ενδοπεριτοναϊκή. Αυτή η επίδραση πιθανολογούν ότι οφείλεται στην αύξηση του περιφερειακού μεταβολισμού της γλυκόζης παρά στην αύξηση στην απελευθέρωση της ινσουλίνης. Οι Vessal et al. (2003), εκφράζουν την πιθανή συσχέτιση των φλαβονοειδών που περιέχει το φυτό με την υπογλυκαιμική δράση του φυτού.

Εξετάστηκε η δράση του συμπυκνωμένου μεθανολικού εκχυλίσματος καθώς και μίγματος των φαινυλοαιθανοειδών που απομονώθηκαν από αυτό (poliumoside και teupolioside), ως παράγοντες κατά της ανάπτυξης διαφόρων βακτηρίων (*Staphylococcus aureus*, *Flexner's bacillus*, *Friedlander's bacillus* εντεροβακτήρια και *proteus*). Διαπιστώθηκε ότι αναστέλλουν εξίσου την ανάπτυξη των βακίλου δυσεντερίας σε συγκεντρώσεις των 0,3-0,6 mg/ml,

ανάλογα με το στέλεχος, και σε υψηλότερες δόσεις (1.2 έως 2.5 mg/ml) καταστέλλουν την ανάπτυξη των σταφυλόκοκκων, του βακίλου Friedlander, και των εντεροβακτηρίων, και σε δόσεις μεγαλύτερες από 2,5mg/ml, ανέστειλαν και την ανάπτυξη των proteus. Σε αντίστοιχη μελέτη οι Darabpour et al. (2010), είχαν ανάλογα αποτελέσματα, και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το αιθανολικό εκχύλισμα των εναέριων τμημάτων του *T. polium* έχει σημαντική αντιμικροβιακή δράση, ενώ προτείνουν ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν πηγή αντισηπτικών συστατικών για φαρμακευτική χρήση.

Φυτικά φαρμακευτικά προϊόντα χρησιμοποιούνται σε πολλά μέρη του κόσμου. Ωστόσο, δεν επιφέρουν πάντα τα επιθυμητά αποτελέσματα και έχουν αναφερθεί πολλές περιπτώσεις ηπατοτοξικότητας. Σε μελέτη που αφορούσε στην υπογλυκαιμική δραστηριότητα του υδατικού εκχυλίσματος του *T. polium* σε ποντίκια, παρατηρήθηκε πολύ σημαντική μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα υπεργλυκαιμικών ζώων, αλλά ταυτόχρονα αλλοιώσεις στους ιστούς του ήπατος των ζώων και νεκρώσεις ηπατοκυττάρων (Zal et al. 2001).

Οι Savvidou et al. (2006), δημοσίευσαν δύο περιπτώσεις Ελληνίδων ασθενών στις οποίες προκλήθηκε ηπατίτιδα, όταν χρησιμοποίησαν συστηματικά το εκχύλισμα *T. polium* για τον έλεγχο των επιπέδων χοληστερόλης. Και οι δυο ασθενείς παρουσίασαν υψηλή συγκέντρωση σε αμινοτρανσφεράσες μετά την κατανάλωση τσαγιού βοτάνων για 2 ή 3 μήνες. Διακοπή της κατανάλωσης του φυτικού φαρμάκου οδήγησε στην εξομάλυνση των ηπατικών ένζυμων και στις δύο ασθενείς.

Οι Rasekh et al. (2005), σε μελέτη που έγινε σε αρουραίους για την τοξικότητα του υδατικού εκχυλίσματος του *T. polium*, έδειξαν ότι δεν προκλήθηκαν συμπτώματα τοξικότητας ακόμα και σε υψηλές δόσεις (8g/kg). Στην συγκεκριμένη μελέτη, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές σε αιματολογικές παραμέτρους έπειτα από 44 ημέρες αγωγής. Σε αντίστοιχη μελέτη των Khleifat et al. (2002), διερευνήθηκε η επίδραση της χρόνιας χορήγησης του αιθανολικού εκχυλίσματος του *T. polium* σε διάφορες βιοχημικές παραμέτρους του αίματος, ιστοπαθολογικές εξετάσεις του ήπατος και των νεφρών, καθώς και της γονιμότητας σε αρουραίους. Οι αιματολογικές και βιοχημικές παράμετροι του αίματος, καθώς και ο αριθμός, η μορφολογία και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, ήταν φυσιολογική μετά από 6 εβδομάδες θεραπείας, τόσο στη χαμηλή όσο και στην υψηλή δόση. Παρατήρησαν όμως μετά από μακροπρόθεσμες συνθήκες χορήγησης της υψηλής δόσης, ορισμένες ιστοπαθολογικές επιπτώσεις για το ήπαρ και τους νεφρούς.

Μέσα από τη σχετική βιβλιογραφία μπορούμε να βρούμε κάποιες συσχετίσεις της χημικής σύστασης και των βιολογικών δράσεων του φυτού όπως αποδίδονται από τους ερευνητές.

Οι Zal et al (2001) συμπέραναν πως η ηπατοτοξικότητά του οφειλόταν κυρίως σε κάποιο μεταβολίτη του κυτοχρώματος p450 των συστατικών φουρανο- και clerodane- διτερπένια, στηριζόμενοι στα συμπεράσματα παρόμοιας εργασίας για το συγγενές είδος (*T. chamaedrys*). Οι Savvidou et. al (2006) ομοίως, αποδίδουν την ηπατοτοξική δράση του *T. polium*, στην

ύπαρξη πολλών clerodane- και φουρανό- διτερπενίων, που χαρακτηρίζουν γενικά το γένος *Teucrium*, και έχουν βρεθεί και στο *T. polium* (L.) ssp. *capitatum*, στηριζόμενοι στα συμπεράσματα αντίστοιχης έρευνας για άλλο υποείδος *Teucrium*.

Η αντισπασμωδική δράση του ελαίου του *T. polium* αποδίδεται στην υψηλή περιεκτικότητά του σε σесκιτερπενικές αλκοόλες και σесκιτερπένια που είναι τα πιο αντιπροσωπευτικά συστατικά των υπό εξέταση ελαίων, είχε προηγουμένως αναφερθεί ότι παρουσίαζαν κυτοτοξική δραστηριότητα κατά διαφόρων κυτταρικών σειρών, καθώς επίσης και η αντιφλεγμονώδη δράση του σύμφωνα με τους Medeiros et al. (2007) και Sylvestre et al. (2007), όπως αναφέρεται από τους Menichini et al. (2009).

Οι Rasekh et al. (2001), αποδίδουν τις αντιυπερλιπιδικές ιδιότητες του φυτού σε ορισμένα τερπενοειδή και στα φλαβονοειδή που θα μπορούσαν να αναστείλουν την υπεροξειδωση λιπιδίων. Η παρουσία φλαβονοειδών και clerodane διτερπενίων μπορεί να εξηγούν την κυτοτοξικότητα που παρουσιάζουν (Nematollahi-Mahan et al. 2007).

Οι Zal et al. (2001) αναφέρουν επίσης ότι μελέτησαν τη δράση δειγμάτων από διαφορετικές περιοχές και δεν έδειξαν όλα υπογλυκαιμική δραστηριότητα. Αυτό το συσχετίζουν με τη διαφορετικότητα των εδαφών. Είναι ένα ακόμα σημείο που δείχνει το χημικό πολυμορφισμό του *T. polium*.

1.1.3 Αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των διάφορων εκχυλισμάτων του έχουν μελετηθεί από αρκετούς ερευνητές και έχουν δώσει αξιόλογα αποτελέσματα.

Σε μελέτη που έγινε για την αντιοξειδωτική ικανότητα 21 αρωματικών φυτών της οικογένειας Lamiaceae, με τη μέθοδο του Umezawa, βρήκαν την αντιοξειδωτική δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος του *T. polium*, συγκρίσιμη με αυτήν της τοκοφερόλης (Couladis et al. 2003).

Το μεθανολικό εκχύλισμα του *T. polium* καθώς και τα φλαβονοειδή ρουτίνη και απιγενίνη που απομονώθηκαν από αυτό, βρέθηκαν να είναι τα πιο δραστικά ως παρεμποδιστές ελεύθερων ριζών με τη μέθοδο διφαινυλοπικρυλυδραζυλίου (DPHH). Επίσης, παρουσίασαν την περισσότερο ανασταλτική δράση στην οξείδωση των β-καροτένιου και λινολεϊκού οξέος στη ATC μέθοδο. Τα μέθοξυ-φλαβονοειδή έδειξαν μικρότερη αντιοξειδωτική δράση (Sharififar et al. 2009).

Το υδατικό εκχύλισμα του *T. polium* L παρουσιάζει αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση in vitro (Ljubuncic et al 2006).

Από τα αποτελέσματα των Proestos et al. (2004), και Sharififar et al. (2008) φαίνεται ότι τα φαινολικά και φλαβονοειδή που περιέχονται στο *T. polium* είναι πολύ σημαντικά ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες.

1.2 Η σύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών και η σχέση τους με την αντιμετώπιση των βιοτικών παραγόντων καταπόνησης.

Στα φυσικά ενδιαιτήματα, τα φυτά περιβάλλονται από ένα πλήθος εν δυνάμει εχθρών. Σχεδόν όλα τα οικοσυστήματα περιέχουν μια μεγάλη ποικιλία σε βακτήρια, ιούς, μύκητες, νηματώδεις, ακάρεα, έντομα, θηλαστικά και άλλα φυτοφάγα ζώα. Εξαιτίας της φύσης τους, τα φυτά δεν μπορούν να αποφύγουν αυτά τα φυτοφάγα ζώα και τους παθογόνους οργανισμούς απλά απομακρυνόμενα. Έτσι, τα φυτά αναγκάστηκαν μέσω της εξέλιξης να εφοδιαστούν εκτός από την κατάλληλη δομή, και με ένα τεράστιο βιοχημικό οπλοστάσιο δευτερογενών μεταβολιτών οι οποίοι θωρακίζουν τα φυτικά κύτταρα. (Καραμπουρνιώτης 2003, Τσέκος 2003)

Οι φυτικοί οργανισμοί παράγουν ένα μεγάλο αριθμό οργανικών μορίων (ο αριθμός τους πιθανό να ξεπερνά τις 100.000), η σύνθεση των οποίων δεν φαίνεται να σχετίζεται ευθέως με τις ανάγκες της αύξησης και της ανάπτυξης. Τα οργανικά αυτά μόρια αρχικά θεωρήθηκαν ως προϊόντα μεταβολικής δραστηριότητας η οποία δε σχετίζεται με ζωτικής σημασίας φυσιολογικές λειτουργίες και ως εκ τούτου θα μπορούσε να θεωρηθεί δευτερεύουσας σημασίας δραστηριότητα. Γι αυτό το λόγο οι ενώσεις αυτές ονομάστηκαν δευτερογενείς μεταβολίτες ή προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού. (Καραμπουρνιώτης 2003, Τσέκος 2003, Wittstock and Gershenzon 2002)

Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις μέλη των δευτερογενών μεταβολιτών, και κυρίως μέλη της ομάδας των τερπενοειδών, έχουν σημαντικούς πρωτογενείς ρόλους, όπως κάποια λειτουργία στην φυτική αύξηση ή ανάπτυξη. Παραδείγματος χάρη οι στερόλες είναι τριτερπενικά παράγωγα και αλληλεπιδρούν με τα φωσφολιπίδια σταθεροποιώντας τις κυτταρικές μεμβράνες και ελαττώνοντας τη διαπερατότητα της μεμβράνης στα μικρά μόρια. Τα κόκκινα, κίτρινα και πορτοκαλόχρωα καροτινοειδή είναι τετρατερπένια και λειτουργούν ως βοηθητικές χρωστικές στη φωτοσύνθεση ενώ προστατεύουν τους φωτοσυνθετικούς ιστούς από τη φωτοοξείδωση. Κάποιες φυτορμόνες όπως το αμπισικό οξύ και οι γιββερελίνες είναι τερπένια. Επίσης, πλευρικές αλυσίδες όπως αυτή της φυτόλης της χλωροφύλλης, βοηθούν στο να αγκυροβολήσουν ορισμένα μόρια στις μεμβράνες. Ωστόσο τα περισσότερα μέλη της ομάδας των τερπενίων είναι δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι πιθανόν να συμμετέχουν στην άμυνα και αρκετά από αυτά παρουσιάζουν τοξική δράση έναντι φυτοφάγων και παθογόνων. (Καραμπουρνιώτης 2003, Τσέκος 2003)

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν μια περιορισμένη κατανομή στο φυτικό βασίλειο. Πολυάριθμα παρακλάδια του δευτερογενούς μεταβολισμού λειτουργούν αποκλειστικά ή ενισχύονται μόνο σε ορισμένες οικογένειες φυτών. Αυτό σημαίνει ότι ορισμένοι τουλάχιστον δευτερογενείς μεταβολίτες συντίθενται από ένα και μόνο φυτικό είδος ή από μια ομάδα φυτικών ειδών τα οποία συνδέονται ταξινομικά μεταξύ τους. Επομένως, η ποιοτική σύσταση από πλευράς δευτερογενών μεταβολιτών (φυτοχημικά πρότυπα), σε συνδυασμό με τις μορφολογικές ή ανατομικές ιδιαιτερότητες, προσδιορίζουν πληρέστερα τη φυσιογνωμία του κάθε φυτικού είδους, ή ακόμη και ποικιλίας. Γι' αυτό το λόγο τα φυτοχημικά πρότυπα αποτελούν ένα πρόσθετο και αναγκαίο ταξινομικό κριτήριο.

1.2.1.1 Οι κύριες ομάδες των Δευτερογενών μεταβολιτών

Με βάση τη βιοσυνθετική οδό μέσω της οποίας παράγονται και τα χαρακτηριστικά του μορίου, οι δευτερογενείς μεταβολίτες κατατάσσονται συνήθως σε τρεις μεγάλες ομάδες:

1. Η ομάδα των φαινολικών ουσιών περιλαμβάνει μεταβολίτες οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός τουλάχιστον αρωματικού δακτυλίου στο μόριό τους και συντίθενται κυρίως μέσω των βιοσυνθετικών οδών του σικιμικού ή/και του μηλονικού οξέος.

2. Τα τερπένια είναι λιπίδια που συντίθεται από το ακέτυλο-συνένζυμο Α μέσω της βιοσυνθετικής οδού του μεβαλονικού, που πραγματοποιείται κυρίως στο κυτόπλασμα και από βασικές ενδιάμεσες ενώσεις της γλυκόλυσης μέσω της βιοσυνθετικής οδού του πυροσταφυλικού-φωσφογλυκεριναλδεϋδης που πραγματοποιείται κυρίως στα πλαστίδια.

3. Η ομάδα των αζωτούχων δευτερογενών μεταβολιτών περιλαμβάνει ενώσεις οι οποίες προέρχονται κυρίως από αμινοξέα.

Λόγω της έλλειψης αζώτου τα μεσογειακά φυτά συνήθως συνθέτουν αμυντικούς δευτερογενείς μεταβολίτες που η κατασκευή τους στηρίζεται σε σκελετούς άνθρακα (τερπένια, φαινολικά) ενώ οι αζωτούχοι μεταβολίτες σπανίζουν. (Καραμπουρνιώτης 2003, Τσέκος 2003)

1.2.1.2 Φαινολικές ενώσεις

Το όνομά τους το οφείλουν στο απλούστερο μόριο της σειράς, τη φαινόλη. Οι περισσότερες ενώσεις συνθέτονται μέσω της βιοσυνθετικής οδού του σικιμικού οξέος. Η διαδρομή του σικιμικού μετατρέπει υδατάνθρακες που προέρχονται από τη γλυκόλυση (φωσφοενολπυροσταφυλικό οξύ) και τον κύκλο της φωσφορικής πεντόζης (4-

φωσφοροερυθρόζη) σε αρωματικά αμινοξέα. Το μονοπάτι του σικιμικού οξέως παίρνει το όνομά του από ένα ενδιάμεσο μόριο το σικιμικό οξύ και υπάρχει σε φυτά και μικροοργανισμούς αλλά όχι στα ζώα (Weaver and Herrmann 1997). Η βιοσύνθεση των αρχικών απλών φαινολικών ενώσεων πραγματοποιείται μέσω της απαμίνωσης ενός αρωματικού αμινοξέως, της φαινυλαλανίνης, προϊόντος της οδού του σικιμικού οξέως, προς την δημιουργία του κινναμικού οξέως. Η αντίδραση καταλύεται από την αμμωνιο-λυάση της φαινυλαλανίνης (phenylalanine ammonia lyase, PAL) ένζυμο κλειδί του μεταβολισμού των φαινολικών και το πιο καλά μελετημένο ένζυμο του μονοπατιού ίσως και όλου του δευτερογενούς μεταβολισμού (Καραμπουρνιώτης 2003, Buchanan et al. 2000).

Τα **απλά φαινολικά** συστατικά είναι διαδεδομένα σε όλα τα αγγειόσπερμα και λειτουργούν με διάφορες ιδιότητες. Οι δομές τους περιλαμβάνουν: 1. Τα απλά φαινυλοπροπανοειδή όπως κινναμικό οξύ ή p-κουμαρικό οξύ και τα παράγωγά τους. 2. Φαινυλοπροπανοειδείς λακτόνες που ονομάζονται κουμαρίνες και 3. Τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέως (σχηματίζεται με απομάκρυνση 2 ατόμων άνθρακα από την πλευρική ομάδα). (Τσέκος 2003)

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η φωτοτοξικότητα που παρουσιάζουν ορισμένες κουμαρίνες οι φουρανοκουμαρίνες οι οποίες εμφανίζουν ισχυρή τοξικότητα εάν ενεργοποιηθούν από ακτινοβολία UV-A στην περιοχή (320-400nm). Τα ενεργοποιημένα μόρια έχουν την ικανότητα να προσδένονται στις βάσεις πυριμιδίνης του DNA και να παρεμποδίζουν την μεταγραφή οδηγώντας ενδεχομένως στο θάνατο των κυττάρων. (Καραμπουρνιώτης 2003)

Μια μεγάλη και σημαντική κατηγορία φαινολικών ουσιών είναι τα **φλαβονοειδή**. Διάφοροι τύποι φλαβονοειδών πραγματοποιούν πολύ διαφορετικές λειτουργίες όπως της εμφάνισης χρωστικών, της άμυνας και της προστασίας από την υπεριώδη ακτινοβολία. Ο βασικός ανθρακικός σκελετός ενός φλαβονοειδούς αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτύλιους που συνδέονται από μία γέφυρα τριών ατόμων άνθρακα. Η πρόδρομη ένωση των φλαβονοειδών προέρχεται από τη σύντηξη μιας φαινυλοπροπανοειδής μονάδας (ο αρωματικός δακτύλιος με τη γέφυρα προέρχονται από τη φαινυλαλανίνη, προϊόν της διαδρομής του σικιμικού οξέως), και του δεύτερου αρωματικού δακτυλίου (τα 6 άτομα του οποίου προέρχονται από τη συμπύκνωση 3 μονάδων οξικού οξέως στη διαδρομή του μελλονικού οξέως). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από τη συνθάση της χαλκόνης. Η συνθάση της χαλκόνης όπως η PAL είναι σημαντικά ρυθμιστικά ένζυμα στο δευτερογενή φυτικό μεταβολισμό. Θεωρούνται ως σημαντικό εξελικτικό βήμα εποικισμού ξηράς σε συνδυασμό με τη μηχανική υποστήριξη του κυτταρικού τοιχώματος (άλλα φαινολικά) καθώς και την προσαρμογή του κυτταρικού τοιχώματος, σε αέριο περιβάλλον).

Τα φλαβονοειδή ταξινομούνται σε διάφορες ομάδες που βασίζονται κυρίως στο βαθμό οξειδωσης της γέφυρας με τα τρία άτομα άνθρακα. Τέσσερις πολύ βασικές ομάδες είναι οι

φλαβονόλες, οι ισοφλαβόνες, οι φλαβόνες και οι φλαβανόλες. Η πλειονότητα των φλαβονοειδών στη φύση απαντάται με τη μορφή γλυκοζιτών. (Rice-Evans 1997)

Οι ανθοκυανίνες στα φυτά είναι υπό μορφή γλυκοζιτών, κυρίως στη θέση 3, των οποίων τα άγλυκα τμήματα είναι γνωστά ως ανθοκυανιδίνες και προκύπτουν από όξινη υδρόλυση των πρώτων. Είναι η πιο εξαπλωμένη ομάδα χρωματισμένων φλαβονοειδών. Ευθύνονται για τα περισσότερα χρώματα του ερυθρού και του κυανού στα φυτικά μέρη.

Δύο άλλες κύριες ομάδες είναι οι φλαβόνες και οι φλαβανόλες. Αυτά τα φλαβονοειδή απορροφούν στην περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας και όχι στην περιοχή της ορατούς και παρόντα σε άνθη δημιουργούν σχηματισμούς που απευθύνονται σε έντομα που «βλέπουν» στην υπεριώδη ακτινοβολία για να τα προσελκύσουν. Αυτές οι δύο χρωστικές απαντώνται και στα φύλλα όλων των πράσινων φυτών. Συσσωρεύονται στα επιδερμικά κύτταρα και απορροφούν ισχυρά φως στην UV-B (280-320nm) υπεριώδη ακτινοβολία επιτρέποντας στην ορατή να διέλθει. Έτσι, ο επιδερμικός ιστός συμπεριφέρεται σαν εξειδικευμένο διαφανές φίλτρο που συγκρατεί επιλεκτικά τη UV ακτινοβολία και προστατεύει τα κύτταρα.

Ακόμα, διαπιστώθηκε ότι έχουν κάποιο ρόλο στη συμβίωση και την άμυνα. Τα ισοφλαβονοειδή απαντώνται κυρίως στα χέδρωπα και έχουν διάφορους ρόλους όπως, στην αλληλεπίδραση τους με τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια δρουν ως φυτοαλεξίνες ενώ τα ροτενοειδή έχουν ισχυρή εντομοκτόνο δράση, ενώ άλλα έχουν φυτοοιστρογόνο δράση και προκαλούν στειρότητα στα θηλαστικά.

Οι **ταννίνες** αποτελούν μια δεύτερη κατηγορία φαινολικών ουσιών με αμυντικό χαρακτήρα. Οι ταννίνες είναι πολυμερή δομικών μονάδων φαινολικών ουσιών και έχουν την ιδιότητα να αντιδρούν και να κατακρημνίζουν πρωτεΐνες. Οι συμπυκνούμενες ταννίνες προκύπτουν από πολυμερισμό των μονάδων των φλαβονοειδών και είναι συστατικά των ξυλωδών συστατικών. Οι υδρολύμενες ταννίνες είναι ετερογενή πολυμερή που περιέχουν φαινολικά οξέα, ιδιαίτερα γαλλικό οξύ και απλά σάκχαρα. Αυτά είναι μικρότερα μόρια και υδρολύονται πιο εύκολα.

Οι ταννίνες είναι γενικές τοξίνες και ελαττώνουν την αύξηση και επιβίωση των φυτοφάγων που τις καταναλώνουν. Επιπλέον, δρουν απωθητικά της βόσκησης αφού προκαλούν μια έντονη στυπτική αίσθηση στο στόμα επειδή δεσμεύονται από τις σιελοπρωτεΐνες. Η δράση τους αυτή σχετίζεται με την ιδιότητά τους να αντιδρούν και να κατακρημνίζουν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλικών τους ομάδων και ηλεκτρωνητικών περιοχών του πρωτεϊνικού μορίου, είτε σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες (σε σημεία όπου υπάρχουν αμινομάδες ή σουλφυδρυλομάδες), αφού προηγουμένως οξειδωθούν προς κινόνες παρουσία φαινολοξειδασών. Εκτός αυτού, δρουν ως παράγοντες οι οποίοι ευνοούν το σχηματισμό ελεύθερων μορφών οξυγόνου. Σε περίπτωση τραυματισμού του φυτικού ιστού, οι ταννίνες

των χυμοτοπίων έρχονται σε επαφή με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του ιστού και τις καθιστούν δύσπεπτες, κι επιπλέον, κατακρημνίζουν τα πεπτικά ένζυμα του καταναλωτή. Τα άγουρα φρούτα πολύ συχνά έχουν υψηλά επίπεδα ταννίνης που συγκεντρώνονται στα εξωτερικά κυτταρικά στρώματα. (Τσέκος 2003, Καραμπουρνιώτης 2003)

Η **λιγνίνη**, είναι ένα υψηλώς διακλαδισμένο πολυμερές των ομάδων του φαινυλοπροπανοειδούς που παίζει πρωτογενή και δευτερογενή ρόλο. Η εναπόθεση της λιγνίνης, στα κυτταρικά τοιχώματα, κυρίως κατά τη δευτερογενή πάχυνση, τα καθιστά ανθεκτικά στις μηχανικές καταπονήσεις και στην διείσδυση παθογόνων, ενώ τα αδιαβροχοποιεί μειώνοντας τις απώλειες νερού. Παράλληλα με την εξασφάλιση μηχανικής στήριξης, η λιγνίνη έχει σημαντικές προστατευτικές λειτουργίες στα φυτά. Η φυσική της σκληρότητα εμποδίζει τη βορά από τα ζώα και η χημική της σταθερότητα την καθιστά σχετικώς άπεπτη από τα φυτοφάγα ζώα. Είναι η πιο άφθονη οργανική ουσία στα φυτά μετά την κυτταρίνη. Η ακριβής χημική δομή της λιγνίνης, δεν είναι γνωστή, γιατί είναι πολύ δύσκολο να εκχυλισθεί από τα φυτά, όπου αυτή είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη στην κυτταρίνη και άλλους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος.

Η λιγνίνη γενικά σχηματίζεται από τρεις διαφορετικές φαινυλοπροπανοειδείς αλκοόλες: την κωνιφερόλη, την κουμαρόλη και την σιναπυλική αλκοόλη, οι οποίες συντίθενται από τη φαινυλαλανίνη διαμέσου διαφόρων παραγώγων του κινναμωμικού οξέος. Οι φαινυλοπροπανοειδείς αλκοόλες συνενώνονται σε ένα πολυμερές διαμέσου της δράσεως ενζύμων που παράγουν ελεύθερες-ρίζες ενδιάμεσων ενώσεων. Υπάρχουν συχνά πολλαπλοί δεσμοί C-C και C-O-C σε κάθε μονάδα προπανοειδούς αλκοόλης στη λιγνίνη, που οδηγούν στο σχηματισμό μιας σύμπλοκης δομής, η οποία διακλαδίζεται σε τρεις διαστάσεις. Γι αυτό το λόγο, οι μονάδες της λιγνίνης δε συνδέονται κατά έναν απλό, επαναλαμβανόμενο τρόπο. Στην πολυπλοκότητα προστίθεται το γεγονός ότι οι αναλογίες των τριών μονάδων των μονομερών στη λιγνίνη ποικίλλουν ανάμεσα στα φυτικά είδη, τα φυτικά όργανα και ακόμα στα στρώματα ενός μεμονωμένου κυτταρικού τοιχώματος.

Η λιγνίνη απαντάται στα κυτταρικά τοιχώματα διαφόρων τύπων στηρικτικού και αγωγού ιστού, και συγκεκριμένα στις τραχεΐδες και τα αγγειώδη στοιχεία του ξυλώματος. Αυτή αποτίθεται κυρίως στα παχεία δευτερογενή τοιχώματα, αλλά δύναται να εμφανισθεί επίσης στο πρωτογενές τοίχωμα και τη μέση πλάκα σε στενή επαφή με τις κυτταρίνες και ημικυτταρίνες που ήδη είναι παρούσες. Η μηχανική δυσκαμψία των ενισχυμένων με λιγνίνη κορμών και αγωγού ιστού επιτρέπει από τη μια μεριά την προς τα άνω αύξηση και από την άλλη μεριά τη μεταφορά του νερού και των ανόργανων αλάτων διαμέσου του ξυλώματος κάτω από αρνητική πίεση χωρίς την κατάρρευση των ιστών. Επειδή η λιγνίνη είναι ένα τέτοιο συστατικό-κλειδί του ιστού που μεταφέρει το νερό, η ικανότητα να κατασκευάζεται λιγνίνη θα πρέπει να είναι μία από τις πιο σημαντικές προσαρμογές που επέστρεψαν στα αρχέγονα φυτά να εποίκισουν την ξερή στεριά. (Τσέκος 2003, Καραμπουρνιώτης 2003)

1.2.1.3 Τερπένια

Πρόκειται για μία κατηγορία λιπιδίων των οποίων ο βασικός σκελετός είναι ένα μόριο υδρογονάνθρακα με πέντε άτομα άνθρακα. Με διαφορετικές επαναλαμβανόμενες συνενώσεις μονάδων ισοπεντανίου (κεφαλή με ουρά, κεφαλή με κεφαλή, κεφαλή με μέσον) δημιουργούνται πολυπλοκότερα μόρια, διαφορετικά μεταξύ τους. Η θερμική διάσπαση πολλών τερπενοειδών παράγει ένα αλκένιο, το ισοπρένιο το οποίο κάτω από κατάλληλες συνθήκες μπορεί να πολυμεριστεί και να προκύψουν τερπενοειδείς ενώσεις. Γι' αυτό το λόγο ονομάζονται και ισοπρενοειδή, παρόλο που το ισοπρένιο από μόνο του δεν είναι το πρόδρομο μόριο αυτής της ομάδας των μεταβολιτών (Καραμπουρνιώτης 2003, Buchanan et al. 2000).

Τα τερπένια βιοσυντίθενται από πρωτογενείς μεταβολίτες σε τουλάχιστον δύο διαφορετικές μεταβολικές οδούς. Τη βιοσυνθετική οδό του μεβαλονικού, που μέσω σταδιακής συμπύκνωσης τριών μορίων ακετυλο-συνενζύμου Α οδηγεί στη σύνθεση του μεβαλονικού οξέος. Πραγματοποιείται κυρίως στο κυτόπλασμα. Μέσω της οδού αυτής παράγονται τα σεσκιτερπένια, τα τριτερπένια και τα πολυτερπένια (Dubey et al. 2003, Lichtenthaler 1999). Η δεύτερη βιοσυνθετική οδός, είναι η οδός του μη μεβαλονικού ή το μονοπάτι της 1-δεοξυ-D-φωσφοροξυλουλόζης, με πρόδρομα μόρια το πυροσταφυλικό οξύ και την φωσφορογλυκεριναλδεΐδη. Το μονοπάτι αυτό, πραγματοποιείται κυρίως αν όχι αποκλειστικά στα πλαστίδια και μέσω αυτού παράγονται τα ημιτερπένια, τα μονοτερπένια, τα διτερπένια, και τα τετρατερπένια (Dubey et al. 2003, Lichtenthaler 1999). Τα τελικά προϊόντα των οδών αυτών είναι το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) και το ισομερές του, το πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP), όπου συνδυασμένα παράγουν τα διάφορα μόρια των τερπενίων (Καραμπουρνιώτης 2003, Buchanan et al. 2000, Taiz & Zeiger 2002). Το ισοπεντενύλιο είναι ο ενεργοποιημένος C5 οικοδομικός λίθος των τερπενίων.

Ο διαχωρισμός των δύο αυτών μονοπατιών μέσω διαμερισματοποίησης δεν είναι απόλυτος γιατί τουλάχιστον ένας μεταβολίτης μπορεί να ανταλλαχτεί μεταξύ των διαμερισμάτων, χωρίς να έχει βρεθεί ακόμη η φύση του μεταβολίτη και η ρύθμιση της διαδικασίας (Dubey et al. 2003, Eisenreich et al. 2001, Lichtenthaler 1999). Πρώτα, τα IPP και DMAPP αντιδρούν και δημιουργείται το πυροφωσφορικό γερανύλιο (GPP), το οποίο θα δώσει τα μονοτερπένια. Στη συνέχεια το GPP μπορεί να ενωθεί με άλλο ένα μόριο IPP δίνοντας το πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο (FPP), το οποίο θα δώσει τα σεσκιτερπένια. Η προσθήκη άλλου ενός μορίου IPP δίνει το πυροφωσφορικό γερανυλγερανύλιο (GGPP), από το οποίο θα προκύψουν τα διτερπένια. Τα FPP και GGPP μπορούν να διμεριστούν για να δώσουν τα τριτερπένια και τα διτερπένια αντίστοιχα (Taiz and Zeiger 2002). Με κάποιες τροποποιήσεις (οξειδώσεις, ισομεριώσεις, συμπυκνώσεις) δημιουργείται η πληθώρα των διαφορετικών τερπενοειδών (Buchanan et al. 2000).

Το μη μεβαλονικό μονοπάτι υπάρχει στα φυτά, στα πράσινα φύκη, στα ευβακτήρια και στα κυανοβακτήρια. Η ανακάλυψη του καινούργιου αυτού μονοπατιού παραγωγής του IPP στα πλαστίδια, καταδεικνύει ότι αυτά τα οργανίδια, που θεωρούνται ότι έχουν προέλθει ως προκαρυωτικοί ενδοσυμβιώτες, έχουν διατηρήσει τον βακτηριακό μηχανισμό για την παραγωγή αυτού του ενδιάμεσου της παραγωγής των τερπενοειδών (Eisenreich et al. 2001, Lichtenthaler 1999).

Φυσικά προϊόντα τα οποία προέρχονται μερικώς από το βιοσυνθετικό μονοπάτι των τερπενοειδών ονομάζονται μεροτερπένια, όπως είναι κάποια φαινολικά συστατικά και κάποια αλκαλοειδή (Buchanan et al. 2000, Taiz and Zeiger 2002).

Ένας μεγάλος αριθμός **μονοτερπενίων** και παραγώγων τους αποτελούν τοξικούς παράγοντες για τα έντομα. Τα πυρεθροειδή, εστέρες των μονοτερπενίων, αποτελούν αποτελεσματικά εντομοκτόνα. Ανάμεσα σε πολλά σεσκιτερπένια γνωστοί αντιφάγοι παράγοντες είναι οι σεσκιτερπενικές λακτόνες. Είναι κυκλικοί εστέρες που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός δακτυλίου λακτόνης στο μόριό τους. Αποτελούν ισχυρά απωθητικά μόρια για τα φυτοφάγα έντομα και όπως άλλα ανασχετικά στη διατροφή των θηλαστικών ζώων, έχουν πικρή, δυσάρεστη γεύση στον άνθρωπο.

Πολλά **διτερπένια** αποδείχτηκε ότι είναι τοξίνες και ανασχετικά της βοράς στο φυτοφάγα ζώα. Οι φυσικές ρητίνες συχνά περιέχουν σημαντικές ποσότητες διτερπενίων όπως το αμπετικό οξύ. Επιπλέον, μετά από προσβολή ή τραυματισμό η εκροή της ρητίνης μπλοκάρει φυσικώς τη βόσκηση και η έκθεση της στον αέρα πολυμερίζεται φράσσοντας ερμητικά το τραύμα. Ακόμα, διτερπενικά παράγωγα μπορεί να δρουν ερεθιστικά για το δέρμα ή να είναι εσωτερικές τοξίνες στα θηλαστικά. Τέτοιοι είναι οι διτερπενικοί φορβολεστέρες της οικογένειας Euphorbiaceae.

1.2.1.4 Συνεργισμός των ουσιών και τοξικότητά των δευτερογενών μεταβολιτών για το ίδιο το φυτό

Τα φυτά δεν είναι μόνο ικανά να συνθέτουν ξεχωριστούς αμυντικούς μεταβολίτες με ποικίλες χημικές δομές αλλά επίσης και να παράγουν πολύπλοκα μίγματα αμυντικών ουσιών, όπως τα τερπένια των αιθέριων ελαίων. Πολλά από τα συστατικά των αιθέριων ελαίων είναι από μόνα τους τοξικά για τα έντομα και τα παθογόνα. Παρόλα αυτά, η τοξικότητα αυτών των συστατικών μπορεί να αυξηθεί σε μίγματα, έτσι ώστε η συνολική τοξικότητα να ξεπερνά την προσθετική τοξικότητα των συστατικών από το οποίο αποτελείται. Αυτό το φαινόμενο είναι γνωστό ως συνεργισμός και έχει πρόσφατα εξηγηθεί για μίγματα που το καθένα περιείχε δύο συστατικά αιθέριου ελαίου. Το μίγμα δόθηκε ως τροφή στο λεπιδόπτερο *Spodoptera litura* (Hummelbrunner & Isman 2001). Αυτά τα μίγματα ήταν έως 9 φορές πιο

τοξικά απ' ότι θα αναμενόταν από την πρόσθεση των δράσεων κάθε συστατικού ξεχωριστά. Ο μηχανισμός με τον οποίο δρα ο συνεργισμός δεν έχει ακόμα αποκαλυφθεί, μπορεί όμως στο φαινόμενο να επιδρά η ικανότητα ενός συστατικού του μίγματος να αναστέλλει την αποτοξίνωση άλλων συστατικών (Berenbaum 1985).

Κατά κανόνα οι αμυντικές ουσίες παρουσιάζουν τοξικότητα όχι μόνο έναντι των εχθρικών, αλλά και έναντι των φίλων κυττάρων. Οι φυτικοί ιστοί διαθέτουν μηχανισμούς προστασίας έναντι των τοξικών αμυντικών μεταβολιτών που οι ίδιοι παράγουν. Στην απλούστερη περίπτωση η αδρανοποίησή τους επιτελείται με τον περιορισμό τους σε κατάλληλους απομονωμένους χώρους (χυμοτόπιο, αδένες). Μία στρατηγική είναι να αποθηκεύουν αυτές τις τοξίνες σαν πρόδρομες ουσίες, μη τοξικές. Τα υδατοδιαλυτά προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού, όπως τα φαινολικά συσσωρεύονται με ασφάλεια στο χυμοτόπιο (οι υδρόφοβες γλυκοζυλιώνονται πρώτα) (έμμεση αδρανοποίηση). Ορισμένες εξαιρετικά τοξικές ουσίες αποθηκεύονται με τη μορφή αδρανών πρόδρομων σε ξεχωριστά υποκυτταρικά οργανίδια ή κύτταρα από τα ένζυμα που τα ενεργοποιούν. Λιπόφιλα δευτερογενή παράγωγα όπως τερπένια και μη πολικές φαινολικές ουσίες συσσωρεύονται στην εφυμενίδα στις αδενώδεις τρίχες και αγωγούς. Σε άλλες περιπτώσεις ο μεταβολισμός εμφανίζεται τροποποιημένος, ώστε να αναγνωρίζει τους μηχανισμούς άμυνας (π.χ. τα μη πρωτεϊνικά αμινοξέα). Έτσι τα φυτά που βασίζονται στην δομική τους άμυνα, πρέπει απαραίτητα, αφού συνθέσουν τις τοξίνες, να μπορούν να τις αποθηκεύσουν χωρίς να δηλητηριάσουν τον εαυτό τους (Καραμπουρνιώτης 2003, Wittstock and Gershenzon 2002).

1.2.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν ανιχνευτεί στο *Teucrium polium*.

Διτερπένια

Το γένος *Teucrium* είναι πλούσιο σε διτερπένια (Hanson, 1995). Στα εναέρια τμήματα του φυτού *T. polium* L. subsp. *capitatum*, έχουν ανιχνευθεί πολλά “clerodane” διτερπένια (Fernandez et al. 1985, Marquez et al. 1980, Popa et al. 1977, Galstyan et al. 1992, Bedir et al. 1999, Camps et al. 1986).

Φαινολικά

Τα φαινολικά συστατικά του *T. polium* έχουν διερευνηθεί με διάφορες μεθόδους όπως HPLC/UV-Vis, GC-MS ανάλυση κατόπιν σιλιανοποίησης. Ορισμένες από τις φαινολικές ενώσεις που διαπιστώθηκαν στα διάφορα εκχύλίσματα του *T. polium* είναι: καφεϊκό οξύ, φερρουλικό οξύ, γαλλικό οξύ, ο-υδροξυβενζοϊκό οξύ, p- υδροξυβενζοϊκό οξύ, βανιλλικό οξύ, υδροξυτυροσώλη και τυροσώλη. (Proestos et al. 2006, Proestos & Komaitis 2008).

Έχουν απομονωθεί γλυκοζυλιωμένα φαινυλοπροπανοειδή (Oganessian et al. 1992) και γλυκοζυλιωμένα φαινυλοαιθανοειδή (Bedir & Calis 1997, όπως αναφέρεται από τους Bedir et al. 1999), και ιριδοειδή (Rizk et al. 1986).

Φλαβονοειδή

Σε εργασία των Verykokidou-Vitsaropoulou & Vajias (1986), που μελετήθηκαν τα φαινολικά συστατικά των φύλλων του *T. polium*, απομονώθηκαν μεθυλιωμένες άγλυκες φλαβόνες όπως κισιμαριτίνη, κισιλιόλη και απιγενίνη. Έχουν απομονωθεί από το *T. polium* φλαβονοειδή όπως λουτεολίνη, κερκετίνη και σαλβιγενίνη (Proestos & Komaitis 2007, Rizk et al. 1986). Οι Sharififar et al. (2009), απομόνωσαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού φλαβονοειδή όπως ρουτίνη, απιγενίνη, 3',6'-διμέθοξυ απιγενίνη και 4',7' διμέθοξυ απιγενίνη. Οι ερευνητές σημειώνουν ότι τα μεθοξυ- φλαβονοειδή επιδεικνύουν μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα ρουτίνη, απιγενίνη και το μεθανολικό εκχύλισμα.

1.2.3 Φυσικά προϊόντα ως πηγή νέων φαρμάκων

Διάφορα φυσικά προϊόντα έχουν διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην θεραπεία και την πρόληψη των ασθενειών του ανθρώπου. Περισσότερο από το 60% και 75% των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων για τον καρκίνο και λοιμωδών νόσων, αντίστοιχα, είναι φυσικής προέλευσης. Αυτό σχετίζεται εν μέρει με τους δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών όπως είναι τα τερπένια και οι φαινολικές ενώσεις. Τα τερπένια είναι η μεγαλύτερη

κατηγορία φυσικών προϊόντων με περισσότερες από 23.000 γνωστές ενώσεις. Στην ομάδα αυτή ανήκουν πολλές ενώσεις που χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία, ως βελτιωτικά γεύσης, στην αρωματοποιία και τα καλλυντικά προϊόντα, ως μπαχαρικά, και πρόσθετα τροφίμων. Πολλά τερπένια έχουν βιολογικές δράσεις και χρησιμοποιούνται ήδη για ιατρικούς σκοπούς ενώ προβλέπεται ότι θα διαδραματίζουν ολοένα και σημαντικότερο ρόλο ως θεραπευτικοί και προληπτικοί παράγοντες για ανθρώπινες ασθένειες. (Wang 2005)

Είναι γνωστό ότι οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν συστατικά πολλών φυτών και βοτάνων, και έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον, λόγω της θετικής επίδρασης στην υγεία σαν αντιοξειδωτικά. Οι πολυφαινόλες φυτικής προέλευσης έχουν μεγάλο ενδιαφέρον λόγω των αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν, ενώ θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν φυσικά συντηρητικά. Περιλαμβάνουν κυρίως απλές φαινόλες, φαινολικά οξέα, κουμαρίνες, ταννίνες και флаβονοειδή. Αυτές οι ενώσεις συνήθως βρίσκονται με τη μορφή γλυκοζίτη ή εστέρα στα φυτά για να είναι υδατοδιαλυτά. (Rice-Evans et al. 1997).

Τα флаβονοειδή είναι χρωστικές των φυτών, μια ομάδα με πάνω από 4000 μέλη. Είναι πολύ σημαντικά για την κανονική ανάπτυξη και άμυνα των φυτών και πολύ σημαντικά στην διατροφή του ανθρώπου. Το ενδιαφέρον για τα флаβονοειδή έχει αυξηθεί λόγω της σημαντικής αντιοξειδωτικής δράσης που παρουσιάζουν. Υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα φυσικά αντιοξειδωτικά που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στο να μετριάζεται η οξειδωτική βλάβη και να καταστέλλονται οι ελεύθερες ρίζες, οι οποίες σχετίζονται με διάφορες ασθένειες, ακόμα και με την ανάπτυξη καρκίνου. Επίσης τα флаβονοειδή επηρεάζουν την δραστηριότητα των ενζύμων και πολλών κυτταρικών συστημάτων, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να διαθέτουν βιολογικές δράσεις όπως αντιφλεγμονώδεις, αντιοστεπορωτικές, αντιηπατοτοξικές, αντιαλλεργικές, και κατά καρκινικών όγκων. (Di Carlo et al. 1999)

Οι βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων ξεκίνησαν να αναζητούν σε φυσικές πηγές δραστικές ουσίες με αποτέλεσμα τα ξηροφυτικά είδη να αποκτήσουν νέο ενδιαφέρον που βασίζεται κυρίως στη δυναμική τους για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών. Η παραγωγή αυτή θεωρείται ότι είναι κυρίως αντίδραση πολλών φυτικών ειδών στις στρεσογόνες συνθήκες του μεσογειακού κλίματος (Fahn 1988, Christodoulakis et al. 1990, Christodoulakis & Bazos 1990, Christodoulakis & Fasseas 1991).

1.3 Το *Teucrium polium* ανήκει στη φρυγανώδη βλάστηση

Το *T. polium* είναι ένα φρυγανικό είδος (Orshan 1989), καλά προσαρμοσμένο στο μεσογειακό κλίμα και τις συνθήκες στρες που το χαρακτηρίζουν. Ως μεσογειακού τύπου

κλίματα ορίζονται εκείνα που είναι παρόμοια με αυτό που επικρατεί γύρω από τη Μεσόγειο Θάλασσα. Περιοχές με μεσογειακού τύπου κλίματα είναι: η μεσογειακή λεκάνη, η νότια Καλιφόρνια, η νοτιοδυτική Χιλή, η νότια Αφρική και η νοτιοδυτική Αυστραλία. Τα μεσογειακού τύπου οικοσυστήματα αποτελούνται από δύο κύριες φυτικές ομάδες: α) τους ψηλούς αείφυλλους και σκληρόφυλλους θάμνους και β) τους ανοιχτούς χαμηλούς θαμνώνες που αναπτύσσονται στο ζεστό και ξηρό όριο του μεσογειακού κλίματος, τα φρύγανα (Mooney & Parsons 1973, Blumler 2005).

Βασικά κλιματολογικά χαρακτηριστικά του μεσογειακού οικοσυστήματος, αποτελούν η υψηλή καλοκαιρινή ξηρασία και οι ήπιοι, βροχεροί χειμώνες. Κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού της Μεσογείου, η ξηρασία συμπίπτει με την υψηλή ακτινοβολία και τις υψηλές θερμοκρασίες του αέρα. Υπό αυτές τις συνθήκες τα φύλλα είναι τα πιο εκτεθειμένα και κατά συνέπεια τα πιο ευάλωτα φυτικά όργανα. Η υψηλή ακτινοβολία σε συνδυασμό με τη θέρμανση ενισχύει τη φωτοπαρεμπόδιση, περιορίζοντας έτσι την αύξηση και ανάπτυξη σύμφωνα με τους Pereira & Chaves (1995), Valladares & Pearcy (1997) όπως αναφέρεται από τον Blumler (2005). Σημαντικό ρόλο παίζουν και άλλοι παράγοντες όπως η χαμηλή διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών του εδάφους, οι απότομες και συχνά ραγδαίες μεταβολές του καιρού και άλλες διαταραχές όπως οι συχνές πυρκαγιές. Όλοι αυτοί οι παράγοντες και ο συνδυασμός τους επέδρασαν καταλυτικά στην άσκηση εξελικτικής πίεσης.

Τα φρύγανα διαθέτουν επιφανειακό ριζικό σύστημα σε αντιδιαστολή με τη μακκία βλάστηση, η οποία εκμεταλλεύεται βαθύτερα υδατικά αποθέματα (Margaris, 1979). Το πρόβλημα της χαμηλής συγκέντρωσης των θρεπτικών στοιχείων αντιμετωπίζεται με τη δημιουργία πλούσιου ριζικού συστήματος και τη δημιουργία συμβιωτικών σχέσεων με μυκόρριζες (Καραμπουρνιώτης, 2003). Έρευνες έδειξαν ότι τα ξηρομορφικά φυτά ευδοκιμούν σε περιοχές όπου το έδαφος είναι φτωχό σε ανόργανα συστατικά (Metcalf and Chalk 1985).

Τα φρύγανα είναι καλά προσαρμοσμένα στις συνθήκες καταπόνησης που χαρακτηρίζουν το μεσογειακό κλίμα παρουσιάζοντας ορισμένα μορφολογικά-ανατομικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά (Mitrakos, 1980). Θεωρούνται μαζί με τους αειθαλείς σκληρόφυλλους θάμνους, ότι είναι καλά προσαρμοσμένα ξηρόφυτα και επιδεικνύουν ενδιαφέροντα ξηρομορφικά χαρακτηριστικά (Fahn & Cutler, 1992).

Να σημειωθεί σε αυτό το σημείο ότι ο όρος ξηρόφυτα αναφέρεται σε φυτά τα οποία ενδημούν σε ξηρά και θερμά περιβάλλοντα, ενώ ξηρομορφικά είναι φυτά τα οποία από την εμφάνισή τους και τη μορφολογία τους, δίνουν την εντύπωση ότι θα μπορούσαν να διαβιούν σε ξηρά περιβάλλοντα (Metcalf and Chalk 1985). Ορισμένα χαρακτηριστικά προσαρμογής χαρακτηρίζουν τα φύλλα των ξηροφύτων ανεξάρτητα από το φυτικό είδος. Ο Montfort (1918), επινόησε τον όρο ξηρομορφισμό για να περιγράψει αυτά τα χαρακτηριστικά προσαρμογής ως μηχανισμούς οι οποίοι παρατηρούνται στα φυτά που αναπτύσσονται σε

ξηρά περιβάλλοντα για τη μείωση της διαπνοής (όπως αναφέρεται στον Kummerow 1973). Τα ξηρομορφικά αυτά χαρακτηριστικά απαιτούν υψηλό κόστος κατασκευής αλλά είναι απολύτως απαραίτητα για την προσαρμογή τους σε θερμά και ξηρά κλίματα (Καραμπουρνιώτης 2003).

Στρατηγικές αντιμετώπισης καταπόνησεων

Τα φυτά αντιμετωπίζουν τους παράγοντες καταπόνησης (αβιοτικούς ή και βιοτικούς), μέσω κατάλληλων μηχανισμών οι οποίοι τους επιτρέπουν να επιβιώσουν. Ο όρος **καταπόνηση** αναφέρεται στην επίδραση δυσμενών παραγόντων του περιβάλλοντος οι οποίοι τείνουν να παρεμποδίσουν την εύρυθμη λειτουργία φυσιολογικών λειτουργιών. Η προσαρμογή και ο εγκλιματισμός είναι δύο τέτοιοι μηχανισμοί αντιμετώπισης οι οποίοι επιτυγχάνονται με τρεις διαφορετικές στρατηγικές: τη στρατηγική της αποφυγής, της ανθεκτικότητας και της διαφυγής. (Καραμπουρνιώτης 2003). Η ικανότητα του κάθε φυτού να ανταπεξέρχεται έναν συγκεκριμένο παράγοντα καταπόνησης, προϋποθέτει και τις κατάλληλες τροποποιήσεις σε επίπεδο δομών ή και λειτουργιών. Εάν οι τροποποιήσεις καθορίζονται γενετικά και εμφανίζονται μέσω της διαδικασίας της επιλογής για ένα διάστημα αρκετών γενεών, περιγράφονται με τον όρο **προσαρμογή**.

Ο **εγκλιματισμός** αναφέρεται σε επίκτητες τροποποιήσεις μορφολογικών και φυσιολογικών χαρακτηριστικών, οι οποίες συμβαίνουν στην διάρκεια του βιολογικού κύκλου ενός φυτικού οργανισμού, στην προσπάθεια του να αντιμετωπίσει έναν παράγοντα καταπόνησης. Η ικανότητα εγκλιματισμού, είναι γενετικά καθοριζόμενο χαρακτηριστικό· ωστόσο οι επαγόμενες τροποποιήσεις δεν μεταβιβάζονται στην επόμενη γενιά. (Αϊβαλάκης και συν. 2005)

Τα φυτά τα οποία έχουν επιλέξει τη στρατηγική της **διαφυγής**, παρακάμπτουν τον παράγοντα καταπόνησης ολοκληρώνοντας το βιολογικό τους κύκλο εντός της ευνοϊκής περιόδου (κατά την οποία ο παράγοντας καταπόνησης δεν υφίσταται). Τέτοια είναι τα μονοετή ποώδη φυτά που ολοκληρώνουν το βιολογικό τους κύκλο μέσα στην ευνοϊκή περίοδο ενώ κατά τη διάρκεια της καλοκαιρινής περιόδου απαντώνται σε ληθαργική μορφή αναπαραγωγικών μορφών ανθεκτικών στην αφυδάτωση όπως σπέρματα ή υπόγειων αναπαραγωγικών οργάνων (π.χ. γέωφυτα). (Καραμπουρνιώτης & Λιακόπουλος 2009).

Τα φυτά τα οποία επιλέγουν τη στρατηγική της **αποφυγής**, παρουσία του ή των παραγόντων καταπόνησης, διαθέτουν μηχανισμούς οι οποίοι αμβλύνουν τις επιπτώσεις της καταπόνησης. Π.χ. φυτά τα οποία αντιπαρέρχονται την ξηρασία αναπτύσσοντας ριζικό σύστημα, το οποίο εισχωρεί σε μεγάλα βάθη, προσεγγίζοντας τον υδροφόρο ορίζοντα. Τα κύτταρα ωστόσο των φυτών αυτών είναι ευαίσθητα έναντι της αφυδάτωσης.

Τα φυτά τα οποία χαρακτηρίζονται από τη στρατηγική της **ανθεκτικότητας**, διαθέτουν την ικανότητα να αντιμετωπίσουν την βιοτική καταπόνηση στο εσωτερικό πλέον των ιστών

τους, ενεργοποιώντας μια σειρά από αμυντικούς μηχανισμούς. Παρουσία του ή των παραγόντων καταπόνησης τα φυτά διατηρούν υψηλή μεταβολική δραστηριότητα, συγκρίσιμη με εκείνη η οποία παρατηρείται στις βέλτιστες συνθήκες. Θα πρέπει στο σημείο αυτό να τονιστεί ότι τα όρια μεταξύ προϋπάρχουσας και επαγόμενης άμυνας δεν είναι πάντα ευδιάκριτα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι ποικιλοϋδρικοί οργανισμοί, των οποίων τα κύτταρα διατηρούν στοιχειώδη μεταβολική δραστηριότητα, ακόμη και αν το κυτόπλασμα υποστεί μερική αφυδάτωση. Με τη στρατηγική της ανθεκτικότητας, στην περίπτωση της υδατικής καταπόνησης υπάρχει η τάση να γίνει, οσμωτική εξισορρόπηση. Το οσμωτικό δυναμικό των ιστών ρυθμίζεται σε χαμηλότερα επίπεδα μέσω της συσσώρευσης οσμωλυτών ώστε να διευκολύνεται η πρόσληψη νερού και να διατηρείται ανεκτή πίεση σπαργής και έτσι τα στομάτια μπορούν να παραμείνουν εν μέρει ανοιχτά. Συγκεντρώνονται οσμωτικά ενεργές ουσίες όπως ιόντα K^+ και οργανικές ουσίες όπως αμινοξέα (προλίνη), μεταΐνες αμινοξέων, πολυυδροξυαλκοόλες και σάκχαρα. (Καραμπουρνιώτης 2003)

1.3.1 Τα φρύγανα αντιμετωπίζουν τις καταπονήσεις του Μεσογειακού οικοσυστήματος

Τα φρύγανα είναι αναγκασμένα να αντιμετωπίσουν ένα συνδυασμό παραγόντων καταπόνησης όπως υψηλές θερμοκρασίες, έλλειψη νερού, και υψηλή ένταση ακτινοβολίας. Τα φρύγανα αντιμετωπίζουν το πρόβλημα της καλοκαιρινής ξηρασίας, αναπτύσσοντας μορφολογικούς χαρακτήρες, οι οποίοι παρεμβάλλουν ισχυρή αντίσταση στις διαπνευστικές απώλειες νερού (ξηρομορφικά χαρακτηριστικά) και ελαττώνοντας τη διαπνέουσα επιφάνεια. Επίσης, σε ορισμένα είδη όπως στο *Phlomis fruticosa*, τα καλοκαιρινά φύλλα παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε μερική αφυδάτωση του πρωτοπλάστη. Επομένως, τα φρύγανα επιστρατεύουν ένα συνδυασμό μεταξύ της στρατηγικής της αποφυγής και της ανθεκτικότητας. (Καραμπουρνιώτης & Λιακόπουλος 2009)

Κατά τη στρατηγική της αποφυγής της υδατικής καταπόνησης τα φυτά καταφεύγουν σε διάφορες τακτικές εξοικονόμησης νερού με έλεγχο κυρίως των διαπνευστικών απωλειών. Έτσι μπορεί να γίνεται οικονομία νερού με κλείσιμο των στοματίων κατά τις θερμές ώρες της ημέρας ή περιορισμό του αριθμού των στοματίων.

Σε κάποιες άλλες περιπτώσεις παρατηρείται **περιορισμός στο ελάχιστο των επιφανειών** των οργάνων τα οποία έρχονται σε επαφή με την ατμόσφαιρα (εξισορρόπηση φυλλικής επιφάνειας). Μεταβάλλεται ο λόγος υπέργειου προς υπόγειο τμήματος βλαστού του φυτού. Αναπτύσσεται η ρίζα ακόμα και σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης καλύτερα από το βλαστό προς βαθύτερα στρώματα εδάφους. Αποβάλλονται τα γηραιότερα φύλλα.

Περιορίζεται η επιφάνεια των αναπτυσσόμενων φύλλων που έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση των διαπνευστικών απωλειών. (Καραμπουρνιώτης & Λιακόπουλος 2009)

Τα κύτταρα των ξηροφύτων, ειδικά του φύλλου και τα επιδερμικά είναι μικρότερων διαστάσεων συνήθως από των μεσοφύτων / υδροφύτων (Metcalf and Chalk 1985). Σε συνθήκες έλλειψης νερού παρεμποδίζεται η διάταση των κυττάρων, ιδιαίτερα των μεριστωματικών ιστών, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα και τον περιορισμό της φυλλικής επιφάνειας (Καραμπουρνιώτης 2003). Οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (veins) φαίνονται «πιο συμπυκνωμένες» -περισσότερες ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου (Kummerow 1973).

Τα φύλλα μπορεί να παρουσιάζουν μειωμένη εξωτερική επιφάνεια σε σχέση με τον όγκο τους (παχιά και σε μικρές διαστάσεις). Αυτό αυξάνει την ειδική μάζα φύλλου έναντι των φύλλων των ποωδών φυτών. Διαθέτουν μεσόφυλλα με πυκνά διατεταγμένα κύτταρα, και το πασσαλώδες παρέγχυμα υπερτερεί σε παρουσία έναντι του σπογγώδους παρεγχύματος. Τα πασσαλώδη κύτταρα παρουσιάζουν τη μορφή δοκών ή πασσάλων και είναι κάθετα προσανατολισμένα στην επιφάνεια του φύλλου. Διατάσσονται σε μία ή περισσότερες επάλληλες στοιβάδες προς τη προσαξονική πλευρά του φύλλου. Η επιμήκης κατασκευή των κυττάρων του πασσαλώδους παρεγχύματος, σε συνδυασμό με την τοποθέτηση των χλωροπλαστών τους στα αντικλινή τοιχώματα, διευκολύνει τη διείσδυση της ακτινοβολίας στο εσωτερικό του μεσόφυλλου. Έτσι, οι οπτικές ιδιότητες του πασσαλώδους παρεγχύματος συμβάλλουν στη μεταφορά ακτινοβολίας στα κατώτερα κύτταρα του μεσόφυλλου. Από την άλλη το σχήμα των κυττάρων του σπογγώδους παρεγχύματος, ευνοεί την απορρόφηση της ακτινοβολίας, λειτουργώντας σαν ανακλαστήρας που επιστρέφει τα φωτόνια στο εσωτερικό του μεσόφυλλου. Αύξηση του πάχους του φύλλου με την αύξηση των στοιβάδων του πασσαλώδους παρεγχύματος, δε δημιουργεί προβλήματα φωτισμού στα κατώτερα στρώματα και αυτό είναι πολύ σημαντικό για τα ξηρόφυτα, αφού επιτρέπει την αποδοτικότερη φωτοσύνθεση χωρίς μεγάλες απώλειες νερού (Αϊβαλάκης και συν. 2005). Σύμφωνα με τους Fahn και Culter (1992) ίσια και αντικλινή τοιχώματα αντιπροσωπεύουν ένα ξηρομορφικό χαρακτηριστικό ενώ τα κυματιστά ένα μεσομορφικό.

Η συμπαγής κατασκευή και το μεγάλο πάχος των φύλλων, κάποιες φορές δημιουργούν προβλήματα στο φωτισμό των εσωτερικών στρώσεων των κυττάρων του μεσόφυλλου. Ο έλεγχος των διαπνευστικών απωλειών αναπόφευκτα οδηγεί σε μείωση της φωτοσυνθετικής ταχύτητας και επιδεινώνει το θερμικό ισοζύγιο.

Η φωτοπενία αντιμετωπίζεται με μεταφορά φωτισμού με κατάλληλα διατεταγμένους σκληρεγχοματικούς ιστούς όπως σκληρεΐδες που παίζουν το ρόλο οπτικών ινών, ενώ στα φύλλα πολλών φυτών κυρίως ξηροφύτων ο δεσμικός κολεός σχηματίζει προεκτάσεις που συγκροτούνται από κύτταρα παρεγχύματος ή κολεγχύματος ή σκληρεγχύματος οι οποίες εφάπτονται των δύο επιδερμίδων του φύλλου. Οι προεκτάσεις αυτές προμηθεύουν με νερό τα επιδερμικά κύτταρα και μεταφέρουν ηλιακή ακτινοβολία στα κατώτερα στρώματα του

μεσόφυλλου. Παίζουν το ρόλο των διάφανων παραθύρων που μεταφέρουν τον φωτισμό. (Αϊβαλάκης και συν. 2005, Καραμπουρνιώτης 2003).

Ο αφομοιωτικός ιστός στα φύλλα αλλά και το βλαστό συνήθως είναι περισσότερο ανεπτυγμένος στα ξηρόφυτα. Αυτό επιτυγχάνεται με την αύξηση στις στρώσεις του πασσαλώδους παρεγχύματος στα φύλλα, ενώ στον πρωτογενή φλοιό του βλαστού το παρέγχυμα είναι πολύ συχνά μερικώς φωτοσυνθετικό στα ξηρόφυτα (Metcalf and Chalk 1985).

Επίσης, αναπτύσσονται μορφολογικοί χαρακτήρες οι οποίοι προβάλλουν ισχυρή αντίσταση στις διαπνευστικές απώλειες νερού ή συμβάλλουν στην αποφυγή της υπερθέρμανσης του ελάσματος. Αυτοί αποτελούν τα **ξηρομορφικά χαρακτηριστικά**.

Πολλές φορές σχηματίζεται πολύστρωμη άνω επιδερμίδα με χοντρά κυτταρικά τοιχώματα (Kummerow 1973). Τα παχιά κυτταρικά τοιχώματα, κυρίως στα επιδερμικά κύτταρα, είναι συνηθισμένα στα ξηρόφυτα και ερμηνεύεται ως οικολογικής σημασίας και όχι ως ταξινομικής (Metcalf and Chalk 1985).

Η ανάπτυξη σκληρεγχυματικών ιστών όπως είναι οι σκληρεΐδες, προστατεύει τους ιστούς από την μηχανική κατάρρευση του ελάσματος σε συνθήκες αφυδάτωσης.

Τα ξηρόφυτα συνήθως παρουσιάζουν υψηλή πυκνότητα στοματίων, μικρότερου μεγέθους κυρίως στην αποαξονική πλευρά (Καραμπουρνιώτης 2003, Kummerow 1973, Parker 1968). Ωστόσο αυτό δε συμβαίνει με όλα τα ξηροφυτικά είδη (Metcalf and Chalk 1985). Πολλές φορές είναι βυθισμένα ή βρίσκονται σε κρύπτες και είναι καλυμμένα από επιστρώσεις εφυμενίδας και στρώματα κηρών (Καραμπουρνιώτης 2003, Kummerow 1973, Parker 1968). Τα υποστοματικά και σποραδικά υποαμφιστοματικά φύλλα, συνδέονται κατά κανόνα με την εμφάνιση σε συνθήκες ξηρασίας, ασχέτως αν πρόκειται για Μεσογειακές, παραμεσόγειες ή μεγάλου υψόμετρου περιβάλλοντα διαβίωσης. Η ύπαρξη στοματίων και στις δύο επιφάνειες του φύλλου, βοηθά στην ταχύτερη ανταλλαγή αερίων (αλλά και σε απώλειες νερού) και στην ταχύτερη ψύξη του (Fahn & Cutler 1992).

Στα χαρακτηριστικά αυτά, περιλαμβάνεται η ανάπτυξη ισχυρής και παχιάς εφυμενίδας. Η εφυμενίδα μπορεί να είναι λεία ή να έχει πτυχώσεις. Τα περισσότερα ξηρόφυτα γενικά έχουν εφυμενίδα με περισσότερες πτυχώσεις, ενώ τα περισσότερα μεσόφυτα ή υδροχαρή φυτά λεία (Metcalf and Chalk 1985). Αυτό μπορεί να σχετίζεται με την ανακλαστικότητά της και γίνεται με τη κατάλληλη διεύθυνση των υποεφυμενιδικών κηρών (Καραμπουρνιώτης 2003). Επίσης είναι πολύ συνηθισμένη η κάλυψη των επιφανειών από επιδερμικά εξαρτήματα κυρίως στρώματα αδενωδών ή μη τριχωμάτων, που συντελεί με πολλούς τρόπους στην αντιμετώπιση των καταπονήσεων.

Για να αποφευχθεί η υπερθέρμανση συχνά τα φύλλα προσανατολίζονται έτσι ώστε να μην εκτίθενται κάθετα στις ακτίνες του ήλιου ή/και παρουσιάζουν αυξημένο κυλινδρισμό (Parker 1968, Καραμπουρνιώτης 2003).

Σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να γίνεται αποθήκευση νερού, σε κατάλληλους ιστούς. Ο δεσμικός κολεός μπορεί να είναι περισσότερο ανεπτυγμένος, κάτι που μπορεί να έχει κάποιο ρόλο στην αποθήκευση νερού (Metcalf and Chalk 1985, Kummerow 1973). Ακόμα, αναφέρεται ότι σε ορισμένα ξηροφυτικά είδη, παρουσιάζονται κάποια μεγάλα κύτταρα που περιγράφονται σε δομές αποθήκευσης νερού, στην επιδερμίδα ή στην υποδερμίδα. Επίσης, έχει προταθεί ότι απορροφάται νερό από τα φύλλα, από την επιδερμίδα των φύλλων ή τα τριχώματα στις άκρες των φύλλων (Metcalf and Chalk 1985).

1.3.2 Διμορφισμός φύλλων

Τα φρύγανα αντιμετωπίζουν το πρόβλημα της καλοκαιρινής ξηρασίας με μείωση της διαπνέουσας επιφάνειας. Κατά μία εκδοχή αυτό επιτυγχάνεται με μερική φυλλόπτωση στο τέλος της υγρής περιόδου η οποία συνήθως συνοδεύεται από «αντικατάσταση» των χειμερινών από τα θερινά φύλλα τα οποία παρουσιάζουν διαφορετική μορφολογία (εποχιακός διμορφισμός των φύλλων). (Καραμπουρνιώτης & Λιακόπουλος 2009).

Ο διμορφισμός αυτός δεν επιτυγχάνεται με ένα μόνο τρόπο. Καταρχάς, δύο τύποι βλαστών μπορεί να αναπτυχθούν: οι βραχυβλάστες και οι δολιχοβλάστες. Οι δολιχοβλάστες και οι βραχυβλάστες δίνουν δύο τύπους φύλλων: τα μεγαλύτερα χειμωνιάτικα ή ανοιξιάτικα φύλλα και τα μικρότερα καλοκαιρινά φύλλα. Ο διμορφισμός επιτυγχάνεται με αποβολή των φύλλων και ανάπτυξη των καινούργιων βλαστών (Orshan 1961, Margaris 1981). Τα καλοκαιρινά φύλλα του φυτού *Phlomis fruticosa* εκπτύσσονται κατά τη διάρκεια της άνοιξης, και κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού ο ρυθμός του μεταβολισμού τους παραμένει σε χαμηλά επίπεδα. Με την έλευση της φθινοπωρινής βροχερής περιόδου, τα φύλλα αυτά απορροφούν νερό, αυξάνονται σε μέγεθος και ανακτούν πλήρως τις φυσιολογικές τους λειτουργίες. Στη νέα τους αυτή μορφή, τα καλοκαιρινά φύλλα προσφέρουν ενέργεια και δομικούς λίθους για την ανάπτυξη των χειμερινών φύλλων στις αρχές του χειμώνα. Τόσο η ανάκαμψη των καλοκαιρινών, όσο και η έκπτυξη των χειμερινών, εξαρτώνται χρονικά από την έναρξη της περιόδου των βροχών. Τα δύο είδη φύλλων συνυπάρχουν πάνω στα φυτά έως το τέλος της άνοιξης, οπότε γερνούν και πέφτουν μαζικά. Τότε, εκπτύσσονται τα καλοκαιρινά φύλλα που έχουν χαμηλότερο λόγο επιφάνειας προς όγκο, και υψηλότερη ειδική μάζα φύλλου (LSM) έναντι των χειμερινών και συμβάλλουν στην ελαχιστοποίηση των απωλειών νερού κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. (Κυπαρίσσης 1995)

Η σημασία της στρατηγικής που οδηγεί σε τέτοιες διαφορές θα πρέπει να είναι σημαντική τόσο από φυσιολογική όσο και από οικολογική άποψη αν ληφθούν υπ' όψη τα προβλήματα των φυτών κάτω από τις μεσογειακές συνθήκες (Christodoulakis et al. 1990). Αν και οι απόψεις των ερευνητών διχάζονται, φαίνεται πως ο εποχιακός διμορφισμός επηρεάζεται από

τη φωτοπερίοδο, τουλάχιστον για κάποια είδη (Margaris 1981). Έχουν μελετηθεί οι διαφορές που έχουν τα χειμερινά από τα θερινά φύλλα στη δομή των δύο τύπων φύλλων κάποιων εποχιακά διμορφικών μεσογειακών φυτών.

Στο φυτό *P. fruticosa*, τα χειμερινά φύλλα είναι αμφιστοματικά με εκτεταμένους μεσοκυττάριους χώρους, λιγοστές τρίχες στην επιδερμίδα, ελάχιστα προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού και καλά ανεπτυγμένους χλωροπλάστες στα κύτταρά τους. Τα θερινά φύλλα έχουν σαφώς ξηροφυτικό χαρακτήρα, είναι συμπαγή, υποστοματικά, με πυκνές τρίχες και μεγάλες ποσότητες προϊόντων δευτερογενούς μεταβολισμού στα κύτταρα του μεσόφυλλου τους. Με το ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο φαίνονται εντυπωσιακές διαφορές καθώς οι χλωροπλάστες των δύο τύπων φύλλων είναι τελείως διαφορετικοί. Στα χειμερινά φύλλα έχουν ανεπτυγμένο σύστημα θυλακοειδών και πολυάριθμα γκράνα ενώ στα θερινά η δομή τους παραπέμπει σε χλωροπλάστες του κολεού των δεσμίδων των C4 φυτών. Επίσης η παρουσία κρυστάλλων στο χυμοτόπιο των κυττάρων του μεσόφυλλου είναι σημαντική στα θερινά φύλλα. Η δυνατότητα δημιουργίας υποστοματικών αλλά και αμφιστοματικών φύλλων από το ίδιο φυτό, ανάλογα με την εποχή, αποτελεί αποδεικτικό στοιχείο για το πλούσιο γενετικό δυναμικό των εποχιακά διμορφικών φυτών. Με βάση το δεδομένο αυτό αλλά και τις δομικές διαφορές των χλωροπλάστων που θα μπορούσαν να αξιολογηθούν με τις διαθέσιμες πληροφορίες για τη λειτουργία των οργανιδίων αυτών, μπορούμε να πούμε ότι τα δύο είδη φύλλων αντιπροσωπεύουν δύο διαφορετικούς "τρόπους ζωής" πάνω στο ίδιο φυτό ενώ προκύπτουν και ενδιαφέροντα ερωτήματα για τη φυσιολογική δραστηριότητα των φύλλων αυτών (Christodoulakis 1989).

Μελετώντας τις διαφορές των φύλλων του είδους *Cistus incanus* L. subsp. *incanus*, οι Aronne et al. (2001) έδειξαν ότι πρόκειται για εποχιακά διμορφικό αιθαλές είδος καθώς αναπτύσσει βραχυβλάστες με μικρά φύλλα το καλοκαίρι και δολιχοβλάστες με μεγαλύτερα φύλλα και το χειμώνα. Βιομετρικά δεδομένα δείχνουν ότι ο βλαστός των φυτών το χειμώνα ήταν 14 φορές μεγαλύτερος από εκείνον του καλοκαιριού και έχει πολλά περισσότερα φύλλα. Το εμβαδόν της επιφάνειας των χειμωνιάτικων φύλλων ήταν 5 φορές μεγαλύτερο από ότι των καλοκαιρινών. Επίσης υπήρχαν ανατομικές διαφορές στη δομή του φύλλου ανάλογα με την εποχή: τα φύλλα το χειμώνα ήταν επίπεδα, ενώ το καλοκαίρι παρουσίαζαν πτυχωτό έλασμα εν μέρει συστρεφόμενο με τη μορφή κρύπτης στην κάτω επιφάνεια. Τα φύλλα καλύπτονται σημαντικά περισσότερο από τριχώματα κατά την καλοκαιρινή περίοδο συγκριτικά με το χειμώνα. Τα στόματα είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα κατά μήκος της κάτω επιδερμίδας των φύλλων το χειμώνα, ενώ το καλοκαίρι παρατηρήθηκαν μόνο στις κρύπτες των φύλλων.

Στα καλοκαιρινά φύλλα, συχνά παρατηρήθηκε και στις δύο πλευρές του ελάσματος πασσαλώδες παρέγχυμα, ενώ τα κύτταρα του μεσόφυλλου ήταν γενικά μικρότερα και οι μεσοκυττάριοι χώροι μειώθηκαν. Τα χειμωνιάτικα φύλλα είχαν ραχιαία (dorsiventral) δομή και μεγαλύτερους μεσοκυττάριους χώρους. Ο εποχιακός διμορφισμός, γενικά αναφέρεται ως

το αποτέλεσμα της προσαρμογής στην ξηρασία του καλοκαιριού. Ωστόσο, η μορφολογία και ανατομία του *C. incanus* έδειξε ότι τα υποείδη δεν έχουν αναπτύξει μόνο μια στρατηγική για να επιβιώσουν στη ξηρασία του καλοκαιριού, αλλά έχουν αναπτύξει δύο διαφορετικές μορφές, μια περισσότερο ξηροφυτική από την άλλη, ώστε να βελτιστοποιηθεί η προσαρμογή στις εποχικές κλιματολογικές αλλαγές που συμβαίνουν στο μεσογειακό χώρο σε συγκεκριμένες χρονικές περιόδους, κατά τη διάρκεια του έτους.

Ακόμα, αναφέρονται στην κλίση των φύλλων, η οποία κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού γίνεται απότομη ώστε να μειώνεται η έκθεση των φύλλων στην ηλιακή ακτινοβολία και να προστατεύεται ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός και να μην ανεβαίνει η θερμοκρασία των φύλλων. Ακόμα, παρατηρούν αύξηση του μεγέθους των επιδερμικών κυττάρων καθώς και αύξηση του αριθμού των στρώσεων της επιδερμίδας, κάτι που παρουσιάζουν ως δομή αποθήκευσης νερού.

Οι Kofidis and Bosabalidis (2008), μελετώντας τις μορφολογικές και ανατομικές εποχιακές διαφορές των φύλλων σε διαφορετικούς πληθυσμούς *Nepeta nuda* L., σημειώνουν ότι τα φύλλα που εκπτύσσονται το φθινόπωρο είναι μικρότερα από τα καλοκαιρινά φύλλα ενώ δεν παρατηρούνται εποχιακές διακυμάνσεις στην πυκνότητα των στοματίων τα οποία εντοπίζονται και στις δύο επιφάνειες των φύλλων, με μεγαλύτερη πυκνότητα στην αποξονική επιφάνεια. Σε όλους τους πληθυσμούς τα καλοκαιρινά φύλλα περιέχουν φαινολικά συστατικά στα επιδερμικά τους κύτταρα κάτι που δε φαίνεται να συμβαίνει το φθινόπωρο. Διαφορές επίσης σημειώθηκαν ανάμεσα στους χλωροπλάστες των μεσοφύλλων των διάφορων πληθυσμών. Όμως, σε όλους τους πληθυσμούς παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση των αμυλόκοκκων των χλωροπλάστων από το καλοκαίρι στο φθινόπωρο όπου οι αμυλόκοκκοι καταλαμβάνουν μόνο ένα μικρό μέρος του στρώματος. Επιπλέον, το φθινόπωρο, το σχετικό ποσοστό του όγκου των γκράνα ανά χλωροπλάστη αυξήθηκε. Παρόμοια αποτελέσματα από αντίστοιχη μελέτη έχουν δημοσιευτεί και για το *Clinopodium vulgare* L. (Kofidis et al. 2007), όπου τον Οκτώβρη και γενικότερα μετά τον Αύγουστο παρατηρήθηκαν χλωροπλάστες με ελάχιστους ή και καθόλου αμυλόκοκκους στα κύτταρα του μεσόφυλλου. Επίσης, παρατηρείται μία σταδιακή μείωση της συνολικής επιφάνειας των φύλλων κατά τη διάρκεια της βλαστικής περιόδου (από την άνοιξη μέχρι το φθινόπωρο).

Στο είδος *Origanum vulgare* L. τα φυτά κατά τους καλοκαιρινούς μήνες φαίνονται ψηλότερα. Επίσης, τόσο τα αδενώδη όσο και οι τα μη αδενώδη τριχώματα παρουσιάζουν μία αύξηση στην πυκνότητά τους από τα ανοιξιάτικά στα φθινοπωρινά φύλλα (Kofidis et al. 2003). Τον Αύγουστο και τον Οκτώβρη, φαίνεται να συγκεντρώνονται φαινολικά. Σε φυτά που μεγαλώνουν σε μικρό υψόμετρο (200μ.), τα επιδερμικά κύτταρα και τα κύτταρα του μεσόφυλλου, τον Απρίλιο, φαίνεται να είναι διευρυμένα.

Στο *Ballota acetabulosa* τα θερινά φύλλα αναφέρονται ως περισσότερο ξηρομορφικά και σημειώνεται ότι αυξάνεται ο αριθμός των στοιβάδων του πασσαλώδους παρεγχύματος από τα

χειμερινά, κάτι το οποίο θεωρείται γενετικά ελεγχόμενο και αμετάβλητο στα φύλλα (Christodoulakis & Bazos 1990).

1.4 Η συμβολή των μορφολογικών χαρακτήρων στην θεμελιώδη άμυνα.

Η στρατηγική της αποφυγής, ταυτίζεται με την ύπαρξη της θεμελιώδους προϋπάρχουσας άμυνας. Πρόκειται για ένα σύνολο αμυντικών μηχανισμών, οι οποίοι έχουν αναλάβει τη μόνιμη προστασία των φυτικών ιστών και οργάνων. Περιλαμβάνει μορφολογικούς χαρακτήρες οι οποίοι παρέχουν κυρίως μηχανική προστασία, όπως διάφορα εξαρτήματα της επιδερμίδας και δομές οι οποίες παρέχουν σύνθετη προστασία όπως αδένες, ρητινοφόροι αγωγοί, γαλακτοφόροι σωλήνες. Έτσι, ενισχύουν αμυντικά τους ιστούς τους, ώστε να αποκλείσουν την είσοδο των παθογόνων στο εσωτερικό, ή να αποτρέψουν την κατανάλωση τους από τα φυτοφάγα. Σε αυτά περιλαμβάνεται η εφυμενίδα (ένα κηρώδες εξωτερικό στρώμα) και το περιδέρμα (δευτερογενής προστατευτικός ιστός) τα οποία, εκτός από την επιβράδυνση της απώλειας του νερού, αποτελούν φράγματα για την είσοδο των βακτηρίων και μυκήτων. (Καραμπουρνιώτης 2003, Τσέκος 2003, Καραμπουρνιώτης & Λιακόπουλος 2009)

Σε αυτό συμβάλλουν και οι σκληρογλυματικοί ιστοί ενισχύοντας την αμυντική θωράκιση, λειτουργώντας κυρίως ως μηχανικά φράγματα και αποτρέποντας την κατανάλωσή τους από τα φυτοφάγα, λόγω φυσικής σκληρότητας. Ταυτόχρονα, η κυτταρίνη και η λιγνίνη, τους καθιστά δύσπεπτους και χαμηλής θρεπτικής αξίας λόγω έλλειψης αζώτου. Σημαντική συνεισφορά στην άμυνα ενός φυτικού οργανισμού μπορεί να έχουν και απονεκρωμένοι ιστοί στους οποίους όμως σε ορισμένα στάδια της ανάπτυξής τους έχουν συσσωρευτεί δευτερογενείς μεταβολίτες, συνήθως φαινολικές ουσίες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων ιστών αποτελούν το εγκάρδιο ξύλο του κορμού ορισμένων δένδρων, καθώς και ορισμένα επιδερμικά εξαρτήματα. (Καραμπουρνιώτης 2003, Τσέκος 2003, Καραμπουρνιώτης & Λιακόπουλος 2009)

Στα ξηρόφυτα οι προστατευτικοί ιστοί εφυμενίδα και επιδερμίδα είναι ανεπτυγμένοι κάτι που συνδέεται με τη μείωση των διαπνευστικών απωλειών και την αποθήκευση νερού. Η εποχή, το στάδιο της ανάπτυξης και το είδος του οργάνου παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της θεμελιώδους άμυνας. Κατά κανόνα τα νεαρά φύλλα θωρακίζονται με υψηλότερες συγκεντρώσεις δευτερογενών μεταβολιτών, ενώ οι καρποί εμφανίζονται με μειωμένη αμυντική προστασία. (Καραμπουρνιώτης 2003, Τσέκος 2003, Καραμπουρνιώτης & Λιακόπουλος 2009)

Εφυμενίδα, κυτταρικό τοίχωμα και περίδερμα.

Το **κυτταρικό τοίχωμα** των φυτών συγκροτείται από δύο φάσεις. Μία μικροϊνδιακή (κρυσταλλική) φάση προσηλωμένη σε μία περισσότερο άμορφη και μία μη κρυσταλλική βλεννώδη φάση (matrix). Η κρυσταλλική φάση αποτελείται από κυτταρίνη ή ξυλάνη, στην οποία οι μεμονωμένες πολυσακχαριτικές αλυσίδες που συγκροτούν τα μικροϊνδία είναι ευθύγραμμες και σε στενούς δεσμούς μεταξύ τους κατασκευάζοντας κρυσταλλική δομή. Η μη κρυσταλλική φάση αποτελείται από ημικυτταρίνες, πηκτίνες και δομικές γλυκοπρωτεΐνες. Οι ημικυτταρίνες είναι εύκαμπτοι πολυσακχαρίτες που πρέπει να σχηματίζουν «σχοινιά» που συνδέουν μικροϊνδία κυτταρίνης, σε ένα συνεκτικό δίκτυο ή δρουν ως ένα ολισθηρό περίβλημα για να εμποδίσουν την άμεση επαφή μικροϊνδίου προς μικροϊνδίο. Οι πηκτίνες σχηματίζουν μια φάση πηκτής, στην οποία είναι προσηλωμένο το δίκτυο κυτταρίνης-ημικυτταρίνης. Αυτές δρουν ως υδρόφιλο γέμισμα και εμποδίζουν τη σύζευξη και κατάρρευση του δικτύου της κυτταρίνης, ενώ καθορίζουν την πορώδη υφή του κυτταρικού τοιχώματος. (Τσέκος 2003)

Στα πρωτογενή κυτταρικά τοιχώματα τα μικροϊνδία της κυτταρίνης προσηλώνονται σε μία υψηλώς ενυδατωμένη άμορφη φάση (matrix), η οποία αποτελείται πιθανόν από 75 έως 80% από νερό. Η απομάκρυνση νερού καθιστά το τοίχωμα πιο δύσκαμπτο και λιγότερο εκτατό. Αυτή η δυσκαμψία που προκαλείται σε συνθήκες αφυδάτωσης, θα πρέπει να παίζει έναν ρόλο στην αναστολή της αύξησης από την έλλειψη ύδατος. (Τσέκος 2003)

Η **εφυμενίδα** και ο **αποφελλωμένος ιστός**, παρέχουν κάποιο βαθμό αντίστασης στους παθογόνους μικροοργανισμούς και τα έντομα, προστατεύοντας τους ιστούς από μηχανικές καταπονήσεις και εμποδίζοντας την εισχώρηση των υφών των μυκήτων και των μυζητήρων των εντόμων. Λόγω του ισχυρά υδρόφοβου χαρακτήρα τους, εξασφαλίζουν ένα φράγμα έναντι της απώλειας του νερού που είναι και ο κύριος ρόλος αυτών των στρωμάτων. Επίσης, εμποδίζεται η διαβροχή της επιφάνειας με αποτέλεσμα να περιορίζεται η βλάστηση των σπορίων και η επιβίωση των μικροοργανισμών αλλά και η επικάλυψη ρυπαντών. Ακόμα, η εφυμενίδα και επιδερμίδα μπορεί να περιορίζουν την είσοδο ακτινοβολίας μέσω ανάκλασης και απορρόφησης (Καραμπουρνιώτης 2003, Τσέκος 2003).

Η εφυμενίδα είναι μία πολύστρωμη δομή που είναι αποτέλεσμα έκκρισης. Αποτελείται από ένα εξωτερικό περίβλημα από κηρό, ένα παχύ μέσο στρώμα που περιέχει κουτίνη εγκλεισμένη σε κηρό (η κυρία εφυμενίδα), και ένα βαθύτερο στρώμα που σχηματίζεται από κουτίνη και κηρό που αναμιγνύονται με τις ουσίες του κυτταρικού τοιχώματος (το εφυμενικό στρώμα).

Το κύριο συστατικό της εφυμενίδας είναι η κουτίνη (υμενίνη), που είναι ένας λιπιδικός πολυεστέρας. Η κουτίνη είναι ένα πολυμερές δικτυωτό οξυγονωμένων C_{10} & C_{18} λιπαρών οξέων τα οποία σχηματίζουν μίγματα διαφορετικών αναλογιών, και συνδέονται μεταξύ τους

με εστερικούς δεσμούς. Οι αλληλοεστεροποιημένες ακυλικές αλυσίδες σχηματίζουν μία μη-ελαστική τρισδιάσταση δικτυωτή διάταξη με ισχυρά υδρόφοβο χαρακτήρα. Κατά πάσα πιθανότητα η κουτίνη δρα σαν ένα σχετικώς μη-ελαστικό εξωτερικό δέρμα που βοηθά στο να προσφέρει μια δυσκαμψία στους σπαργώντες φυτικούς ιστούς, καθώς και να εξασφαλίζει κάποια άμυνα έναντι της διόδου των παθογόνων μικροοργανισμών. Εξαιτίας των σχετικά μεγάλων πόρων του πλέγματος της κουτίνης, δεν είναι πολύ πιθανό να παρέχει ένα ουσιαστικό φράγμα στην απώλεια του ύδατος από μόνη της. Πρόσφατη έρευνα προτείνει ότι, εκτός από την κουτίνη, η εφυμενίδα πιθανόν περιέχει ένα δεύτερο λιπιδικό πολυμερές, το οποίο δομείται από μία επιμήκη αλυσίδα υδρογονανθράκων που ονομάζεται κυτάνη (cutan) (Τσέκος 2003).

Η **σουβερίνη** (φελλίνη) είναι ένα πολυμερές που παρουσιάζει παρόμοια δομή με εκείνη της κουτίνης. Οι κύριες διαφορές ανάμεσα στην κουτίνη και τη σουβερίνη (φελλίνη) πιστεύεται ότι είναι το γεγονός ότι τα λιπαρά οξέα στη σουβερίνη δεν έχουν δευτεροταγείς αλκοόλες ή εποξειδικές ομάδες, είναι περισσότερο επιμήκη με μεγάλο αριθμό ατόμων άνθρακα στην αλυσίδα (πάνω από 18 άτομα άνθρακα), ενώ συμμετέχουν και δικαρβοξυλικά οξέα. Επιπρόσθετα, η σουβερίνη έχει ένα σχετικά υψηλό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις (όπως p-κουμαρικό οξύ).

Η σουβερίνη είναι ένα συστατικό στοιχείο του κυτταρικού τοιχώματος που απαντάται σε πολλές θέσεις στο όλο φυτικό σώμα. Η σουβερίνη είναι το κύριο συστατικό των εξωτερικών κυτταρικών τοιχωμάτων όλων των υπογείων οργάνων και συζεύγνυται με τα κύτταρα του φελλού του περιδέρματος, που σχηματίζει τον εξωτερικό δευτερογενή φλοιό (bark) των βλαστών και ριζών κατά τη διάρκεια της δευτερογενούς αυξήσεως των ξυλωδών φυτών. Χαρακτηριστική είναι η παρουσία της στην ταινία του Caspary της ενδοδερμίδας της ρίζας, η οποία σχηματίζει ένα φράγμα ανάμεσα στον αποπλάστη του φλοιού και στην στήλη.

Η σουβερίνη σχηματίζεται επίσης στις θέσεις της αποκοπής των φύλλων και σε περιοχές που υπέστησαν βλάβες από ασθένειες ή τραυματισμούς. Ακόμα απαντάται να περιβάλλει επίσης τα κύτταρα του περιδεσμικού κολεού στα C₄ φυτά. Η λειτουργία σε αυτήν την περίπτωση πιθανόν συνίσταται στο να εμποδίσει τη διάχυση του CO₂, το οποίο παράγεται από τις αντιδράσεις αποκαρβοξυλίωσης, έξω από τα κύτταρα του περιδεσμικού κολεού.

Οι **κηροί** αναφέρονται και ως επεφυμενιδικά συστατικά. Είναι μίγμα (ακυλολιπιδίων) εστέρων λιπαρών οξέων και μη πολυμερισμένων υδρογονανθράκων με πολύ υδρόφοβο χαρακτήρα. Τα πιο συνηθισμένα συστατικά του κηρού είναι ευθύγραμμες αλυσίδες αλκανίων και αλκοολών με 25 έως 35 άτομα και εστέρες λιπαρών οξέων των οποίων οι αλυσίδες είναι επιμήκεις και περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό ατόμων άνθρακα, καθώς και μη πολυμερισμένων υδρογονανθράκων. Το εξαιρετικά υδρόφοβο στρώμα των κηρών συνήθως περιλαμβάνει λιπόφιλα συστατικά με αμυντικό προορισμό, όπως στερόλες και μεθυλιωμένα

φλαβονοειδή. Απαντώνται επίσης επιμήκεις αλυσίδες αλδεϋδών, κετονών, εστέρων και ελευθέρων λιπαρών οξέων.

1.4.1 Τα επιδερμικά εξαρτήματα συνεισφέρουν στην προστασία των φυτικών ιστών:

Περιλαμβάνουν μεγάλη ποικιλία μορφών, πρόκειται δε για ανατομικούς σχηματισμούς με καθαρά αμυντικό προορισμό. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι αδενώδεις τρίχες, οι οποίες απαντώνται σε ένα μεγάλο αριθμό φυτικών ειδών, με χαρακτηριστικούς εκπροσώπους στην οικογένεια *Lamiaceae*. Οι αδενώδεις τρίχες παράγουν και απεκκρίνουν δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι είτε είναι τοξικοί για τα παθογόνα και τα φυτοφάγα, είτε μεσολαβούν στην επικονίαση

1.4.1.1 Μη αδενώδη τριχώματα

Τα στρώματα των μη αδενωδών τριχών που καλύπτουν τα φύλλα αποτελούν φράγμα μηχανικής και χημικής προστασίας και αποτελούν φίλτρο έναντι υπεριώδους ακτινοβολίας. Επίσης θωρακίζουν τα φύλλα έναντι των φυτοφάγων. Τα επιδερμικά εξαρτήματα εμφανίζουν υψηλή πυκνότητα κυρίως στα πρώτα στάδια. (Καραμπουρνιώτης 2003)

Τα μη αδενώδη τριχώματα ποικίλουν ως προς τη μορφολογία και την ανατομία τους και κατηγοριοποιούνται κυρίως με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για ταξινομικούς σκοπούς και είναι ξεκάθαρο ότι έχουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα ειδικά έναντι των φυτοφάγων αδένων (Levin 1973). Μπορεί να είναι μονοκύτταρα ή πολυκύτταρα ενώ και οι δύο τύποι μπορεί να φέρουν ή όχι διακλαδώσεις. Συχνά, στα φύλλα εντοπίζονται περισσότεροι του ενός τύποι μη αδενωδών τριχωμάτων και μάλιστα, μερικές φορές σε διαφορετικές θέσεις.

Τα τριχώματα συνήθως καλύπτονται από εφυμενίδα, η οποία αποτελεί συνέχεια αυτής των επιδερμικών κυττάρων, το πάχος της οποίας μπορεί να ποικίλει. Η εξωτερική επιφάνειά τους μπορεί να είναι λεία, ή να φέρει επιδερμικές θηλές (Werker 2000). Το κυτταρικό τοίχωμα των μη αδενωδών τριχωμάτων μπορεί να αποτελείται από πρωτογενές τοίχωμα μόνο ή και από δευτερογενές, το οποίο μπορεί να εμφανίζει ομοιόμορφη ή όχι πάχυνση. Επίσης, μπορεί να έχουν εναποτεθεί διάφορα υλικά, όπως κουτίνη, σουβερίνη και λιγνίνη. Στα τριχώματα ορισμένων ξηρομορφικών ειδών, τα πλευρικά τοιχώματα των κατώτερων κυττάρων (της βάσης ή του μίσχου), είναι εντελώς κουτινοποιημένα (cutinized), όπως τα κύτταρα της ενδοδερμίδας, και αποτρέπουν την αποπλαστική κίνηση του νερού προς τα τριχώματα (Fahn 1986).

Οι μη αδενώδεις τρίχες σε πολλά φυτά σχηματίζουν το τρίχωμα δηλαδή ένα πυκνό στρώμα από αλλεπάλληλα στρώματα (indumentum) στην επιφάνεια του φύλλου το οποίο προσδίδει λευκή και υπόλευκη χροιά και βελούδινη υφή στο έλασμα που προστατεύει τα φωτοσυνθετικά κύτταρα, από τις υψηλές εντάσεις φωτεινής και υπεριώδους ακτινοβολίας και αυξάνει την ανακλαστικότητα της επιφάνειας. Παράλληλα βελτιώνει το θερμικό της ισοζύγιο, συμβάλλοντας έτσι στην αποφυγή της υπερθέρμανσης του ελάσματος ανακλώντας ένα μέρος της ακτινοβολίας που προσπίπτει στο φύλλο.

Το πυκνό τρίχωμα που παρατηρείται, παρέχει προστασία από την UV-B ακτινοβολία (Manetas 2003). Οι μη αδενώδεις τρίχες κατά τα τελευταία στάδια της ζωής τους, συνήθως νεκρώνονται, αφού πρώτα, κατά την ανάπτυξη τους, συσσωρεύονται σε αυτούς δευτερογενείς μεταβολίτες (συνήθως φαινολικά) και έτσι προσφέρουν προστασία έναντι παθογόνων και υπεριώδους ακτινοβολίας. Οι φαινολικές ενώσεις, που μπορεί να υπάρχουν στα μη αδενώδη τριχώματα, παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των νέων κυρίως φύλλων από την ακτινοβολία UV-B (Karabourniotis and Fasseas 1996).

Ακόμη, τα τριχώματα προστατεύουν το φύλλο από υπερβολικές απώλειες νερού, είτε έμμεσα ρυθμίζοντας την θερμοκρασία, είτε δημιουργώντας και διατηρώντας ένα ατμοσφαιρικό οριακό στρώμα στο φύλλο, παρεμβαίνοντας έτσι στην διαπνοή. (Fahn 1986, Αϊβαλάκης και συν. 2005)

Ακόμα, προσφέρουν προστασία όταν η πυκνότητα τους είναι μεγάλη και στα αδενώδη τριχώματα (Werker 2000).

1.4.1.2 Αδενώδη τριχώματα

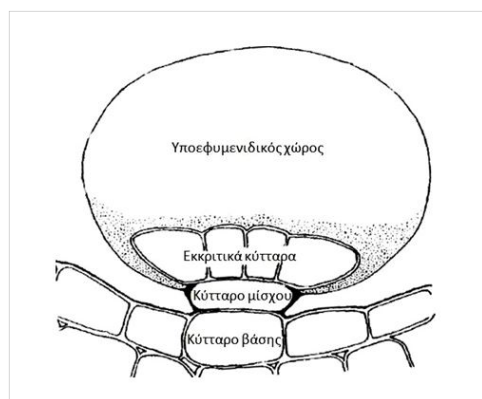
Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα αιθέρια έλαια εκκρίνονται από τις αδενώδεις τρίχες που καλύπτουν τα εναέρια τμήματα των φυτών για αμυντικούς σκοπούς (Werker 1985, Werker 1993, Buchanan et al. 2000, Taiz and Zeiger 2002). Οι αδενώδεις τρίχες εκκρίνουν λιπόφιλα συστατικά και απαντώνται σε πολλές οικογένειες όπως Lamiaceae, Compositae, Geraniaceae, Solanaceae και Cannabinaceae. Οι αδένες διαφέρουν στο σχήμα και τη δομή τους (Werker 2000). Με βάση την ανατομία των αδενωδών τριχωμάτων, τα τριχώματα της οικογένειας Lamiaceae κατατάσσονται σε δύο κύριους τύπους: τα ασπιδοειδή αδενώδη τριχώματα (peltate) και τα κεφαλοειδή αδενώδη τριχώματα (capitate) (Fahn 1979, Fahn 2000). Κατά μια άλλη εκδοχή, οι ασπιδοειδείς αδενώδεις τρίχες ονομάζονται και μακροκέφαλες ελαιοφόρες τρίχες, ενώ οι κεφαλοειδείς ονομάζονται μικροκέφαλες ελαιοφόρες τρίχες (Μποζαμπαλίδης 2008).

Οι ερευνητές έχουν μελετήσει τη μορφολογία και τη λεπτή δομή των αδενωδών τριχών και των εκκρίσεων τους για δύο βασικούς λόγους. Καταρχάς, την εμπορική αξία των

φυσικών προϊόντων ως φαρμακευτικά, φυσικά εντομοκτόνα, αρτυματικά, αρωματικές ύλες, και άλλους σκοπούς (Duke et al. 2000), και κατά δεύτερο τη σημασία αυτών στη συστηματική κατάταξη και τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων (Abu-Asab & Cantino 1987, Werker et al. 1985).

Μια τυπική αδενώδης πολυκύτταρη τρίχα αποτελείται από: 1. Μία μονοκύτταρη ή πολυκύτταρη εκκριτική κεφαλή 2. Ένα μίσχο μονοκύτταρο ή πολυκύτταρο και 3. Ένα ή περισσότερα κύτταρα βάσης (Werker 2000).

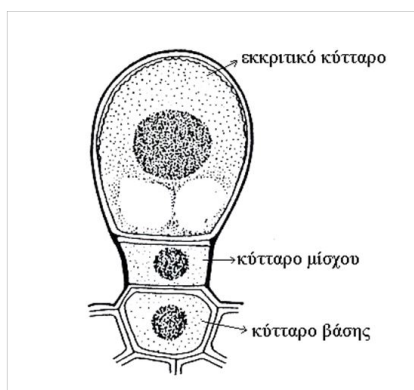
Τα πλευρικά τοιχώματα τουλάχιστον στα ασπιδοειδή τριχώματα, είναι εντελώς κουτινοποιημένα (cutinized) (Fahn 1979, Fahn 1988, Fahn 2000). Το κύτταρο του λαιμού της βάσης των τριχωμάτων, φαίνεται να επιτελεί ξεχωριστό ρόλο παρόμοια με εκείνο της ενδοδερμίδας με το να εμποδίζει την αντίστροφη ροή των εκκρινόμενων υλικών μέσω του αποπλάστη (Fahn 1979).



Σχήμα 1.1.

Ασπιδοειδής (peltate) αδένas
(Turner et al. 2000)

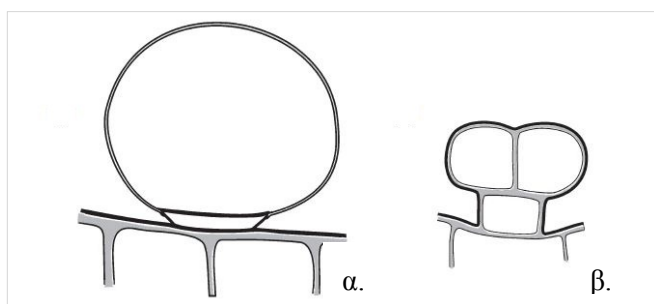
Μια τυπική ασπιδοειδής τρίχα (Σχήμα 1.1) αποτελείται από ένα κύτταρο βάσης, ένα υπερκείμενο κύτταρο μίσχου και μια ογκώδη κεφαλή η οποία αποτελείται από πολλά κύτταρα τοποθετημένα σε μια στρώση (Fahn 2000, Fahn 1979). Το αιθέριο έλαιο παράγεται στα κύτταρα της κεφαλής και απεκκρίνεται σε ένα χώρο που δημιουργείται στην κορυφή της κεφαλής ανάμεσα από τα κυτταρικά τοιχώματα και την ανασηκωμένη εφυμενίδα. Κάποια συστατικά των αιθέριων ελαίων μπορεί να περάσουν από την εφυμενίδα αλλά τα περισσότερα παραμένουν μέσα στον αδένas μέχρι τη νέκρωση της αδενώδους τρίχας (Fahn 1979, Fahn 2000). Σε μερικές περιπτώσεις η εφυμενίδα σχίζεται (Bisio 1999, Ascensão & Pais 1998).



Σχήμα 1.2.

Κεφαλοειδής (capitate)
αδένας (Fahn 2000)

Τα κεφαλοειδή τριχώματα αποτελούνται από ένα κύτταρο βάσης, μίσχο από μονοκύτταρο έως πολυκύτταρο, και κεφαλή με ένα ή δύο κύτταρα (Σχήμα 1.2) (Fahn 1979, Fahn 2000, Werker et al. 1985). Σε πολλά κεφαλοειδή αδενώδη τριχώματα, τα εκκρινόμενα υλικά εκκρίνονται στον εξωτερικό μέσω κάποιου πόρου στην εφυμενίδα, σύντομα μετά τη σύνθεσή τους (Werker 1993, Werker 2000, Fahn 2000, Ascensão & Pais 1998). Σύμφωνα με ορισμένους ερευνητές, οι κεφαλοειδείς ή μικροκέφαλες ελαιοφόρες τρίχες κατατάσσονται σε τρεις τύπους. Οι τύπου I είναι οι πιο κοντές και αποτελούνται από ένα κύτταρο βάσης, ένα ή δύο κύτταρα μίσχου και ένα (σπανίως 2) κύτταρο κεφαλής που έχει ωοειδές ή σφαιρικό σχήμα. Οι μικροκέφαλες τρίχες τύπου II είναι λίγο πιο ψηλές από τις προηγούμενες και αποτελούνται από ένα κύτταρο βάσης, ένα ως δύο κύτταρα μίσχου και ένα κύτταρο κεφαλής που αρχικά είναι όσο στενά είναι και τα κύτταρα του μίσχου και ανοίγει προς τα πάνω, έτσι που μοιάζει με ανάποδο γουδοχέρι. Τέλος, οι μικροκέφαλες ελαιοφόρες τρίχες τύπου III είναι λεπτές και μακριές και αποτελούνται από δύο ή περισσότερα κύτταρα βάσης, δύο έως πέντε κύτταρα μίσχου και ένα στρογγυλό μονοκύτταρο εκκριτικό κύτταρο κεφαλής. (Werker 1985)



Σχήμα 1.3.

(Argyropoulou et al. 2010)

Οι Argyropoulou et al. (2010) για το *Lippia citriodora* (Verbenaceae), αναφέρουν ένα τύπο αδένα που δεν κατατάσσεται ξεκάθαρα ούτε στους κεφαλοειδείς ούτε στους ασπιδοειδείς (Σχήμα 1.3β.). Εξωτερικά μοιάζουν περισσότερο με «μικρούς ασπιδοειδείς αδένες με μίσχο» (small-stalked peltate) όπως περιγράφονται και από τους Combrinck et al. (2007) για το *Lippia scaberrima*, ενώ παρόμοιοι αδένες αναφέρονται και στο *Leonotis leonurus* (Lamiaceae), (Ascensão et al. 1995, Ascensão and Pais 1998). Αποτελούνται από

ένα μόνο κύτταρο μίσχου και τέσσερα ή οκτώ κύτταρα κεφαλής, ενώ φαίνεται πως δε διαθέτουν χώρο αποθήκευσης για τα προϊόντα που εκκρίνονται. Έχει παρατηρηθεί, με φθορίζουσες χρωστικές, ότι αυτοί οι αδένες μπορεί να συγκεντρώνουν κάποια φαινολικά συστατικά (Combrinck et al. 2007).

Οι Argyropoulou et al. (2010), αναφέρουν ακόμα και ένα τύπο τριχώματος που εξωτερικά είναι όμοιος με ένα κοινό ασπιδοειδή αδέν που περιγράφεται σε πολλά είδη Lamiaceae και Verbenaceae (Σχήμα 1.3α.). Η βασική διαφορά βρίσκεται στο ότι η κεφαλή (peltum) αυτού του τύπου είναι μονοκύτταρη ενώ των περισσότερων αποτελείται από 4–18 κύτταρα πεπλατυσμένα κύτταρα, διατεταγμένα σε έναν ή δύο ομόκεντρους κύκλους.

Οι Abu-Asab and Cantino (1987), κατατάσσουν τις αδενώδεις τρίχες του υποτρίττου (subtribe) Melittidinae (Lamiaceae), σε δύο κύριες κατηγορίες. Οι ροπαλοειδείς (clavate), που αποτελούνται από μονοκύτταρη ή πολυκύτταρη κεφαλή σε σχετικά μακρύ, πολυκύτταρο μίσχο του οποίου τα κύτταρα είναι διατεταγμένα σε μία σειρά, ενώ το ανώτερο κύτταρο είναι συνήθως δισκοειδές. Οι άμμισχες (sessile), αποτελούνται από μονοκύτταρη ή πολυκύτταρη κεφαλή, που στηρίζεται σε κοντό μονοκύτταρο (σπάνια δικύτταρο) μίσχο και ένα ή περισσότερα κύτταρα βάσης.

Το ιδιαίτερο μορφολογικό χαρακτηριστικό του κεφαλοειδών αδένων όπως περιγράφεται από τους Beentjie και Ghazanfar (2003), είναι η ομοιότητα του αδέν με κεφάλι καρφίτσας ή με στίγμα άνθους (όπως αναφέρεται από τους Combrinck et al. 2007). Οι συγκεκριμένοι συγγραφείς ξεχωρίζουν τους ασπιδοειδείς αδένες από το στρογγυλό κύτταρο της κεφαλής το οποίο, ανάλογα με το είδος, μπορεί να είναι συμμετρικά ή ασύμμετρα προσκολλημένο στο μίσχο. Στους ασπιδοειδείς αδένες έχει διαπιστωθεί ότι ο μίσχος και η βάση γενικά αποτελούνται μόνο από ένα κύτταρο, παρόλο που ο αριθμός των κυττάρων ποικίλλει.

Σύμφωνα με τη λειτουργία και τον χρόνο της εκκριτικής δραστηριότητας, τα αδενώδη τριχώματα μπορούν να διακριθούν σε δύο τύπους: 1. Μικρής διάρκειας αδενώδη τριχώματα τα οποία αντιστοιχούν στα τριχώματα κεφαλοειδούς τύπου και 2. Μακράς διάρκειας αδενώδη τριχώματα τα οποία αντιστοιχούν στα τριχώματα ασπιδοειδούς τύπου (Werker 1993).

Σχετικά με τα εκκριτικά τριχώματα των ανθέων, πολύ λίγα είναι γνωστά όσον αφορά τη θέση και τη δομή τους στα διάφορα τμήματα του άνθους καθώς και τη χημική σύσταση των εκκρινόμενων ουσιών από τους διάφορους αδένες. Δεν είναι επίσης γνωστό, αν γενικά οι ίδιοι μορφολογικά αδένες όταν παρουσιάζονται σε διαφορετικά όργανα παράγουν τις ίδιες χημικές ουσίες και στην ίδια αναλογία. Στα άνθη οι ουσίες που εκκρίνονται από τα αδενώδη τριχώματά τους, φαίνεται να εξυπηρετούν τόσο την προσέλκυση των επικονιαστών όσο και την προστασία τους από τους θηρευτές τους. (Μποζαμπαλίδης 2008)

Έκκριση του αιθέριου ελαίου

Σε εφαπτομενική τομή του φύλλου στο επίπεδο της επιδερμίδας φαίνεται ότι το κύτταρο βάσης κάθε μακροκέφαλής τρίχας περιβάλλεται ακτινωτά από επιδερμικά κύτταρα, τα οποία ανήκουν λειτουργικά στην ελαιοφόρα τρίχα (Bosabalidis & Tsekos 1984). Η ακτινωτή διάταξη των επιδερμικών κυττάρων γύρω από το κύτταρο βάσης, το μεγάλο μέγεθος του κυττάρου βάσης, το ογκώδες κεντρικό χυμοτόπιό του και ο μεγάλος αριθμός πλασμοδεσμών στα τοιχώματα ανάμεσα από το κύτταρο βάσης και τα ακτινωτά επιδερμικά κύτταρα, επιτρέπουν να υποθέσει κανείς ότι τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης του χλωροφυλλούχου μεσόφυλλου (τα οποία αποτελούν τις προβαθμίδες βιοσύνθεσης του αιθέριου ελαίου) συλλέγονται από τα ακτινωτά επιδερμικά κύτταρα και διοχετεύονται κεντρομόλα στο κύτταρο βάσης, όπου συγκεντρώνονται στο μεγάλο κεντρικό χυμοτόπιό του. Στη συνέχεια μεταφέρονται στο κύτταρο μίσχου και τελικά στα κύτταρα κεφαλής της ελαιοφόρου τρίχας, όπου με τα κατάλληλα ένζυμα μεταβολίζονται σε αιθέριο έλαιο. (Μποζαμπαλιδής, 2008).

Η μελέτη με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξε ότι λίγο πριν από την έναρξη της έκκρισης, στα αδενικά κύτταρα της κεφαλής της τρίχας αυξάνεται έντονα ο αριθμός των μιτοχονδρίων. Τα μιτοχόνδρια θα παράγουν την ενέργεια που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί η έκκριση, η οποία είναι μια ενεργός διαδικασία. Τα πλαστίδια δεν περιέχουν ένα οργανωμένο σύστημα μεμβρανών, αλλά μόνο μερικά διάσπαρτα κυκλικά θυλακοειδή και σκούρες ελασματοειδείς δομές. Όταν αρχίσει η έκκριση, στο θεμελιώδες πλάσμα των αδενικών κυττάρων εμφανίζονται πολυάριθμα σταγονίδια αιθέριου ελαίου, διαφόρων μεγεθών. Από τα συστατικά του αιθέριου ελαίου, τα σεσκιτερπένια παράγονται στο θεμελιώδες πλάσμα, τα δε μονοτερπένια στα πλαστίδια (Bick & Lange 2003). Επειδή μέσα στα πλαστίδια δεν παρατηρούνται σταγονίδια αιθέριου ελαίου, είναι πιθανόν τα μονοτερπένια να εξέρχονται από τα πλαστίδια στο θεμελιώδες πλάσμα, όπου μαζί με τα σεσκιτερπένια συγκροτούν το τελικό εκκρινόμενο προϊόν. Κατά την παραπέρα πορεία της έκκρισης, τα σταγονίδια του αιθέριου ελαίου ενώνονται μεταξύ τους και σχηματίζουν στο θεμελιώδες πλάσμα μεγάλες ακανόνιστες συγκεντρώσεις. Το αιθέριο έλαιο διοχετεύεται προς τα κορυφαία τοιχώματα της κεφαλής της τρίχας, τα οποία αφού διαπεράσει συγκεντρώνεται σε ένα χώρο κάτω από την ανασηκωμένη εφυμενίδα (Bosabalidis & Tsekos 1982).

Η παρουσία ελεύθερου αιθέριου ελαίου στο θεμελιώδες πλάσμα (όχι μέσα σε κάποιο μεμβρανικό διαμέρισμα) θα μπορούσε να προκαλέσει τη δηλητηρίασή του, γι αυτό και συνήθως αυτό απαντάται με γλυκοζιτική μορφή (ενωμένο με σάκχαρο). Σε πρόσφατη δημοσίευση για τους ασπιδοειδείς αδένες του *Origanum dictamnus* L., φάνηκε ότι στο στάδιο της έκκρισης στον υποεφυμενιδικό χώρο σχηματίζονται δυο διαμερίσματα. Το πρώτο, είναι σα μεγάλη κύστη, τοποθετείται στην κορυφή της εκκριτικής κεφαλής και περιέχει αιθέριο

έλαιο, ενώ το δεύτερο έχει σχήμα δακτυλίου, βρίσκεται προς τη βάση της κεφαλής και περιέχει πολυσακχαρίτες. Στον κορυφαίο θάλαμο, υπάρχει και ένα μικρό πλευρικό τμήμα που περιέχει αιθέρια έλαια και πολυσακχαρίτες, οι οποίοι φαίνονται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, σαν άσπρα σταγονίδια μέσα στο σκούρο αιθέριο έλαιο. Τα σταγονίδια αυτά, πιθανώς προκύπτουν, όταν οι γλυκοζίτες υδρολυθούν, αφού περάσουν το κυτταρικό τοίχωμα και το πλασμάλλημα και φτάνοντας στο κορυφαίο διαμέρισμα. Έτσι, αυτά τα σταγονίδια πιθανά να είναι τα προϊόντα της υδρόλυσης (το κλάσμα των σακχάρων) ενώ το άγλυκο κλάσμα (αιθέριο έλαιο) συγκεντρώνεται στο ανώτερο μέρος της κεφαλής. (Bosabalidis 2010)

Έχει βρεθεί ότι η βιοσυνθετική ικανότητα των αδενωδών τριχωμάτων δεν περιορίζεται στην παραγωγή των ισοπρενοειδών αλλά περιλαμβάνει και κάποιες ομάδες φαινολικών ενώσεων. Έχει πιστοποιηθεί, σε κάποια φυτά, ότι η βιοσύνθεση συστατικών του αιθέριου ελαίου και φλαβονοειδών εντοπίζεται στα κύτταρα που απαρτίζουν τους αδένες (Duke et al. 2000).

Ανάπτυξη αδενωδών ασπιδοειδών (μακροκέφαλων) τριχών

Το αναπτυξιακό πρότυπο των ασπιδοειδών (ή μακροκέφαλων) αδενωδών τριχών έδειξε ότι κάθε τέτοια τρίχα προκύπτει από ένα αρχικό επιδερμικό κύτταρο, το οποίο είναι ογκωδέστερο από τα γύρω του επιδερμικά κύτταρα. Στο κύτταρο αυτό ο πυρήνας προοδευτικά μεταναστεύει προς τα πάνω, κάτι που οδηγεί σε μια ασύμμετρη διαίρεση με δύο θυγατρικά κύτταρα. Το κάτω κύτταρο είναι το μελλοντικό κύτταρο της βάσης της τρίχας, ενώ το πάνω κύτταρο επαναδιαιρείται δίνοντας άλλα δύο θυγατρικά κύτταρα. Το κάτω κύτταρο είναι το κύτταρο του μίσχου της τρίχας, ενώ το πάνω θολωτό κύτταρο είναι το μητρικό κύτταρο της κεφαλής. Το τελευταίο υφίσταται μια σειρά από διαδοχικές διαιρέσεις διαμορφώνοντας την τελική πολυκύτταρη κεφαλή.

Μόλις ολοκληρωθούν οι κυτταροδιαίρεσεις, αρχίζει η έκκριση του αιθέριου ελαίου. Αυτό συγκεντρώνεται αρχικά σε ένα μικρό υπεφυμενιδικό χώρο, ο οποίος αργότερα γίνεται ογκώδης και μοιάζει με μια μεγάλη κύστη στην κορυφή της τρίχας. Μετά την ολοκλήρωση της εκκριτικής διαδικασίας, η αδενώδης τρίχα αποδιοργανώνεται και νεκρώνεται. (Bosabalidis & Tsekos 1982)

Άλλοι εκκριτικοί σχηματισμοί που παράγουν λιπόφιλα προϊόντα

Τα αδενώδη τριχώματα εμφανίζονται ως τα κύρια σημεία παραγωγής αυτών των ουσιών, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις αυτά έχουν αποδειχτεί ως τα μοναδικά σημεία παραγωγής και συσσώρευσής τους (Duke et al. 2000, Gershenzon et al. 1989, Gershenzon et al. 1992, McCaskill et al. 1992, McCaskill and Croteau 1995, Wagner 1991). Υποστηρίζεται ότι η εξέλιξη των δευτερογενών μεταβολιτών με σκοπό την άμυνα, οδήγησε και στην εξέλιξη των αδενωδών τριχωμάτων για αποφυγή αυτοτοξικότητας. Κάποιος μπορεί να υποθέσει ότι τα

αδενώδη τριχώματα είναι ουσιαστικά το αποτέλεσμα αυτής της εξελικτικής αλληλεπίδρασης μεταξύ χημείας και δομής, σε απόκριση στις περιβαλλοντικές συνθήκες (Duke 1994, Duke et al. 2000).

Άλλες τέτοιες δομές είναι οι εκκριτικές κοιλότητες, οι ρητινοφόροι αγωγοί, οι γαλακτοφόροι σωλήνες κτλ. Αυτές οι ειδικές δομές απομονώνουν τα φυσικά προϊόντα μακριά από μεταβολικές διαδικασίες του φυτού, αποτρέποντας με αυτό τον τρόπο την αυτοτοξικότητα. Οι περισσότερες από αυτού του τύπου τις δομές δεν είναι φωτοσυνθετικές και έτσι στηρίζονται στα διπλανά κύτταρα για άνθρακα και ενέργεια που απαιτούνται για την παραγωγή των τερπενοειδών (Buchanan et al. 2000, Taiz and Zeiger 2002, Wagner 1991).

Λιπόφιλα προϊόντα, κυρίως αιθέρια έλαια παράγονται και από άλλους ελαιοφόρους αδένες εκτός των ελαιοφόρων τριχωμάτων όπως τους ελαιοφόρους αγωγούς, τις ελαιοφόρες κοιλότητες και τα ελαιοφόρα ιδιόβλαστα κύτταρα. Οι *ελαιοφόρες κοιλότητες* εντοπίζονται κυρίως υποδερμικά, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το εξωκάρπιο των εσπεριδοειδών. Είναι σφαιρικές κοιλότητες γεμάτες με αιθέριο έλαιο οι οποίες περιβάλλονται από μερικές στοιβάδες εκκριτικών κυττάρων. Τα *ιδιόβλαστα ελαιοφόρα* κύτταρα αποτελούν πιο απλές δομές και απαντώνται σε ανώτερα και κατώτερα φυτά. Πρόκειται για διάσπαρτα μεμονωμένα κύτταρα μέσα σε ιστούς τα οποία ξεχωρίζουν από τα γειτονικά τους λόγω μεγέθους και ενδοκυτταρικής δομής. Το αιθέριο έλαιο συγκεντρώνεται σε μια χυμοτοπιακή κατασκευή της οποίας ο όγκος μεγαλώνει προοδευτικά.

Οι *ελαιοφόροι αγωγοί* συναντώνται στα φυτά της οικογένειας Apiaceae. Πρόκειται για σωληνοειδείς κατασκευές που διανύουν κατά μήκος ολόκληρο το φυτικό σώμα καταλήγοντας από τη μια στο έλασμα του φύλλου και από την άλλη στον πρωτογενή φλοιό της ρίζας. Η εσωτερική κοιλότητα των αγωγών επενδύεται με ένα αδενικό επιθήλιο, στο οποίο λαμβάνει χώρα η βιοσύνθεση του αιθέριου ελαίου. Το αιθέριο έλαιο μέσα από τα τοιχώματα των επιθηλίων κυττάρων αποβάλλεται στο χώρο της κοιλότητας του αγωγού. Αντίστοιχοι με τους ελαιοφόρους αγωγούς ανατομικά είναι και οι *ρητινοφόροι αγωγοί* των κωνοφόρων.

Τα *οσμοφόρα* είναι αδένες που εντοπίζονται στα άνθη των φυτών και αναδύουν οσμή δυνατή η ασθενή και ευχάριστη ή δυσάρεστη ανάλογα με το είδος. Η οσμή αυτή οφείλεται σε μεγάλο ποσοστό σε πτητικά τερπένια και κατά ένα μικρότερο ποσοστό σε άλλες ενώσεις (αρωματικές, θειούχες, αζωτούχες) και πιθανά ουσίες παρόμοιες με τις φερεμόνες των επικονιαστών. Η παρουσία των οσμοφόρων στα άνθη σχετίζεται με την προσέλκυση διαφόρων βιοτικών επίκονιαστών. (Dressler 1982, Μποζαμπαλίδης, 2008).

1.4.2 Αιθέρια έλαια

Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί διεθνώς περίπου 2000 φυτικά είδη που παράγουν αιθέρια έλαια. Αυτά ανήκουν σε 60 Οικογένειες από τις οποίες οι κυριότερες είναι οι Labiatae (Χειλανθή), Apiaceae (Σκιαδανθή), Asteraceae (Σύνθετα), Lauraceae (Δαφνίδες), Myrtaceae (Μυρτίδες) και Rutaceae (Ρουτίδες).

Τα ποικίλα αρωματικά φυτά έχουν διαφορετικές εδαφοκλιματικές απαιτήσεις. Επίσης διαφέρουν και οι απαιτήσεις τους σε νερό, από τα πλέον απαιτητικά (βασιλικός, μέντα), μέχρι τα πλέον ξηρομορφικά (τσάϊ του βουνού, φασκόμηλο). Τα περισσότερα πάντως είναι προσαρμοσμένα σε ξηροθερμικές συνθήκες, οι οποίες μάλιστα θεωρείται ότι αυξάνουν την παραγωγή των αιθέριων ελαίων και βελτιώνουν την ποιότητά τους. (Μποζαμπαλίδης 2008)

Τα αιθέρια έλαια γενικά, είναι πολυσύνθετα, αρωματικής οσμής μίγματα πτητικών, λιπόφιλων ουσιών, μικρού μοριακού βάρους, που ανήκουν κυρίως στα τερπένια και στα φαινυλοπροπανοειδή αλλά είναι δυνατόν να συνυπάρχουν και ουσίες άλλων τύπων π.χ. περιέχουσες θείο στα σιναπέλαια (Dudareva et al. 2004, Sangwan et al. 2001). Το ιδιαίτερο άρωμα κάθε αιθέριου ελαίου είναι η συνισταμένη όλων των συστατικών του, μερικά από τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στον τελικό του τόνο. Πολλά από τα συστατικά μπορεί να υπάρχουν μόνο σε ίχνη αλλά να συνεισφέρουν πολύ στις οργανοληπτικές ιδιότητες των ελαίων, κάτι που ισχύει συνήθως για τα φαινυλοπροπανοειδή (Sangwan et al. 2001). Η σύσταση αλλά και η ποσότητα, μπορεί να μεταβάλλονται ανάλογα με την εποχή, τις συνθήκες ανάπτυξης και το γενετικό υπόβαθρο του φυτού, τις γεωμετρικές παραμέτρους, την ηλικία του φύλλου (Sangwan et al. 2001). Πέρα από την παρουσία των φαινυλοπροπανοειδών ως συστατικά των αιθερίων ελαίων κάποια μη πτητικά φαινορικά συσσωρεύονται στα αδενώδη τριχώματα, κυρίως άγλυκα φλαβονοειδή

Συχνά η παραγωγή είναι τόσο μικρή ή τα πτητικά εκκρίματα αποβάλλονται προς τα έξω τόσο γρήγορα, ώστε να μη σχηματίζεται μία ιδιαίτερη αποταμίευση αυτών. Έτσι πολλά πέταλα στο κυτόπλασμα των κυττάρων του μεσόφυλλου και της επιδερμίδας τους περιέχουν σταγονίδια αιθέριων ελαίων, τα οποία σε μία δεδομένη θερμοκρασία διαφεύγουν με εξάτμιση προς τα έξω (άρωμα στα τριαντάφυλλα, το μενεξέ, το γιασεμί). Σε ορισμένα όμως είδη πραγματοποιείται μία αποταμίευση από λεπτόρρευστα αιθέρια έλαια σε σχιζογενή ή λυσιγενή δοχεία (Τσέκος 1995). Συνήθως, οι μέθοδοι παραλαβής που χρησιμοποιούνται στην έρευνα και στη βιομηχανία, είναι η απόσταξη, η εκχύλιση και η μηχανική παραλαβή. (Σαρλής 1999)

Τα αιθέρια έλαια ή οι δρόγες που τα περιέχουν χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο κατά ποικίλους τρόπους, όπως στα καλλυντικά και αρώματα, στην οινοποιία, στα ροφήματα, στα διάφορα φαρμακευτικά προϊόντα, στα τρόφιμα (πίτσες, σάλτσες, σαλάτες, τυροκομικά προϊόντα), στη λαϊκή ιατρική, κλπ.. Χρησιμοποιούνται ακόμα ως πηγές αντιοξειδωτικών, καθώς και ως κυτταροστατικά κατά του καρκίνου. Όμως τα φυτά δεν παράγουν τα αιθέρια

έλαια με γνώμονα τη χρήση τους από τον άνθρωπο, αλλά με γνώμονα την επιβίωσή τους στο βιότοπο που αναπτύσσονται. Είναι συνηθισμένο φαινόμενο οι διάφοροι πληθυσμοί να παρουσιάζουν διαφορετικούς χημειότυπους. Η διαφοροποίηση στη χημική σύνθεση μεταξύ των πληθυσμών δεν εξαρτάται μόνο από γενετικούς παράγοντες αλλά και από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. (Μποζαμπαλίδης, 2008)

1.4.3 Πιθανοί ρόλοι των αιθέριων ελαίων για το φυτό.

Πολλά φρύγανα συνθέτουν και απελευθερώνουν στην ατμόσφαιρα αιθέρια έλαια. Με την έκκρισή τους δημιουργούν στο φύλλο μια επικάλυψη που συμβάλλει εκτός των άλλων μηχανισμών, στον περιορισμό της διαπνοής και των απωλειών νερού αυξάνοντας τις αντιστάσεις στη διάχυση των υδρατμών προς την ατμόσφαιρα. Επιπλέον η εξάτμιση των πτητικών μεταβολιτών μπορεί να προκαλεί ψύξη του ελάσματος, καθώς η εύκολη εξάτμιση των πτητικών συστατικών των αιθέριων ελαίων, προκαλεί την πτώση της θερμοκρασίας.

Η σύνθεση και απελευθέρωση πτητικών δευτερογενών μεταβολιτών θα μπορούσε να είναι μια βαλβίδα εκτόνωσης της πλεονάζουσας ενέργειας και κυρίως όταν η ξηρασία και η έντονη ηλιακή ακτινοβολία συνδυάζονται με την αδυναμία μεταφοράς από τη ρίζα λόγω ελάττωσης του διαπνευστικού ρεύματος. Αυτοί οι μεταβολίτες δε συσσωρεύονται ώστε να προκαλούν τοξικότητα. (Margaris 1981, Καραμπουρνιώτης 2003, Καραμπουρνιώτης και Λιακόπουλος 2009).

Διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στη διαδικασία της αναπαραγωγής καθώς και το άρωμα των ανθέων προσελκύει έντομα και ζώα που συμβάλλουν στην αποτελεσματική επικονίαση και στη διασπορά των σπερμάτων.

Δρουν απωθητικά και τοξικά για ορισμένα έντομα και παράσιτα. Τα αιθέρια έλαια έχουν καλά γνωστές απωθητικές ιδιότητες και όταν απαντώνται στις αδενώδεις τρίχες που προβάλλουν έξω από την επιδερμίδα, πιθανόν να λειτουργούν για να «γνωστοποιήσουν» την τοξικότητα του φυτού, απωθώντας τα φυτοφάγα ζώα, προτού πραγματοποιήσουν ένα δοκιμαστικό δάγκωμα. Με τις απωθητικές ή τις τοξικές ιδιότητες που έχουν διώχνουν τα επιβλαβή έντομα ή και τα νεκρώνουν όταν τραφούν με τα φύλλα που περιέχουν τους αδένες με τα αιθέρια έλαια (Werker 1993). Πρόσφατες έρευνες έχουν αποκαλύψει έναν πολύ ενδιαφέροντα ρόλο των πτητικών τερπενίων στην προστασία των φυτών. Κάποια μονοτερπένια και σεσκιτερπένια παράγονται και εκπέμπονται μόνο αφού έχει ήδη ξεκινήσει η προσβολή από έντομα. Αυτά τα συστατικά απωθούν τα φυτοφάγα ενώ παράλληλα προσελκύουν τους φυσικούς “εχθρούς” των εντόμων και έτσι συμβάλλουν στη μείωση της περαιτέρω ζημιάς. Έτσι τα πτητικά τερπένια δεν είναι μόνο αμυντικές ουσίες αλλά

προσφέρουν και τη δυνατότητα στα φυτά να βοηθηθούν από άλλους οργανισμούς (Taiz and Zeiger 2002).

Με την πικρή γεύση που έχουν, απωθούν τα διάφορα φυτοφάγα θηλαστικά, προκαλούν δε συχνά σε αυτά δερματικούς ερεθισμούς και αλλεργικά συμπτώματα. Πολλές φορές, παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση με την οποία προστατεύουν το φυτό από τις προσβολές διαφόρων μυκήτων και βακτηρίων. Έτσι, κατά τους τραυματισμούς των φυτών, οι αδένες εκκρίνουν αιθέρια έλαια τα οποία εμποδίζουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών και συνεπώς προστατεύουν από τη σήψη. (Καραμπουρνιώτης 2003, Μποζαμπαλίδης 2008)

Με τις διάφορες φαινολικές ουσίες που περιέχουν, συμβάλλουν στο να δημιουργηθεί στην επιδερμίδα των φυτικών οργάνων μια ασπίδα που απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία (UV-B) και δεν την αφήνει να εισχωρήσει στους εσωτερικούς ιστούς, όπου μπορεί να προξενήσει βλάβες στον πυρήνα των κυττάρων (γενετικό υλικό) και στους χλωροπλάστες (φωτοσύνθεση). Επίσης, αναστέλλουν την εκκόλαψη των ωών των εντόμων. Με τον πολυμερισμό των συστατικών τους (παρουσία του ατμοσφαιρικού οξυγόνου) αυξάνεται το ιξώδες του και έτσι κολλούν σε αυτά και ακινητοποιούνται τα επιβλαβή έντομα που κινούνται στην επιφάνεια των φύλλων και πεθαίνουν από ασιτία. (Μποζαμπαλίδης 2008)

Παράλληλα παίζουν σημαντικό ρόλο στις σχέσεις των οργανισμών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η ισχυρή αλληλοπαθητική δράση των εκκριμάτων κάποιων φυτών ή των αιθέριων ελαίων τους είτε λόγω της εκπομπής αυτών είτε λόγω των συστατικών της στρωμνής που αποσυντίθεται. Ακόμα, μπορεί να οφείλεται στην ανάπτυξη μικροοργανισμών που αναπτύσσονται κάτω από ορισμένους θάμνους. Επίσης, συχνά παρουσιάζεται το φαινόμενο της αυτοπάθειας, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται νεκρές ζώνες γύρω από ορισμένους θάμνους στα οποία δε βλαστάνουν άλλα φυτά του ίδιου είδους. Αυτό το φαινόμενο σχετίζεται με αυτό της αλληλοπάθειας. Στο πλαίσιο της λεγόμενης αλληλοπάθειας, αναστέλλεται η φύτευση των σπερμάτων άλλων φυτών δημιουργώντας γύρω από το φυτό που τα παράγει ένα μικροπεριβάλλον χωρίς ανταγωνισμό στην πρόσληψη του εδαφικού νερού και των θρεπτικών στοιχείων (Vokou & Margaris 1992).

1.5 Αιθέρια έλαια του *Teucrium polium* L

Η χημική σύσταση του φυτού και ανάλυση των αιθέριων ελαίων *Teucrium polium* L., έχει αποτελέσει το αντικείμενο πολλών ερευνών. Από μια γρήγορη ανασκόπηση στη βιβλιογραφία για το *T. polium*, παρατηρείται ότι περιέχει πληθώρα συστατικών. Η απόδοση του σε αιθέριο έλαιο ποικίλλει από 0,15 έως 1,1% επί ξηρού βάρους και αποτελείται κυρίως από μονοτερπένια και σεσκιτερπένια οξυγονωμένα ή μη.

Έχουν γίνει αρκετές μελέτες για τη χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου του *T. polium* subsp. *capitatum*. Οι Cozzani et al. (2005), πήραν το φυτικό δείγμα τον Οκτώβρη από την Κορσική και παρέλαβαν το αιθέριο έλαιο με υδροαπόσταξη (που διήρκησε 6 ώρες). Η απόδοση σε αιθέριο έλαιο ήταν 0,6%. Ταυτοποιήθηκαν 86 συστατικά (το 92.7% του αιθέριου ελαίου), κυρίως μονοτερπένια (74.7%) και 19 σεσκιτερπένια (5.4%) τα περισσότερα από τα οποία ήταν οξυγονωμένα (αλκοόλες ($n = 26$), κετόνες ($n = 20$), εστέρες ($n = 7$), οξείδια ($n = 7$) και αλδεΐδες ($n = 6$)). Τα κύρια συστατικά ήταν τα α -πινένιο (28.8%), β -πινένιο (7.2%) και p -κυμένιο (7.0%) ενώ άλλα 14 συστατικά κυμαίνονταν σε ποσοστά 5.0–1.0%.

Σε αντίστοιχη έρευνα που έγινε από τους Menichini et al. (2009), εναέρια τμήματα του *T. polium* ssp. *capitatum* συλλέχθηκαν τον Ιούνιο του 2006 στις Γούρνες (Ηράκλειο Κρήτης). Έγινε ξήρανση με αέρα και άλεση των δειγμάτων και ακολούθως υποβλήθηκε σε υδροαπόσταξη για 3 ώρες, σε συσκευή τύπου Clevenger. Απόδοση σε λάδι 0,35% επί ξηρού βάρους. Τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου ήταν καρβακρόλη (10,1%), β -καρυοφυλλένιο (9,8%), torreyol (7,6%) και οξείδιο του καρυοφυλλενίου (5,0%). Το κύριο κλάσμα του αιθέριου ελαίου (55,8%) αποτελούνταν από σεσκιτερπένια (απλά 32,7% και οξυγονωμένα 23,1%). Μεταξύ των 26 σεσκιτερπενίων τα κύρια ήταν β -καρυοφυλλένιο (9,8%), α -χουμουλένιο (3,8%), D-Γερμακρένιο (3,1%), α -αμορφένιο (3,0%) και δ -καδινένιο (2,9%). Στα άλλα κλάσματα τα κύρια ήταν: torreyol (7,6%) και οξείδιο του καρυοφυλλενίου (5,0%). Τα μονοτερπένια συνεισέφεραν κατά 14,8% και ήταν ως επί το πλείστον οξυγονωμένα (13,6%), με κύριους εκπροσώπους τα *cis*-βερμπενόνη (3,7%) και *cis*-βερμπενόλη (2,1%). Οι φαινόλες (11,6%) του αιθέριου ελαίου εκπροσωπήθηκαν σχεδόν εξ ολοκλήρου από καρβακρόλη (10,1%).

Οι Antunes et al. (2004), μελέτησαν τη χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου πέντε διαφορετικών πληθυσμών *T. polium* (L.) ssp. *capitatum* από διάφορα μέρη της Πορτογαλίας. Εναέρια τμήματα του φυτού συλλέχθηκαν τον Ιούνιο κατά την εποχή της άνθισης, το αιθέριο έλαιο λήφθηκε με υδροαπόσταξη (για 3 ώρες) με μέση απόδοση αιθέριου ελαίου 0,15% (v/w). Ταυτοποιήθηκαν 103 συστατικά συνολικά και στα πέντε δείγματα. Σημαντικές διαφορές βρέθηκαν στα κύρια συστατικά των αιθέριων ελαίων. Ένα δείγμα από Rabaçal, Serra do Sicó (1), χαρακτηρίστηκε από υψηλή περιεκτικότητα σε οξυγονωμένα μονοτερπένια (33.0%), με κύριο συστατικό την ισομενθόνη (7.7%). Αυτό το συστατικό όπως και η μενθόλη (2.1%) και η πουλεγόνη (1.4%), δε βρέθηκαν σε κανένα άλλο δείγμα. Ένα άλλο δείγμα που συνέλλεξαν από την ίδια περιοχή (Serra do Sicó 2), αποτελούνταν κυρίως από μη οξυγονωμένα μονοτερπένια και σεσκιτερπένια (43.9% και 23.2%), α -πινένιο (7.7%), σαβινένιο (11.2%) και β -πινένιο (10.3%). Σε αντίθεση με τα αιθέρια έλαια δύο δειγμάτων που συλλέχθηκαν από Portunhos (3 και 4), και το δείγμα από Serra D'Aire (5), που χαρακτηρίστηκαν από υψηλή περιεκτικότητα σε σεσκιτερπένια τόσο σε αλειφατικά (23.0%,

32.2% και 33.2%) όσο και σε οξυγονωμένα (39.7%, 23.4% και 20.4%). Τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου του δείγματος 3 ήταν t-καδινόλη (24.1%) και α-καδινόλη (9.8%)· ενώ του δείγματος 4: δ-καδινένιο (7.5%) και E-β-καρνοφυλλένιο (5.4%). Τέλος, το δείγμα 5: είχε κύρια συστατικά τα δ-καδινένιο (9.8%) και α-μουουρολόλη (6.0%). Η χημική σύσταση του δείγματος 2 μοιάζει πολύ με του *T. polium* (L.) ssp. *capitatum* από την Ισπανία (Sierra Helada) που περιέχει σημαντικές ποσότητες α-πινένιο (11.6%), β-πινένιο (18.1%) και σαβινένιο (13.0%). (Antunes et al. 2004).

Οι Vokou και Bessiere (1984), ανέλυσαν τα αιθέρια έλαια του *T. polium* που συνέλλεξαν από την περιοχή του Υμηττού (ασβεστολιθικά εδάφη 350 μ υψόμετρο) κατά την περίοδο της άνθισης. Το αιθέριο έλαιο παραλήφθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης και με εκχύλιση Et₂O-πεντάνιου. Τα φύλλα και οι ταξιανθίες απομονώθηκαν από τους βλαστούς και αποστάχθηκαν σε συσκευή τύπου Clevenger για 3,5 ώρες με απόδοση 1,1% επί ξηρού βάρους. Η εκχύλιση σε συσκευή Soxhlet με οξικό αιθυλεστέρα απέδωσε 1,2% προϊόντα διαλυτά σε πεντάνιο. Από τα συστατικά που ταυτοποιήθηκαν τα περισσότερα ήταν σεσκιτερπένια και ανάμεσά τους κάποια οξυγονωμένα (κυρίως στο εκχύλισμα). Ωστόσο, ένας σημαντικός αριθμός σεσκιτερπενίων που υπάρχουν στα αιθέρια έλαια που παραλήφθηκαν με υδροαπόσταξη, λείπουν από το εκχύλισμα Et₂O-πεντάνιου, ενώ το αντίθετο ισχύει για πολλά αλειφατικά τερπένια. Από τα 37 συστατικά που ταυτοποιήθηκαν στα αιθέρια έλαια, βρέθηκαν τα κύρια συστατικά του να είναι t-καδινόλη (9,3%), β-καρνοφυλλένιο (7,7%), οξείδιο του καρνοφυλλένιου (5,9%), α-καδινόλη (5,4%), χουμουλένιο (3,7%), trans-βερμπενόλη (3%) & γ-καδινένιο (3%). Τα υπόλοιπα συστατικά ήταν κάτω από 3%. Από τα 35 συστατικά που ταυτοποιήθηκαν στο εκχύλισμα Et₂O-πεντάνιου τα κύρια συστατικά του ήταν t-καδινόλη (10,8%), οξείδιο του καρνοφυλλένιου (9,0%), α-καδινόλη (7,8%) & undecane (7,5%). Τα υπόλοιπα συστατικά ήταν κάτω του 3,5%.

Ο Chizzola (2006) ανέλυσε με αέρια χρωματογραφία τα εκχυλίσματα (σε οξικό αιθυλεστέρα) φύλλων και ταξιανθιών *T. polium* από διάφορες περιοχές της νότιας Γαλλίας σε πλήρη άνθιση. Καταλήγει στο συμπέρασμα ότι τα εκχυλίσματα των ταξιανθιών και των φύλλων μοιάζουν σε κάθε περίπτωση ενώ ομαδοποιεί σε δύο κατηγορίες τα φυτά από τις διάφορες περιοχές συλλογής, αναλόγως των πτητικών συστατικών που κυριαρχούν. Έτσι στην πρώτη κυριαρχεί το D-γερμακρένιο και ακολουθούν τα β-πινένιο και α-πινένιο, ενώ στη δεύτερη κυριαρχούν τα σαβινένιο και β-πινένιο και ακολουθούν τα D-Γερμακρένιο και β-καρνοφυλλένιο σε περίπου ίσες ποσότητες. Τα μονοτερπένια μυρκένιο και λεμονένιο υπάρχουν σε όλες τις περιπτώσεις, όπως επίσης τα σεσκιτερπένια β-βουρμπουρένιο, δικυκλογερμακρένιο, δ-καδινένιο σε μικρές ποσότητες.

Μερικές εργασίες εξετάζουν τα αιθέρια έλαια του *T. polium* στις οποίες δεν αναφέρεται το υποείδος. Οι Kovasevic et al. (2001) σε φυτά από τα βαλκάνια βρήκαν ως κύρια συστατικά

τα β-πινένιο (19,8%) και D-γερμακρένιο (11,9%) και ακολουθούσαν τα: λεμονένιο, t-αμπεργαμοτένιο, σπαθουλενόλη και δικυκλογερμακρένιο και είχε απόδοση μικρότερη από 0,1%.

Ο Moghtahter (2009), ανέλυσε τα αιθέρια έλαια του *T. polium* στο Ιράν κατά την άνθιση που παρέλαβε με απόδοση σε αιθέρια έλαια 0,75%. Τα κυριότερα συστατικά του αιθέριου ελαίου ήταν τα α-πινένιο (12.5%), λιναλοόλη (10.6%), οξείδιο του καρυοφυλλένιου (9.7%), β-πινένιο (7.1%) & β-καρυοφυλλένιο (7%). Οι Hassan et al.(1978), στη Σαουδική Αραβία ανέλυσαν τα αιθέρια έλαια (αναφέρουν απόδοση 1,55gr/kg), κατέληξαν ότι αποτελείται από δέκα κύρια συστατικά, και ταυτοποίησαν τα β-πινένιο, λεμονένιο, α-φελλανδρένιο, λιναλοόλη, τερπινεν-4-όλη, γ-καδινένιο, δ-καδινένιο, γκουαϊόλη και κεδρόλη.

Τα αιθέρια έλαια των *T. polium* var. *album* (I) από το Sinaί στην Αίγυπτο, και *T. polium* var *pilosum* (II) από το Qatar κατά το τέλος του φθινοπώρου (Νοέμβρη), με απόδοση 0.4% και για τα δύο δείγματα, αναλύθηκαν με GC-MS. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα σесκιτερπένια συνιστούσαν το μεγαλύτερο μέρος των αιθέριων ελαίων [78.61% (I), 92.07% (II)]. Οι σесκιτερπενικές αλκοόλες ήταν το πιο άφθονο συστατικό και αντιπροσώπευε το 58.56% και 40.32% των ελαίων (I) και (II) αντίστοιχα. Και σημείωσαν ποιοτικές και ποσοτικές αλλαγές ανάμεσα στα δύο έλαια της κάθε περιοχής.

Τα κύρια συστατικά ήταν για το (I) πατσουλι-αλκοόλη (33.34%) και 10-καδινόλη (8.98%), και από μονοτερπένια κυριαρχούσαν τα α- και β-πινένιο (I) (4.09% και 4.90% αντίστοιχα), ενώ για το δεύτερο, (II), 13-ευδεσμόλη (19.1%) και σπαθουλενόλη (11.59%).

1.6 Ανατομικά χαρακτηριστικά του *Teucrium polium*

Το *Teucrium polium*, είναι αειθαλής ξηρομορφικός ημίθαμνος, με μικρά, στενά ελλειπτικά φύλλα (Lakusic et al. 2010). Το εξωτερικό χαρακτηριστικό του *T. polium* όπως φαίνεται με το οπτικό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, είναι το πλούσιο τρίχωμα (indumentum) που αποτελείται από πολυάριθμες μη αδενώδεις και αδενώδεις τρίχες. Εκτός από τα φύλλα, ο κάλυκας και η στεφάνη του άνθους, καλύπτονται από ένα πολύ πυκνό τρίχωμα. Τα φύλλα παρουσιάζουν τη χαρακτηριστική συστροφή του τομέα *Polium* (Antunes et al. 2004, Christodoulakis et al. 2010).

Το *T. polium* χαρακτηρίζεται από κυκλικό βλαστό και στερείται των διακριτών κολλεγχυματικών ιστών που δίνουν το τετραγωνικό σχήμα στους βλαστούς των Lamiaceae. Η επιφάνεια του βλαστού παρουσιάζει πανομοιότυπα τριχώματα με τα φύλλα και σχεδόν όλα παρουσιάζουν δυο τρεις στρώσεις υποδερμίδας. Το περικύκλιο σχηματίζεται από δέσμες σκληρεγχυματικών στοιχείων και μικρές ομάδες παρεγχυματικών κυττάρων. Τα αγγειώδη

στοιχεία του βρίσκονται σε ομόκεντρους κύκλους. Το κέντρο του στελέχους καλύπτεται με εντεριώνη (Lakusic et al. 2010).

Στην περίπτωση του *T. polium* ένα ευδιάκριτο τρίχωμα (indumentum) «δύο στρώσεων» καλύπτει και τις δύο πλευρές των φύλλων. Το πρώτο στρώμα κοντά στην επιφάνεια της επιδερμίδας σχηματίζεται από αδενώδη τριχίδια. Ανάμεσα τους βρίσκονται διάσπαρτα τα μη αδενώδη τριχίδια τα οποία τα ξεπερνούν. Είναι μακριά, πολυκύτταρα, δένδρως τριχίδια και σχηματίζουν ένα παχύ χνούδι που καλύπτει τα φύλλα και σχηματίζουν το δεύτερο στρώμα του τριχώματος. Καθένα από τα κύτταρα που συνθέτουν το προστατευτικό τρίχωμα έχει ένα αξονικό μέρος και μία ή - συχνότερα - δύο μεγάλες, αγκαθωτές προβολές και στις δύο πλευρές. Αυτά τα κύτταρα συνδέονται το ένα με το άλλο, δημιουργώντας μια ενιαία, επιμηκυμένη συσκευή προστασίας (Lakusic et al. 2010, Christodoulakis et al. 2010).

Οι ασπιδοειδείς ελαιοφόρες τρίχες (peltate) φαίνονται να είναι λιγότερες από τις κεφαλοειδείς (capitate), και βρίσκονται κυρίως στην αποαξονική πλευρά του φύλλου. Οι ασπιδοειδείς τρίχες διαθέτουν ένα κύτταρο βάσης, ένα κύτταρο μίσχου και πολυκύτταρη κεφαλή. Το εκκρινόμενο υλικό συσσωρεύεται μεταξύ των κορυφαίων κυτταρικών τοιχωμάτων των εκκριτικών κυττάρων και την εφυμένίδα. Οι περισσότερες από τις ασπιδοειδείς τρίχες στην άνω επιφάνεια περιέχουν μια έκκριση που εμφανίζεται ημιδιαφανής, ενώ οι τρίχες στην κάτω επιφάνεια συσσωρεύουν κάποια αδιαφανή, καφετί ουσία (Christodoulakis et al. 2010). Οι κεφαλοειδείς αδένες κατανέμονται ομοιόμορφα και στις δύο επιφάνειες του φύλλου και κάθε αδενώδης τρίχα αποτελείται από ένα κύτταρο βάσης, δύο κύτταρα μίσχου και ένα κύτταρο κεφαλής που έχει σφαιρικό σχήμα. Σε αυτά τα τριχώματα, οι εκκρίσεις αποθηκεύονται μεταξύ της κορυφής του κυτταρικού τοιχώματος του κυττάρου της κεφαλής και της “ανασηκωμένης” επιδερμίδας. Η αποθήκευση ξεκινάει καθώς σχηματίζεται ένας μικρός θόλος στο ανώτερο μέρος του κυττάρου της κεφαλής (Christodoulakis et al. 2010, Antunes et al. 2004).

Τα τριχώματα της αποαξονικής πλευράς του κάλυκα είναι πανομοιότυπα με των φύλλων. Η αποαξονική επιφάνεια της στεφάνης έχει κυρίως ασπιδοειδείς αδένες οι οποίοι θεωρείται ότι παράγουν και την περισσότερη ποσότητα αιθέριου ελαίου. Οι Antunes et al. (2004), λόγω του ότι δεν παρατήρησαν κάποια ρωγμή στην επιδερμίδα υποθέτουν την ύπαρξη κάποιου μικροπόρου. (Antunes et al. 2004)

Η ανατομία του ελάσματος του φύλλου είναι αρκετά απλή. Τα επιδερμικά κύτταρα της προαξονικής πλευράς διαθέτουν παχύ κυτταρικό τοίχωμα. Κάτω από την άνω επιδερμίδα βρίσκεται μονόστρωμο χαλαρό πασσαλώδες παρέγχυμα. Το σπογγώδες παρέγχυμα καταλαμβάνει περίπου το μισό πάχος του μεσόφυλλου και τα περισσότερα από τα κύτταρα του μεσόφυλλου φαίνεται να συσσωρεύουν μεγάλα σταγονίδια. (Christodoulakis et al. 2010)

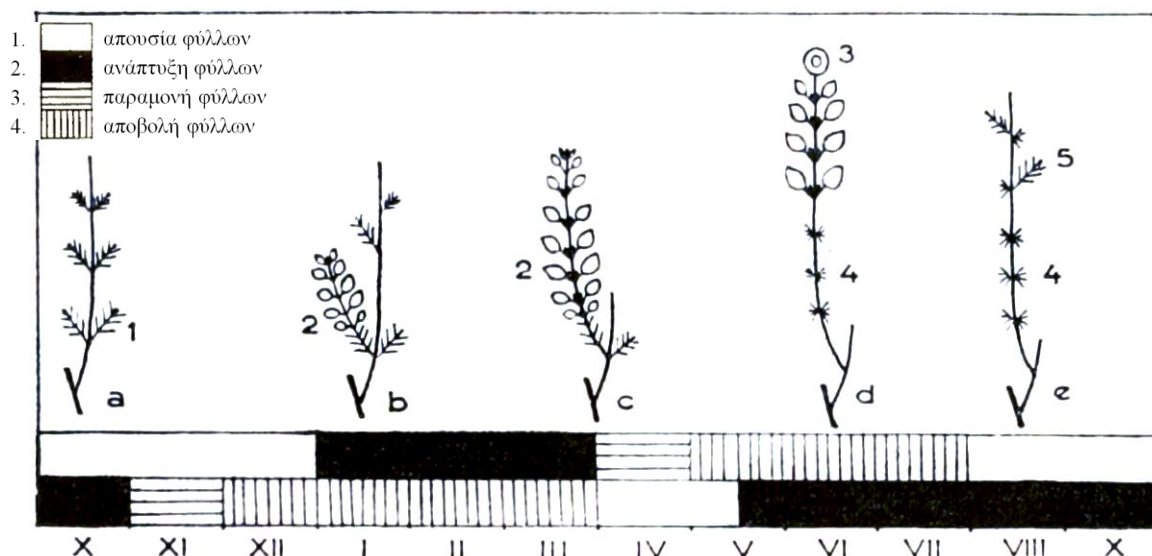
Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του φύλλου είναι η παρουσία των πολυάριθμων ωοειδούς ή- κυρίως -σφαιρικού σχήματος κοιλοτήτων που υπάρχουν στη μέση του μεσόφυλλου.

Μερικές φορές, φαίνεται να συγχωνεύονται και να δημιουργούν μεγαλύτερου, σχήματος οβάλ ενδοκυτταρικούς σχηματισμούς συνήθως πιο κοντά στις παρυφές των φύλλων. Αυτές οι κοιλότητες είναι πάντοτε στενά συνδεδεμένες με τα στοιχεία του ξύλου του αγγειωδών δεσμίδων. Κάθε κοιλότητα βρίσκεται στο επάνω μέρος μια αγγειώδης δεσμίδας, και συνδέεται με το κορυφαίο στοιχείο του ξύλου. (Christodoulakis et al. 2010)

Κατά τους Lakusic et al. 2010, η εφυμενίδα του *T. polium* παρουσιάζει ποικιλομορφία στο ανάγλυφο της εφυμενίδας της και άλλοτε έχει ρηχές πτυχώσεις ή πιο βαθιές και σε κάποιους πληθυσμούς που ευδοκιμούν σε άγονες περιοχές, δε σχηματίζεται καθόλου.

Ένας βραχυβλάστης μπορεί να παραμείνει κοντός για αρκετό διάστημα και ύστερα να επιμηκυνθεί και να γίνει δολιχοβλάστης. Αυτοί οι βραχυβλάστες ονομάζονται παροδικοί βραχυβλάστες. Σε άλλα φυτά οι βραχυβλάστες και οι δολιχοβλάστες μπορεί να αναπτύσσονται από διαφορετικούς οφθαλμούς και αυτοί ονομάζονται μόνιμοι βραχυβλάστες. Οι βραχυβλάστες κατατάσσονται ανάλογα με το βαθμό επιμήκυνσης σε απόλυτους βραχυβλάστες που δεν αυξάνονται καθόλου και παραμένουν σαν μικρή ροζέτα και σε μερικούς βραχυβλάστες που παρουσιάζουν έστω και μια περιορισμένη επιμήκυνση. Οι επιμηκύνσεις γενικά γίνονται την άνοιξη όπου υπάρχουν καλές συνθήκες τόσο από άποψη θερμοκρασιών όσο και διάθεσης νερού.

Οι δολιχοβλάστες του *T. polium* ξεκινάνε να επιμηκύνονται τον Γενάρη από βραχυβλάστες που αναπτύχθηκαν την προηγούμενη άνοιξη. Μεταξύ του Μαρτίου και του Απριλίου η ανάπτυξή τους αυξάνει ώσπου να φτάσουν στο μέγιστο ύψος τους. Στην κορυφή των βλαστών αυτών, αναπτύσσονται οι ταξιανθίες τον Ιούνιο και οι καρποί ωριμάζουν τον Αύγουστο. Αυτοί οι δολιχοβλάστες δίνουν μεγάλα φύλλα τα οποία σταδιακά πέφτουν από τα τέλη Απριλίου ως τον Ιούνιο. Από τους οφθαλμούς στις μασχάλες αυτών των φύλλων βγαίνουν μικρά φύλλα σαν σμίκρυνση καλοκαιρινών φύλλων. Αυτοί οι μερικοί βραχυβλάστες, επιμηκύνονται αργά καθόλη τη διάρκεια του καλοκαιριού. Κάποιοι από τους κατώτερους -κυρίως- θα επιμηκυνθούν και θα αποτελέσουν τους δολιχοβλάστες του επόμενου χειμώνα. (Orshan 1961)



Εικόνα 2: Η ανάπτυξη του *Teucrium polium* κατά τον Orshan 1961 στο Ισραήλ.

Η πρώτη γραμμή αφορά τα χειμωνιατικά φύλλα ενώ η δεύτερη τα καλοκαιρινά. Με λατινικούς χαρακτήρες σημειώνονται οι μήνες.

(a) Στο κατώτερο τμήμα ενός δολιχοβλάστη, ο οποίος έχει αναπτυχθεί από την προηγούμενη άνοιξη, διακρίνονται μικροί βραχυβλάστες περιορισμένης ανάπτυξης.

(b & c) Ένας από αυτούς τους βραχυβλάστες αναπτύσσεται σε κάθε βλαστό και εξελίσσεται σε νέο δολιχοβλάστη που «δίνει χειμωνιάτικα φύλλα».

(d) Ο δολιχοβλάστης ολοκληρώνει την ανάπτυξή του, φτάνοντας το ανώτατο ύψος του όπου και αναπτύσσεται η ταξιανθία (3). Τα παλιά χειμωνιάτικα φύλλα έχουν ήδη πέσει και νέοι βραχυβλάστες (4) αναπτύσσονται στις μασχάλες αυτών.

(e) Όλα τα χειμωνιάτικα φύλλα έχουν πέσει. Οι ανώτεροι βραχυβλάστες παρουσιάζουν μικρή επιμήκυνση.

Σκοπός της εργασίας

Υπάρχουν πολλά διαθέσιμα δεδομένα για τις φαρμακευτικές ιδιότητες, τα αιθέρια έλαια, και τις βιολογικές δράσεις του *Teucrium polium*. Ορισμένα ανατομικά στοιχεία, μάλλον ανεπαρκή, είναι διαθέσιμα για τα ανατομικά χαρακτηριστικά και την εκκριτική δραστηριότητα των φύλλων του *T. polium*. Ο σκοπός της εργασίας είναι να παρατηρηθεί ο βιολογικός κύκλος του φυτού, να μελετηθεί η ανατομία του φύλλου του *T. polium* διεξοδικά και να σημειωθεί το αν εμφανίζονται μορφολογικές, ανατομικές και ιστοχημικές διαφορές στα φύλλα κατά τη διάρκεια του έτους. Παράλληλα, μελετάται η σύνθεση των αιθέριων ελαίων του φυτού στο χαρακτηριστικό στάδιο της άνθισης και συγκρίνονται τα αιθέρια έλαια των φύλλων και των ταξιανθιών.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ-ΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

1.1.1.Συλλογή υλικού

Για την παρατήρηση με τα διάφορα είδη μικροσκοπίας, εναέρια τμήματα αυτοφυών φυτών *Teucrium polium* συλλέχθηκαν από τον Βοτανικό Κήπο του Διομήδους στην περιοχή του Χαϊδαρίου. Η συλλογή έγινε σε διαφορετικές εποχές κατά τη διάρκεια του έτους, σε χαρακτηριστικά βλαστικά στάδια του φυτού. Σε κάθε περίπτωση, μετά τη συλλογή, το φυτικό υλικό μεταφέρονταν στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, και δέχονταν άμεσα τους κατάλληλους χειρισμούς για την παρατήρηση με τα διάφορα είδη μικροσκοπίας.

2.1.1 Προετοιμασία παρασκευασμάτων για παρατήρηση ημίλεπτων τομών με το οπτικό μικροσκόπιο(O.M) και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (H.M.Δ)

Τα στάδια της διαδικασίας που ακολουθήθηκε είναι:

- i. **Φυτικοί ιστοί** μεγέθους 2x3 mm κόπηκαν από το μέσον του φύλλου με ξυραφάκι. Η διαδικασία αυτή έγινε μέσα σε τρυβλίο με μονιμοποιητικό στους 4 °C.
- ii. **Μονιμοποίηση** (στερέωση, καθήλωση, προσήλωση, fixation) με εμβάπτιση των δειγμάτων, σε μονιμοποιητικό διάλυμα Karnovsky¹, χρησιμοποιώντας ως ρυθμιστικό διάλυμα Κακοδυλικό Νάτριο² (Serva 15540, C₂H₆AsO₂Na.3H₂O) 0,1M, Ph=7,2, σε φιαλίδιο των 5 ml για 24 h στους 4°C. Ύστερα από παραμονή 1 ώρας στο μονιμοποιητικό διάλυμα, έγινε κενό στο φιαλίδιο, για να αφαιρεθεί ο αέρας από τους μεσοκυττάριους χώρους και να διευκολυνθεί η διάχυση-διείσδυση του μονιμοποιητικού στο εσωτερικό των δειγμάτων.
- iii. **Έκπλυση** με ρυθμιστικό διάλυμα 3 φορές από 15 min κάθε φορά.
- iv. **Μεταστερέωση** με OsO₄ 0,1% σε νερό για 18h.
- v. **Έκπλυση** με ρυθμιστικό διάλυμα 3 φορές από 15 min κάθε φορά.
- vi. **Αφυδάτωση** με αιθυλική αλκοόλη 30%, 50%, από 15min. Κατά το στάδιο αυτό, γίνεται αντικατάσταση του νερού του μονιμοποιημένου δείγματος με αιθυλική αλκοόλη.
- vii. **Αφυδάτωση** με 1% οξικό ουρανύλιο σε αιθυλική αλκοόλη 70%, όπου τα δείγματα παρέμειναν όλη τη νύχτα για χρώση en block.
- viii. **Αφυδάτωση** με αιθυλική αλκοόλη 90%, για 15min και 100% 3 φορές από 1h.

- ix. **Αλλαγή διαλύτη** από αιθυλική αλκοόλη σε **προπυλενοξείδιο** για 1h. Χρησιμοποιείται ως ενδιάμεσος διαλύτης μεταξύ της αιθυλικής αλκοόλης και των εποξικών ρητινών που θα χρησιμοποιηθούν στο επόμενο στάδιο.
- x. **Εμποτισμό με ρητίνη.** Στο φιαλίδιο προστίθεται ρητίνη Spru³ και προπυλενοξείδιο σε ίσες ποσότητες, και αφήνεται στον απαγωγό, ανοικτό, υπό συνεχή ανάδευση για 18h, ώστε να εξατμιστεί το προπυλενοξείδιο και να μείνουν τα δείγματα σε ρητίνη 100%. Επειδή το δείγμα αρχικά δεν εμποτιζόταν σωστά με ρητίνη, εφαρμόστηκε η εξής διαδικασία. Στο στάδιο αυτό έγινε αλλαγή στη ρητίνη, και θερμάνθηκε στον κλίβανο, στους 45⁰ C, για 10 λεπτά, ώστε να γίνει πιο λεπτόρρευστη και έπειτα εφαρμόστηκε κενό ώστε να διευκολυνθεί η διάχυση της ρητίνης στο εσωτερικό των ιστών.
- xi. **Έγκλειση** των δειγμάτων σε εποξική ρητίνη σε καλούπια σιλικόνης και πολυμερισμός στον κλίβανο, στους 68⁰ C για 48-72h.

2.1.2 Προετοιμασία παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (H.M.Σ.)

Ένα παρασκεύασμα για να παρατηρηθεί με το H.M.Σ. πρέπει να είναι αφυδατωμένο, καλός αγωγός του ηλεκτρισμού και να αντέχει σε υψηλό κενό.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- i. **Φυτικοί ιστοί** μεγέθους 5x5mm περίπου, κόπηκαν από το μέσον του φύλλου με ξυραφάκι. Η διαδικασία αυτή έγινε μέσα σε τρυβλίο με μονιμοποιητικό στους 4 °C. Για ορισμένα δείγματα το τελικό μέγεθος καθορίστηκε μετά την ξήρανση. Τα πολύ νεαρά φύλλα μερικές φορές χρησιμοποιήθηκαν ολόκληρα.
- ii. **Μονιμοποίηση – Στερέωση** με γλουταρική αλδεϋδη 3% σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M (Sörensen)⁴ με pH=7,2, σε φιαλίδιο των 5 ml για 24h στους 4°C. Ύστερα από παραμονή 1 ώρας στο μονιμοποιητικό διάλυμα, έγινε κενό στο φιαλίδιο, για να αφαιρεθεί ο αέρας από τους μεσοκυττάριους χώρους και να διευκολυνθεί η διάχυση-διείσδυση του μονιμοποιητικού στο εσωτερικό των δειγμάτων.
- iii. **Έκπλυση των δειγμάτων** με ρυθμιστικό διάλυμα 3 φορές, από 30 min.
- iv. **Σταδιακή αφυδάτωση** με σειρά ανιούσης συγκέντρωσης ακετόνης 30%, 50%, 70%, 90%, για 30 min και 100%, 3 φορές από 1 h. Στο τελευταίο διάλυμα ακετόνης, τα δείγματα παρέμειναν για 24h. Όλα τα διαλύματα παρασκευάστηκαν από καθαρή ακετόνη.
- v. **Ξήρανση** στη συσκευή κρίσιμου σημείου (Critical Point Dryer, POLARON 3000). Στη συσκευή αυτή γίνεται αντικατάσταση της ακετόνης με υγρό CO₂, το οποίο στη συνέχεια απομακρύνεται, αφού μετατρέπεται σε αέριο αδιαβατικά (κρίσιμο σημείο).

- vi. **Επικόλληση των δειγμάτων** σε υποδοχείς (stubs) είτε με αυτοκόλλητους δίσκους άνθρακα διπλής όψης (Agar Scientific Ltd.), είτε με κόλλα τύπου UHU.
- vii. **Επικάλυψη των δειγμάτων** με καθαρό χρυσό, με εκκένωση αίγλης σε ατμόσφαιρα αργού (Ar). Η διαδικασία έγινε σε εξαχνωτή Denton - Vacuum DV - 502 εφοδιασμένο με τα κατάλληλα εξαρτήματα.

Μετά από τις παραπάνω διαδικασίες, τα παρασκευάσματα ήταν πλέον έτοιμα για παρατήρηση στο Η.Μ.Σ.. Η φύλαξή τους έπρεπε να γίνεται προσεκτικά σε κλειστά κουτιά, προστατευόμενα από σκόνες και υγρασία.

1. Μονιμοποιητικό Διάλυμα Karnovsky:

2 g παραφορμαλδεϋδης διαλύονται σε 25 mL νερό, στους 60-70 °C με ανάδευση. Προστίθεται 1N NaOH σταγόνα-σταγόνα με συνεχή ανάδευση μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Όταν κρυώσει το διάλυμα, προστίθενται 10 mL γλουταρικής αλδεϋδης 25% και συμπληρώνεται το διάλυμα μέχρι τα 50 mL με κακοδυλικό ρυθμιστικό διάλυμα. Το τελικό pH είναι 7,2.

2. Ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού νατρίου (sodium cacodylate) (0,1 M):

3,15 g sodium cacodylate διαλύονται σε 100 mL απεσταγμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται στο 7,2-7,4 με HCl 1N. Διατηρείται στους 4 °C για μερικές ημέρες.

3. Συστατικά Ρητίνης Spurr:

10 g ERL, 7 g DER, 26 g NSA και 0,4 g S-1 (πολυμεριστής). Ανάδευση για αρκετή ώρα των παραπάνω συστατικών σε μαγνητικό αναδευτήρα.

4. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M (Sörensen):

Διάλυμα stock A: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35,61 g/L

Διάλυμα stock B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 27,60 g/L Τα διαλύματα A και B μπορούν να διατηρηθούν στους 4°C για μερικές εβδομάδες. Για ρυθμιστικό διάλυμα με pH 7,2, 36 mL από το A ανακατεύονται με 14 mL από το B.

2.1.3 Τμήση τομών και χρώση μονιμοποιημένων παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το Οπτικό Μικροσκόπιο (Ο.Μ.) και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (Η.Μ.Δ)

Οπτικό Μικροσκόπιο (Ο.Μ.)

Η τμήση των τομών έγινε με τον υπερμικροτόμο, τύπου REICHERT OMU-III. Για το οπτικό μικροσκόπιο, κόβονται ημίλεπτες τομές πάχους 1,5-2 μm , με γυάλινα μαχαίρια, τα οποία κατασκευάζονται πριν τη χρήση στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας με την ειδική συσκευή (knife-maker της εταιρίας Reicher-Taab). Στη συνέχεια οι τομές τοποθετούνται σε σταγόνα απεσταγμένου νερού πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες, καλυμμένες με ζελατίνα⁵ (Grimstone & Skaer, 1972), ώστε οι τομές να απλώνονται και να επικολλώνονται καλύτερα πάνω στην αντικειμενοφόρο.

Χρώση με κυανούν της τολουιδίνης

Η αντικειμενοφόρος με τις τομές, τοποθετήθηκε στη συνέχεια, σε θερμαινόμενη πλάκα στους 70-80 °C και μόλις εξατμιστεί η σταγόνα νερού, γίνεται χρώση των τομών με κυανούν της τολουιδίνης 0.5% σε βόρακα 1%.

Ακολουθεί έκπλυση με απεσταγμένο νερό και στέγνωμα της αντικειμενοφόρου σε θερμαινόμενη πλάκα. Τέλος γίνεται η επικόλληση της καλυπτρίδας χρησιμοποιώντας είτε μία σταγόνα από την ίδια την εποξική ρητίνη, είτε με Eukitt (Agar Scientific Ltd.), προκειμένου να μονιμοποιηθούν οι τομές.

Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (Η.Μ.Δ)

Τα μονιμοποιημένα δείγματα, τα οποία έχουν προετοιμαστεί και τα οποία είναι εγκλεισμένα σε εποξική ρητίνη, κόβονται σε υπέρλεπτες τομές, πάχους περίπου 60-80 nm, με υπερμικροτόμο τύπου REICHERT OMU-III, με γυάλινα μαχαίρια, τα οποία κατασκευάζονται πριν τη χρήση με την ειδική συσκευή (knife maker της εταιρείας Reichert-Taab).

Στην περίπτωση αυτή, στα μαχαίρια τοποθετείται ειδική αυτοκόλλητη ταινία (Silver tape της εταιρείας 3M), η οποία στεγανοποιείται με οδοντιατρικό κερί για να σχηματιστεί ένα μικρό δοχείο, το οποίο γεμίζεται με απεσταγμένο νερό, έτσι ώστε οι τομές που κόβονται να επιπλέουν στην ελεύθερη επιφάνεια του νερού, από όπου και συλλέγονται. Με τον τρόπο αυτόν είναι εύκολο να γίνει και μια εκτίμηση του πάχους των τομών, λόγω του φαινομένου της συμβολής του φωτός, εξαιτίας του οποίου οι τομές έχουν διαφορετικό χρώμα ανάλογα με το πάχος τους. Οι τομές με πάχος 60-80 nm, που είναι και οι πλέον κατάλληλες για παρατήρηση στο Η.Μ.Δ. εμφανίζουν χρώμα ασημί. Οι διαδοχικές τομές, σχηματίζουν μια ταινία πάνω στο νερό, η οποία στη συνέχεια συλλέγεται πάνω σε ειδικά πλέγματα χαλκού (grids) διαμέτρου 3mm και τύπου ATHENA, hexagonal G75. Τα πλέγματα έχουν

προηγουμένως επικαλυφθεί με λεπτή μεμβράνη πυροξυλίνης 2% σε οξικό αμυλεστέρα (Φασσέας, 1999).

Διπλή Χρώση Reynolds

Την τοποθέτηση των τομών πάνω στα grids, ακολουθεί η διπλή χρώση Reynolds, με οξικό ουρανύλιο 1% σε υδατικό διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης 50% και κιτρικού μολύβδου⁶. Η διαδικασία η οποία ακολουθείται είναι η εξής:

Σταγόνες χρωστικής (40-50 μL) τοποθετούνται πάνω σε τρυβλία Petri, επιστρωμένα με σιλικόνη (Silastic της Dow Corning).

Για το οξικό ουρανύλιο, τα grids επιπλεύσθηκαν ένα ανά σταγόνα χρωστικής στο σκοτάδι για 45 min, ενώ για τον κιτρικό μολύβδο τα grids επιπλεύσθηκαν ένα ανά σταγόνα χρωστικής για 15 min. Για τη χρώση με κιτρικό μολύβδο, στο τρυβλίο τοποθετούνται επίσης κρύσταλλοι NaOH, για την απορρόφηση του CO_2 και την αποφυγή κρυστάλλων ανθρακικού μολύβδου.

Τα grids ξεπλένονται με 20-30 σταγόνες απεσταγμένου νερού. Αυτό γίνεται δύο φορές, μία πριν τη μεταφορά στον κιτρικό μολύβδο και μία στο τέλος.

Τα grids τοποθετούνται πάνω σε διηθητικό χαρτί με τις τομές προς τα πάνω, για να στεγνώσουν. Τα δείγματα είναι πλέον έτοιμα για παρατήρηση.

1. Επικάλυψη αντικειμενοφόρων με ζελατίνα (Grimstone and Skaer 1972)

1 g ζελατίνης / 1 L χλιαρού απεσταγμένου νερού στο οποίο προστίθεται 0,1 g $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Σχολαστικά πλυμένες και στεγνωμένες αντικειμενοφόροι, εμβαπτίζονται στο διάλυμα όταν αυτό κρυσταλλώσει και αφήνονται να στεγνώσουν σε κατακόρυφη θέση, σε χώρο χωρίς σκόνη.

2. Κιτρικός Μολύβδος

0,2 g NaOH διαλύονται σε 50 mL απεσταγμένου νερού, όπου και διαλύονται 0,25 g κιτρικός μολύβδος.

2.1.4 Προετοιμασία νωπών παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το Οπτικό Μικροσκόπιο (Ο.Μ.)

Η κοπή των τομών για απλή παρατήρηση με το οπτικό μικροσκόπιο, και τις ιστοχημικές δοκιμές έγινε σε ψυκτικό μικροτόμο (κρυοτόμο) τύπου Leica CM1850 (Germany).

Για το σκοπό αυτό τμήματα φύλλων τοποθετούνται στον ειδικό δειγματοφορέα μέσα σε ειδικό υγρό ψύξης JUNG (Leica, Germany) κατάλληλο για τον κρυοτόμο, ώστε να συγκρατεί τους ιστούς κατά την κοπή.

Εφ'όσον το μονιμοποιητικό υλικό και οι ιστοί παγώσουν στους -15°C κόβονται τομές από τα φύλλα, πάχους 15 - 20 μm και συλλέγονται σε απεσταγμένο νερό όπου και ξεπλένονται από το ειδικό υγρό ψύξης.

Οι τομές είναι πλέον έτοιμες για την εφαρμογή ιστοχημικών μεθόδων ή την απευθείας παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο, στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Μικροσκοπία Φθορισμού

Το οπτικό μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε για όλες τις παρατηρήσεις και τη φωτογράφιση (OLYMPUS Bx40) του Εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας είναι εφοδιασμένο με τα κατάλληλα εξαρτήματα. Τα φίλτρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- i. φίλτρο διέγερσης BP 330-385, που επιτρέπει τη διέλευση ακτινοβολιών μεταξύ 330 και 385 nm και
- ii. φίλτρο φραγμού BA 420, που απορροφά όλα τα μήκη κύματος κάτω από 420 nm.

Οι τομές τοποθετούνται σε σταγόνα νερού (αυτοφθορισμός) ή σε επαγωγέα φθορισμού (AlCl_3) και παρατηρούνται άμεσα.

Αυτοφθορισμός

Ο αυτοφθορισμός των διαφόρων συστατικών αναγνωρίστηκε βάση των χρωμάτων που αναφέρονται από τον Rost (1992), για φυτικούς ιστούς. Τα χρώματα αυτά, όταν ο ιστός φωτιστεί με υπεριώδη ακτινοβολία (330-385 nm) είναι τα εξής:

- Κυτταρίνη $\rightarrow$ δε φθορίζει
- Λιγνίνη $\rightarrow$ φωτεινό γαλάζιο
- Χλωροφύλλη $\rightarrow$ κόκκινο
- Σουμπερίνη $\rightarrow$ γαλάζιο
- Κουτίνη $\rightarrow$ γκρι
- Φαινολικά οξέα $\rightarrow$ κίτρινο

Τριγλωριούχο αργίλιο ($AlCl_3$)

Το διάλυμα τριγλωριούχου αργιλίου ($AlCl_3$ 5% σε νερό) χρησιμοποιείται στον εντοπισμό φλαβονοειδών με το μικροσκόπιο φθορισμού. Ο φθορισμός που προκύπτει, όταν ο ιστός φωτιστεί με υπεριώδη ακτινοβολία (330-385 nm) είναι ως εξής:

- φλαβόνες (flavones), πρασινοκίτρινος
- φλαβονόλες (flavonols), κίτρινος και
- φλαβανόνες (flavanones), μπλε

Το διάλυμα παρασκευάζεται είτε με νερό είτε με αιθυλική αλκοόλη, το αποτέλεσμα είναι το ίδιο (Guerin et al. 1971). Οι τομές τοποθετούνται σε λίγες σταγόνες διαλύματος και παρατηρούνται άμεσα.

Lucifer yellow

Η χρωστική Lucifer yellow είναι πολύ μικρού μοριακού βάρους και έτσι μπορεί εύκολα να εισέρχεται στα κύτταρα. Επιπλέον δεν είναι τοξική για τα κύτταρα στις συγκεντρώσεις και το pH που χρησιμοποιείται και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε ζωντανά κύτταρα (Stewart W., 1981, Hellmir S., 1990).

Ολόκληροι βλαστοί από το φυτό κόπηκαν και τοποθετήθηκαν άμεσα σε δ/μα Lucifer yellow 2,5% σε νερό, όπου και παρέμειναν για 18 ώρες. Έπειτα, τα φύλλα των ιστών κόπηκαν ως συνήθως και παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο με φθορισμό.

Η χρωστική ακολουθώντας την ανοδική πορεία του νερού, τόσο αποπλάσματικά όσο και συμπλάσματικά, δίνει χαρακτηριστικό *κίτρινο* φθορισμό σε όλους τους ιστούς στους οποίους κινήθηκε το νερό.

2.1.5 Ιστοχημεία

Στη μελέτη αυτή εφαρμόστηκαν οι παρακάτω ιστοχημικές μέθοδοι:

Αντιδραστήριο Nadi

Χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό *τερπενοειδών*, τα οποία αποκτούν χρώμα *ιώδες - βιολετί*.

Για την παρασκευή του διαλύματος αναμιγνύονται 0,5 mL από 1% a-naphthol σε 40% αλκοόλη, με 0,5 mL από 1% N,N-dimethyl-p-phenylenediamine monohydrochloride σε απεσταγμένο νερό, και με 49 mL φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος 0,05 M (pH 7,2)

Το διάλυμα παρασκευάζεται ακριβώς πριν χρησιμοποιηθεί. Επειδή είναι φωτοευαίσθητο διατηρείται σε σκουρόχρωμο μπουκαλάκι και η χρώση των τομών γίνεται στο σκοτάδι (Pasqua et al. 2003).

Οι τομές παραμένουν στο αντιδραστήριο για 1 h και ακολουθεί παρατήρηση σε γλυκερόλη στο οπτικό μικροσκόπιο.

Dragendorff

Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση, των *αλκαλοειδών*, τα οποία βαφεί έντονο πορτοκαλί.

Παρασκευάζονται δύο βασικά διαλύματα: Διάλυμα Α: 1.7g βασικού νιτρικού βισμούθιου σε 100 mL διαλύματος οξικού οξέος 20% και Διάλυμα Β: 40.0g ιωδιούχου καλίου σε 100 mL νερού· τα οποία αναμειγνύονται ως εξής:

5 mL A + 5 mL B + 20 mL οξικού οξέος + 70 mL νερού.

Οι τομές τοποθετούνται στο αντιδραστήριο όπου και παραμένουν 10 λεπτά και ακολουθεί παρατήρηση σε γλυκερόλη στο οπτικό μικροσκόπιο.

Θεικός Σίδηρος ($FeSO_4$)

Διάλυμα $FeSO_4$ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό *ταννινών*, οι οποίες παίρνουν χρώμα *πορτοκαλί έως μαύρο* (Clark 1981, Johansen 1940).

Το αντιδραστήριο προκύπτει από την προσθήκη 0,25 mL παγόμορφου οξικού οξέος, 10mL 37% φορμαλδεΰδης και 2g $FeSO_4$ σε 89 mL απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια τοποθετούνται οι τομές στο αντιδραστήριο όπου και παραμένουν 2-4 ή και 18h. Τέλος, η παρατήρηση γίνεται σε γλυκερόλη με το οπτικό μικροσκόπιο.

Sudan IV

Χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό *λιπιδίων*, *κουτίνης* και *σουβερίνης*, εκτός των φωσφολιπιδίων, τα οποία και χρωματίζονται *κόκκινα*.

Η αντίδραση στηρίζεται στην επιλεκτική διαλυτότητα της χρωστικής στα λιπίδια. Πιο συγκεκριμένα η χρωστική είναι πιο διαλυτή στα λιπίδια του ιστού από ότι στο διάλυτη, στον οποίο αρχικά διαλύθηκε (εν προκειμένω στην αλκοόλη), και έτσι με την απλή τοποθέτηση του ιστού στη χρωστική, τα λιπίδια την προσλαμβάνουν. Η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης στηρίζεται σε πολλούς παράγοντες ανάμεσα στους οποίους και η φυσική κατάσταση των λιπιδίων. Γενικά, η αντίδραση για τα έλαια είναι πολύ πιο αποτελεσματική από ότι στα λίπη, τα οποία και παρουσιάζουν ασθενή αντίδραση (Jensen 1962). Επειδή χρησιμοποιείται διάλυμα σε αλκοόλη δίνεται προσοχή στους χρόνους, αφού η αλκοόλη είναι διαλύτης των λιπών και μπορεί να χαλάσει τις τομές μετά από μεγάλη παραμονή στο διάλυμα (Johansen 1940).

Φτιάχνεται δ/μα 0,5% Sudan IV σε 85% αλκοόλη στο οποίο οι τομές εμβαπτίζονται στο διάλυμα για 5 min. Ακολουθεί γρήγορη έκπλυση σε απόλυτη αλκοόλη και στη συνέχεια παρατήρηση σε 25% γλυκερόλη στο οπτικό μικροσκόπιο.

Φλωρογλυκίνη

Χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό της *λιγνίνης*. Η αντίδραση είναι ειδική αλλά εμφανίζεται θετική και πεντοζάνες, ημικυτταρίνες (Davidson et al. 1995, Feder and O'Brien 1968). Τα λιγνινοποιημένα κυτταρικά τοιχώματα χρωματίζονται *κόκκινα-ροζ*.

Τοποθετούνται οι τομές στην αντικειμενοφόρο, σε σταγόνα δ/τος φλωρογλυκίνης 1% σε 95% αιθανόλη, και στο πλάι της καλυπτρίδας σταγόνα 25% HCl. Η διάχυση του HCl διευκολύνεται, τοποθετώντας ένα κομμάτι διηθητικού χαρτιού στην απέναντι πλευρά της καλυπτρίδας.

Χρώση με κυανούν της τολουιδίνης

Χρησιμοποιείται ως γενική χρωστική. Γενικά βάφει μπλε τους λιγνινοποιημένους ιστούς.

Παρασκευάζεται διάλυμα κυανούν της τολουιδίνης 0.1%, σε νερό, στο οποίο τοποθετούνται οι τομές και παραμένουν για 1-5 min. Ακολουθεί παρατήρηση σε νερό με το οπτικό μικροσκόπιο.

Ερυθρό του Ρουθηνίου (Ruthenium Red)

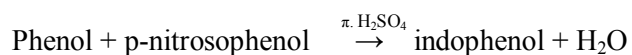
Χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό *πολυσακχαριτών*, πλην της κυτταρίνης, οι οποίοι εμφανίζονται *ροζ έως κόκκινοι* (Jensen 1962).

Παρασκευάζεται διάλυμα 0,05% ερυθρού του ρουθηνίου σε νερό, στο οποίο τοποθετούνται οι τομές και παραμένουν για 1-5 min. Ακολουθεί παρατήρηση σε νερό με το οπτικό μικροσκόπιο.

Χρώση με 4-νιτροσοφαινόλη σε πυκνό H₂SO₄

Το αντιδραστήριο χρησιμοποιείται για τον *in vivo* εντοπισμό *φαινολών* σε φυτικό υλικό και πιο συγκεκριμένα μονοτερπενικών φαινολών.

Βασίζεται στην αντίδραση συμύκνωσης των φαινολών με την 4-νιτροσοφαινόλη παρουσία πυκνού οξέως κατά την οποία παράγονται χρωματισμένες ινδοφαινόλες και νερό. Σε περίπτωση θετικής αντίδρασης το χρώμα της παραγόμενης ινδοφαινόλης είναι ενδεικτικό, όχι όμως και οριστικό, της αρχικής μονοτερπενικής φαινόλης, αφού περισσότερες από μία φαινόλες μπορούν να δώσουν το ίδιο χρώμα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα: η θυμόλη δίνει κόκκινο και η καρβακρόλη πράσινο χρώμα ινδοφαινόλης (Gersbach et al. 2001).



Μερικές σταγόνες αντιδραστηρίου (0,05% 4-νιτροσοφαινόλη σε π. H₂SO₄) προστίθενται στην επιφάνεια, προσαξονική και αποαξονική, του φύλλου (στην οποία εντοπίζονται οι περισσότεροι ασπιδοειδείς αδένες). Διακόπτεται η αντίδραση με έκπλυση σε νερό.

Η περίσσεια του αντιδραστηρίου- νερού απορροφάται με διηθητικό χαρτί από την επιφάνεια του φύλλου για μην παρεμποδίζεται η παρατήρηση και η φωτογράφιση χωρίς έντονες ανακλάσεις του φωτός.

Η παρατήρηση των όποιων αλλαγών στο χρώμα γίνεται αμέσως με στερεοσκόπιο.

Nile Blue

Χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό λιπιδίων (ουδέτερα και όξινα) (Jensen 1962). Τα λίπη, τα έλαια και οι κηροί παίρνουν κόκκινο χρωματισμό, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια και νουκλεοπρωτεΐνες, μπλε.

Οι τομές τοποθετούνται διαδοχικά στα ακόλουθα διαλύματα: 1% Nile Blue A στους 37 °C για 30 sec, 1% οξικό οξύ στους 37 °C για 30 sec και ξέπλυμα με νερό. Η παρατήρηση γίνεται σε γλυκερίνη.

2.1.6 Μικροσκόπια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τις μορφολογικές, ανατομικές και ιστοχημικές παρατηρήσεις

Οπτικό μικροσκόπιο (Ο.Μ.)

Το οπτικό μικροσκόπιο τύπου OLYMPUS Bx40 του Εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, εφοδιασμένο με τα κατάλληλα εξαρτήματα για παρατηρήσεις σε φωτεινό ή σκοτεινό πεδίο, αντίθετης φάσης και επιφθορισμό. Για το φθορισμό, το φίλτρο διέγερσης που χρησιμοποιήθηκε είναι το BP 330-385, και το φίλτρο εκπομπής είναι το BA 420.

Στερεοσκόπιο:

Στερεοσκόπιο τύπου OLYMPUS SZx12 του Εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας.

Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (Η.Μ.Δ.):

Η.Μ.Δ. του Εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, τύπου Jeol 100S (Jeol, Japan)

Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Η.Μ.Σ.):

Η.Μ.Σ. του Εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, τύπου Jeol 6360 (Jeol, Japan).

2.1.7 Φωτογράφιση

Για το **οπτικό μικροσκόπιο** και το **στερεοσκόπιο** η λήψη φωτογραφιών έγινε με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Olympus 12,5 Mp (Olympus, Tokyo, Japan).

Το **ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης** Jeol 6360 είναι εφοδιασμένο με σύστημα ψηφιακής απεικόνισης.

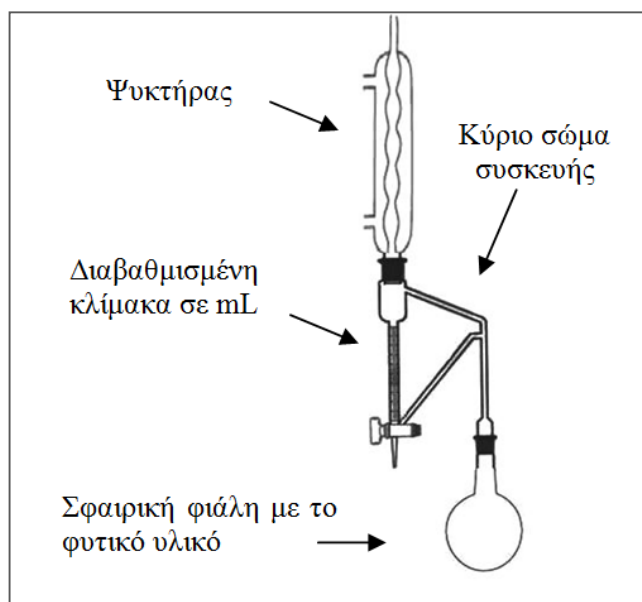
Το **ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης** Jeol 100S είναι εφοδιασμένο με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Olympus MegaView G2.

Η επεξεργασία των ψηφιακών εικόνων έγινε με τα προγράμματα Adobe Photoshop και Corel Photo Paint x4.

2.2 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΚΑΙ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ

2.2.1 Συλλογή φυτικού υλικού

Εναέρια τμήματα του φυτού *Teucrium polium* συλλέχτηκαν από την περιοχή του Υμηττού (ασβεστολιθικά εδάφη, 350μ υψόμετρο), κατά το στάδιο της άνθισης (τέλη Μαΐου). Οι φυτικοί ιστοί που χρησιμοποιήθηκαν αποξηράθηκαν με έκθεση στον αέρα σε ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου και σε σκοτάδι. Έπειτα, διαχωρίστηκαν τα φύλλα και οι ταξιανθίες από τους βλαστούς, και χρησιμοποιήθηκαν ως ξεχωριστά δείγματα για την παραλαβή του αιθέριου ελαίου. Το φυτικό υλικό αναλύθηκε μέσα σε διάστημα ενός μήνα από τη συλλογή του.



Εικόνα 2.1.

Σχηματική απεικόνιση της συσκευής Clevenger.

2.2.2 Παραλαβή αιθέριου ελαίου με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης

Η παραλαβή των αιθέριων ελαίων έγινε με την τεχνική της υδροαπόσταξης. Για τη εφαρμογή της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκε συσκευή τύπου Clevenger. Μη κονιορτοποιημένο δείγμα, ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας, τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη 2L με περίπου 1L απιονισμένο νερό και αναδεύεται καλά. Η φιάλη συνδέεται με το κύριο σώμα, και ψυκτήρα. Το κύριο σώμα, είναι κατάλληλο για έλαια ελαφρύτερα του νερού και περιέχει κατακόρυφο βαθμονομημένο σωλήνα με στρόφιγγα. Ο ψυκτήρας, ψύχεται με την

κυκλοφορία του νερού της βρύσης. Όλα τα μέρη διαθέτουν κωνικό στόμιο από εσφυρισμένο γυαλί, διαμόρφωση για ταχεία και ασφαλή σύνδεση μεταξύ τους.

Η φιάλη θερμαίνεται με τη χρήση θερμομανδύα. Οι υδρατμοί που σχηματίζονται συμπαρασύρουν τα πτητικά συστατικά και όλα μαζί φτάνουν στον ψυκτήρα, με αποτέλεσμα να υγροποιούνται. Το νερό ανακυκλώνεται ενώ το αιθέριο έλαιο, συγκεντρώνεται στο βαθμονομημένο σωλήνα ως υπερκείμενη φάση.

Πρακτικά η διαδικασία έχει ολοκληρωθεί όταν δεν παρατηρείται αύξηση του συλλεγόμενου αιθέριου ελαίου για μια ώρα. Από τη στιγμή που άρχισαν να συμπυκνώνονται οι πρώτοι υδρατμοί στον ψυκτήρα, ως την ολοκλήρωση της απόσταξης χρειάστηκαν 3 ώρες για το δείγμα των φύλλων, και 4,5 ώρες για τις ταξιανθίες.



Επειδή η ποσότητα του αιθέριου ελαίου που παραλήφθηκε ήταν μικρή (μικρότερη από 0,5mL), κρίναμε σκόπιμο να εκχυλίσουμε το υδρόλυμα, ώστε να παραλάβουμε τις ουσίες που είχαν περάσει. Έτσι εκχυλίσουμε το αιθέριο έλαιο μαζί με το υδρόλυμα που είχε μείνει στο κύριο σώμα της συσκευής, σε διαιθυλαιθέρα με εκχυλιστική χοάνη. Χρησιμοποιήθηκαν 30mL οργανικού διαλύτη σε 3 δόσεις των 10mL. Μετά την ανάμειξη διαχωρίζονται οι δύο φάσεις όπου και παραλαμβάνονται ξεχωριστά. Τα πτητικά συστατικά εκχυλίζονται στον οργανικό διαλύτη (υπερκείμενη φάση).

Το εκχύλισμα του αιθέριου ελαίου συμπυκνώνεται με ήπια ροή ψυχρού αζώτου στην ελεύθερη επιφάνειά του, ώστε να έχει τελική συγκέντρωση περίπου ίση με 4%.

Για την απομάκρυνση της υγρασίας προστίθεται άνυδρο θειικό μαγνήσιο. Τέλος, το εκχύλισμα φιλτράρεται και φυλάσσεται στην κατάψυξη μέχρι να αναλυθεί.

2.2.3 Συνθήκες ανάλυσης αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών.

Το αιθέριο έλαιο που παραλήφθηκε, αναλύθηκε σε αέριο χρωματογράφο Hewlett-Packard 5890 series II, συνδυασμένο με ανιχνευτή φλόγας (FID) και με άπολη τριχοειδή στήλη HP-5 (30m x 0.25mm i.d. x 0,25μm πάχος υμενίου). Οι θερμοκρασίες εισόδου και ανιχνευτή ήταν 220°C και 290°C αντίστοιχα. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο με ροή 1mL/min. Ποσότητα δείγματος 1μL, εισάγεται αυτόχειρα στο σύστημα έγχυσης και με την τεχνική “splitless”.

Για την ταυτοποίηση των συστατικών του αιθέριου ελαίου, χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος Hewlett-Packard 5890 series II, με στήλη HP-5 (30m x 0.25mm i.d. x 0,25μm πάχος υμενίου) και ανιχνευτή μαζών HP 5972 με ενέργεια ιονισμού 70 eV. Η

θερμοκρασία στην είσοδο και στη γραμμή διαβίβασης ήταν 220°C και 290°C αντίστοιχα. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο με ροή 1mL/min. Ποσότητα δείγματος 1μL, εισάγεται αυτόχειρα στο σύστημα έγχυσης και με την τεχνική “splitless”.

Σχετικά με το πρόγραμμα της θερμοκρασίας της στήλης αρχικά δοκιμάστηκε ένα πρόγραμμα που χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση των αιθέριων ελαίων των αρωματικών φυτών, κατά το οποίο η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά από 60°C στους 240°C, με σταθερό ρυθμό 3°C/min και διαρκεί συνολικά μία ώρα. Όμως, παρατηρήθηκε μη καλός διαχωρισμός και ιδιαίτερα στα συστατικά που βγαίνουν μεταξύ τριακοστού και τεσσαρακοστού λεπτού, κατά τα οποία η θερμοκρασία της στήλης βρίσκεται στους 150-200°C. Καλύτερος διαχωρισμός επιτεύχθηκε με το ακόλουθο πρόγραμμα που διαρκεί συνολικά 2 ώρες. Από τους 60°C η θερμοκρασία αυξάνεται με ρυθμό 2°C/min ως τους 150°C όπου παραμένει για 10 λεπτά, και από τους 150°C έως τους 200°C αυξάνεται με ρυθμό 1°C/min, και στο τελευταίο στάδιο αυξάνεται έως τους 250°C με ρυθμό 3°C/min.

Η ταυτοποίηση των συστατικών επιτεύχθηκε συγκρίνοντας το χρόνο συγκράτησης και το φάσμα μάζας τους με τα αντίστοιχα των βιβλιοθηκών φασμάτων της βιβλιογραφίας (Adams) καθώς και των NIST98/Wiley275 που υπάρχουν στο πρόγραμμα του αέριου χρωματογράφου.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΝΑΤΟΜΙΚΑ – ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

3.1.1 Μακροσκοπικές παρατηρήσεις

Το *Teucrium polium* L., είναι ένας αειθαλής, πολυετής, φρυγανώδης θάμνος με ύψος 10-40 cm. Τα φύλλα του είναι λογχοειδή-σφηνοειδή, ακέραια στη βάση, πριονωτά προς την κορυφή, πολύ χνουδωτά και συστρεφόμενα στα κράσπεδα. Όλα τα εναέρια μέρη του φυτού καλύπτονται από τριχώματα που του προσδίδουν μια γκρίζα απόχρωση. Ο βλαστός του *T. polium* είναι κυκλικός σε διατομή και στερείται των διακριτών κολλεγχυματικών ιστών που δίνουν το τετραγωνικό σχήμα στους βλαστούς των Lamiales. Τα άνθη του είναι μικρά και λευκά και φύονται σε πυκνά, σχεδόν σφαιρικά κεφάλια, επάκρια. Το φύλλωμα απελευθερώνει ένα χαρακτηριστικό άρωμα.

Κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης, παρατηρήθηκε ότι το φυτό αναπτύσσεται συνεχώς καθόλη την διάρκεια του έτους και κυρίως όταν οι κλιματολογικές συνθήκες είναι ευνοϊκές, όπως π.χ. κατά την διάρκεια μιας καλοκαιρίας το χειμώνα ή μίας βροχόπτωσης στις περιόδους ξηρασίας. Έχει μεγάλη προσαρμοστικότητα στην ανάπτυξη του, και εκμεταλλεύεται έστω και σύντομες περιόδους καλοκαιρίας εκπύσσοντας διαρκώς νέα φύλλα και βλαστούς.

Σε κάθε ευκαιρία ανάπτυξης φαίνεται πως αρχικά εκπύσσει «μεγάλα» φύλλα και στη συνέχεια στις μασχάλες αυτών των φύλλων αναπτύσσονται βραχυβλάστες ή δολιχοβλάστες. Σε κάθε κόμβο ή μασχάλη φύλλου, αναπτύσσεται πάντα ένα ζεύγος αντίθετων φύλλων και σταυρωτά (Εικόνα 3 Ζ). Αναπτύσσεται, βγάζοντας καινούργια φύλλα και επεκτείνοντας τους βλαστούς που ήδη έχει, αλλά και εκπύσσοντας νέους βλαστούς (Εικόνα 3 Β). Όταν έχουν αναπτυχθεί αρκετά αυτοί οι βλαστοί, ρίχνει τα φύλλα που είχαν πλήρως αναπτυχθεί στην αρχή του φθινοπώρου (Εικόνα 3 Γ). Αυτή η ανάπτυξη συνεχίζεται σε όλη τη διάρκεια του χειμώνα και την άνοιξη ως τα τέλη Απριλίου όπου ο θάμνος έχει πάρει πια το μεγαλύτερο του ύψος και σχηματίζει την ταξιανθία του επάκρια (Εικόνα 3 Ε). Η ανθοφορία διαρκεί περίπου ένα μήνα και στο τέλος αυτής της περιόδου το φυτό ρίχνει τα περισσότερα από τα φύλλα του ενώ διατηρεί τους δολιχοβλάστες - που βρίσκονται στα χαμηλότερα στελέχη- τους οποίους αναπτύσσει πολύ αργά κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού (Εικόνα 3 Α). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να διατηρείται το φυτό χαμηλό. Κάποιοι βλαστοί από αυτούς, θα διατηρηθούν και θα δώσουν τη βλάστηση του επόμενου χειμώνα που θα ξεκινήσει ουσιαστικά με τις πρώτες φθινοπωρινές βροχές.

Συνήθως, το χειμώνα και την άνοιξη τα φύλλα του φυτού, εμφανίζονται μεγαλύτερα και με περισσότερο πεπλατυσμένο έλασμα. Επίσης, καλύπτονται από πιο αραιό τρίχωμα και έτσι το χρώμα τους φαίνεται περισσότερο πιο έντονο πράσινο (Εικόνα 3 Δ, Εικόνα 6). Αντίθετα, το καλοκαίρι τα φύλλα είναι γενικά πιο μικρά, και είναι έντονα συστρεμμένα. Καλύπτονται από πολύ πυκνό τρίχωμα και φαίνονται αργυρά-γκρι. Γενικά, ο θάμνος δείχνει πιο χαμηλός και λιγότερο ορθόκλαδος (Εικόνα 3 Α). Ωστόσο, παρατηρούνται μεγάλες μακροσκοπικές διαφορές ακόμα και ανάμεσα σε φυτά που βρίσκονται σε πολύ μικρή απόσταση μεταξύ τους. Πολύ συχνά, γειτονικά φυτά βρίσκονται σε διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο, όπως π.χ. ανθίζουν με διαφορά περισσότερο από ένα μήνα.

3.1.2 Ιστοχημεία

Με τις διάφορες ιστοχημικές δοκιμές έχουμε ενδείξεις ότι στα φύλλα του φυτού συγκεντρώνονται αρκετοί δευτερογενείς μεταβολίτες.

Αντιδραστήριο Nadi

Με το αντιδραστήριο Nadi, εντοπίζονται *τερπένια* τα οποία χρωματίζονται ιώδη- βιολετί. Έντονο ιώδες χρώμα, έδωσαν τα ελαιοσταγονίδια των κυττάρων του μεσόφυλλου, καθώς επίσης, τα κύτταρα της κεφαλής των κεφαλοειδών αδένων περιφερειακά (στον υποεφυμενιδικό χώρο). Επίσης, ορισμένα σταγονίδια μέσα στα κύτταρα της κεφαλής και της βάσης πολλών αδενωδών τριχωμάτων (Εικόνα 33 Α,Β,Γ).

Dragendorff

Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση, των *αλκαλοειδών*, τα οποία βάφει έντονο πορτοκαλί. Το αντιδραστήριο δεν έδωσε θετική αντίδραση στους ιστούς του φύλλου σε καμία εποχή.

Ερυθρό του Ρουθενίου (Ruthenium Red)

Χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό *πολυσακχαριτών*, πλην της κυτταρίνης, οι οποίοι εμφανίζονται ροζ έως κόκκινοι. Με αυτή τη χρώση παρατηρούνται εκτός των άλλων, ο ηθμός και τα κυτταρικά τοιχώματα γενικά (Εικόνα 17 Α).

Θεικός Σίδηρος ($FeSO_4$)

Διάλυμα $FeSO_4$ χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό *ταννινών*, οι οποίες παίρνουν χρώμα *πορτοκαλί έως μαύρο*. Με το $FeSO_4$ βάφονται σκούρο καφέ τα κύτταρα της κεφαλής ορισμένων κεφαλοειδών αδένων αλλά και ορισμένες σφαιρικές δομές στα επιδερμικά κύτταρα (Εικόνα 14 Ε, Εικόνα 20 Γ).

Sudan IV

Χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό λιπιδίων, κουτίνης και σουβερίνης, τα οποία χρωματίζονται έντονα κόκκινα. Θετική χρώση έδωσαν τα ελαιοσταγονίδια των κυττάρων του μεσόφυλλου (Εικόνα 20 Ε, Εικόνα 10), η εφυμενίδα (Εικόνα 16 Ζ), τα τοιχώματα των ιδιόβλαστων ελαιοκυττάρων-κοιλοτήτων (Εικόνα 25, Εικόνα 26 Γ,Δ) και το περιεχόμενο τους (Εικόνα 24), καθώς επίσης, σε αρκετές περιπτώσεις, τα εκκρίματα των αδένων (Εικόνα 33 Δ,Η).

Aniline blue

Χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό πρωτεϊνών, οι οποίες εμφανίζονται μπλε. Η χρωστική αυτή βάφει ελαφρά ολόκληρο το φυτικό ιστό εκτός των ελαιοσταγονιδίων των κυττάρων του μεσόφυλλου.

Φλωρογλυκίνη

Χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό της λιγνίνης. Τα λιγνινοποιημένα κυτταρικά τοιχώματα χρωματίζονται κόκκινα-ροζ. Θετική χρώση έδωσαν μόνο τα αγγεία του ξύλου (Εικόνα 12).

Χρώση με 4-νιτροσιφαινόλη σε πυκνό H_2SO_4

Το αντιδραστήριο χρησιμοποιείται για τον *in vivo* εντοπισμό φαινολών σε φυτικό υλικό και πιο συγκεκριμένα μονοτερπενικών φαινολών. Παρατηρήθηκε άμεση αλλαγή στο χρώμα των περισσότερων ασπιδοειδών αδένων, οι οποίοι βρίσκονται κυρίως στην αποαξονική επιφάνεια (Εικόνα 8).

Nile blue

Με αυτή τη χρωστική τα λίπη, τα έλαια και οι κηροί παίρνουν κόκκινο χρωματισμό, ενώ τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια και νουκλεοπρωτεΐνες, μπλε. Κόκκινο χρώμα παίρνουν τα εκκρίματα των ασπιδοειδών αδένων της προσαξονικής επιφάνειας και το περιεχόμενο των ιδιόβλαστων ελαιοκυττάρων, ενώ η εφυμενίδα βάφεται μπλε (Εικόνα 31).

Lucifer yellow

Η χρωστική ακολουθώντας την ανοδική πορεία του νερού, τόσο αποπ्लाσμικά όσο και συμπλασμικά, δίνει χαρακτηριστικό κίτρινο φθορισμό σε όλους τους ιστούς στους οποίους κινήθηκε το νερό. Παρατηρείται κίτρινος φθορισμός στα αγγεία του ξύλου ενώ αρνητική ήταν η χρώση των ιδιόβλαστων χώρων (Εικόνα 10, Εικόνα 26 Α).

Πίνακας 1: Συγκεντρωτικός πίνακας ιστοχημείας.

ΧΡΩΣΤΙΚΗ	ΕΝΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΧΡΩΜΑΤΙΖΕΙ	ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	ΙΣΤΟΙ ΠΟΥ ΑΝΤΙΑΡΟΥΝ
DRAGENDORFF	αλκαλοειδή	-	-
NADI	Τερπενοειδή	+	τα ελαιοσταγονίδια των κυττάρων του μεσόφυλλου-τις εποχές που σχηματίζονται, τα κύτταρα της κεφαλής των κεφαλοειδών αδένων περιφερειακά (στον υποεφυμενιδικό χώρο) και ορισμένα σταγονίδια μέσα στα κύτταρα της κεφαλής και της βάσης πολλών αδενωδών τριχωμάτων
NILE BLUE	λιπίδια ουδέτερα, όξινα	+	τα εκκρίματα των ασπιδοειδών αδένων της προσαξονικής επιφάνειας και το περιεχόμενο των ιδιόβλαστων χώρων κόκκινο χρώμα, ενώ η εφυμενίδα βάφεται μπλε
SUDAN IV	λιπίδια	+	τα ελαιοσταγονίδια των κυττάρων του μεσόφυλλου- τις εποχές που σχηματίζονται, η εφυμενίδα, τα τοιχώματα των ιδιόβλαστων κοιλοτήτων και το περιεχόμενό τους, και σε αρκετές περιπτώσεις, τα εκκρίματα των αδένων
FeSO ₄	τανίνες	+	τα κύτταρα της κεφαλής ορισμένων κεφαλοειδών αδένων και ορισμένες σφαιρικές δομές στα επιδερμικά κύτταρα
FLOROGLYKENOL	λινίνη	+	τα αγγεία του ξύλου
ANILINE BLUE	πρωτεΐνες	+	βάφει ελαφρά ολόκληρο το φυτικό ιστό, εκτός από τα ελαιοσταγονίδια των κυττάρων του μεσόφυλλου
RUTHENIUM	πηκτίνες	+	ηθμός και τα κυτταρικά τοιχώματα γενικά

3.1.3 Ανατομία φύλλου

Τα φύλλα του *T. polium* χαρακτηρίζονται από πλούσιο τρίχωμα (indumentum), που καλύπτει και τις δύο πλευρές των φύλλων. Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης το τρίχωμα, φαίνεται σαν να αποτελείται από «δύο στρώσεις» πολυάριθμων αδενωδών και μη αδενωδών τριχών. Ένας μεγάλος αριθμός μακριών, πολυκύτταρων και δενδρωδών (κυρίως) μη αδενωδών τριχών, συνιστούν ένα παχύ χνούδι που καλύπτει τα φύλλα και αποτελεί την εξωτερική στρώση, ενώ εκείνο που βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια της επιδερμίδας σχηματίζεται από αδενώδη τριχίδια (Εικόνα 7). Καθεμία από τις μη αδενώδεις τρίχες που συνθέτουν το εξωτερικό προστατευτικό τρίχωμα, έχει ένα αξονικό μέρος και μία ή - συχνότερα – περισσότερες, μεγάλες, αγκαθωτές προβολές και από τις δύο πλευρές. Αυτές οι προβολές «συνδέονται» η μια με την άλλη, δημιουργώντας μια σχεδόν «ενιαία», φράγμα προστασίας (Εικόνα 4 Α,Β). Αυτά τα επιδερμικά εξαρτήματα φαίνεται κατά την ανάπτυξη

τους να εφοδιάζονται με φαινολικές ενώσεις ή φλαβονοειδή όπως φαίνεται με το μικροσκόπιο φθορισμού (Εικόνα 9).

Οι ασπιδοειδείς ελαιοφόρες τρίχες φαίνονται να είναι λιγότερες από τις κεφαλοειδείς, και βρίσκονται κυρίως στην αποαξονική πλευρά του φύλλου (Εικόνα 8). Οι ασπιδοειδείς τρίχες φαίνεται να αποτελούνται από ένα κύτταρο βάσης, ένα κύτταρο μίσχου και μια πολυκύτταρη κεφαλή (Εικόνα 31 Α,Η). Ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί ο αριθμός των εκκριτικών κυττάρων της κεφαλής να ποικίλλει, καθώς επίσης η φύση των υλικών τα οποία αποθηκεύουν και εκκρίνουν (Εικόνα 31 Γ,Δ). Το εκκρινόμενο υλικό συσσωρεύεται μεταξύ των κορυφαίων κυτταρικών τοιχωμάτων των εκκριτικών κυττάρων και την εφυμενίδα (Εικόνα 31 Θ). Τα κύτταρα της κεφαλής και τα κύτταρα βάσης φθορίζουν έντονα γαλάζιο πιθανώς λόγω κουτινοποίησης (Εικόνα 31 Β,Δ). Οι περισσότερες ασπιδοειδείς τρίχες της αποαξονικής επιφάνειας περιέχουν μια έκκριση που εμφανίζεται ημιδιαφανής, σε αντίθεση με αυτές της προσαξονικής επιφάνειας οι οποίες συσσωρεύουν κάποια αδιαφανή, καφετιά ουσία (Εικόνα 20 Δ). Επίσης, κάτι που διαφοροποιεί τους αδένες της προσαξονικής επιφάνειας, είναι ότι το περιεχόμενό τους, δίνει κόκκινο χρωματισμό με το Nile blue (λίπη, έλαια και οι κηροί) (Εικόνα 31 Ε, Ζ).

Οι κεφαλοειδείς αδενώδεις τρίχες ποικίλλουν όσον αφορά τη μορφολογία τους. Αποτελούνται από ένα κύτταρο βάσης, δύο έως τρία τουλάχιστον κύτταρα μίσχου και ένα κύτταρο κεφαλής που έχει σφαιρικό σχήμα (Εικόνα 32 Δ,Ε, Εικόνα 33 Ε) ή αρχικά είναι όσο στενά είναι και τα κύτταρα του μίσχου και ανοίγει προς τα πάνω (Εικόνα 32 Ι, Εικόνα 33 Δ). Τα κύτταρα του μίσχου μπορεί να είναι πολύ επιμηκυμένα και οι κεφαλοειδείς τρίχες ποικίλλουν πολύ σε ύψος. Σε αυτά τα τριχώματα οι εκκρίσεις συνήθως αποθηκεύονται μεταξύ της κορυφής του κυτταρικού τοιχώματος του κυττάρου της κεφαλής και της “ανασηκωμένης” εφυμενίδας. Η αποθήκευση ξεκινάει καθώς σχηματίζεται ένας μικρός θόλος στο ανώτερο μέρος του κυττάρου της κεφαλής (Εικόνα 33 Ι). Κάποιες εικόνες μας επιτρέπουν να υποθέσουμε ότι οι κεφαλοειδείς αδένες διαθέτουν πόρο από τον οποίο εκκρίνονται τα αιθέρια έλαια, ενώ σε άλλες περιπτώσεις δε φαίνεται κάτι αντίστοιχο (Εικόνα 33 Ζ,Η). Το τελευταίο κύτταρο του μίσχου πριν το κύτταρο της κεφαλής, πολλές φορές εμφανίζεται στενό κάτι το οποίο, πιθανώς να αποτελεί κάποιο από τα τελευταία στάδια ανάπτυξης των αδένων (Εικόνα 32 Γ,Ζ,Η, Εικόνα 33 Θ). Εναλλακτικά θα μπορούσε να πρόκειται για ένα διαφορετικό τύπο αδένα.

Παρατηρούνται ακόμα κάποιοι αδένες που δεν κατατάσσονται εύκολα στους ασπιδοειδείς ή κεφαλοειδείς αδένες. Αυτοί φαίνεται να έχουν ένα κύτταρο βάσης, μονοκύτταρο μίσχο χαμηλού ύψους και κεφαλή μονοκύτταρη, δικύτταρη, και σπάνια περισσότερων κυττάρων (Εικόνα 33 Α,Β). Με τη μικροσκοπία φθορισμού σε αυτά τα τριχώματα παρατηρείται έντονος πράσινος και κίτρινος φθορισμός στα κύτταρα βάσης (Εικόνα 32 Μ) και στα κύτταρα της κεφαλής. Τα κύτταρα της κεφαλής των περισσότερων κεφαλοειδών τριχωμάτων

φθορίζουν επίσης πράσινα και κίτρινα, κάτι που δηλώνει την ύπαρξη φλαβονοειδών (φλαβόνες και φλαβανόλες) και φαινολικών οξέων (Εικόνα **32** I-Ξ). Επίσης, τα εκκρίματα που συσσωρεύονται στον υποεφυμενιδικό χώρο σε ορισμένους ασπιδοειδείς αδένες φθορίζουν ελαφρώς πράσινα (Εικόνα **32** Θ).

Το τρίχωμα αναπτύσσεται σταδιακά, παράλληλα με την ανάπτυξη των φύλλων. Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης παρατηρείται η πλήρης έλλειψη αδενωδών τριχωμάτων από τα εμβρυακά φύλλα. Σε λίγο μεγαλύτερα φύλλα, αναπτύσσονται ασπιδοειδείς και μακριές κεφαλοειδείς αδενώδεις τρίχες (Εικόνα **5** A,B).

Η ανατομία του ελάσματος του φύλλου είναι αρκετά απλή και διαφοροποιείται έντονα ανάμεσα σε καλοκαιρινά και χειμωνιάτικα φύλλα (σύγκριση εικόνων από **14-17** & **20**). Διαθέτει μονόστρωμη άνω και κάτω επιδερμίδα και το πάχος των κυτταρικών τοιχωμάτων των επιδερμικών κυττάρων ποικίλλει ανάλογα με την εποχή ειδικά αυτά της προσαξονικής πλευράς. Κατά τα τέλη του καλοκαιριού σημειώνεται το μεγαλύτερο πάχος (Εικόνα **20** A,B,Z). Το Σεπτέμβρη, τα κυτταρικά τοιχώματα δεν εμφανίζονται τόσο παχιά (Εικόνα **20** B,E).

Η εφυμενίδα επίσης διαφοροποιείται ανάλογα με την εποχή, και από το στάδιο της άνθισης και τους καλοκαιρινούς μήνες εμφανίζεται πιο παχιά (Εικόνα **16** Z, Εικόνα **17** Z). Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης παρατηρείται η εναπόθεση εφυμενίδας η οποία εξακολουθεί μέχρι τον Ιούλιο (Εικόνα **19**). Παρατηρείται έντονος γαλάζιος φθορισμός και στις δύο πλευρές του φύλλου που πιθανώς οφείλεται στην κουτίνη (Εικόνα **14** Z). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το ότι η προσαξονική επιφάνεια κατά τους καλοκαιρινούς μήνες φθορίζει πράσινα, σε αντίθεση με την αποαξονική, που συνεχίζει να φθορίζει γαλάζια (Εικόνα **17** Δ). Τους ανοιξιάτικους μήνες επίσης φθορίζουν οι πυρήνες των κυττάρων του μεσόφυλλου (Εικόνα **16** Γ,Δ).

Κάτω από την άνω επιδερμίδα, εμφανίζεται το πασσαλώδες παρέγχυμα, το οποίο καταλαμβάνει το μισό ή και παραπάνω πάχος του μεσόφυλλου και αποτελείται από μονή στρώση κυττάρων το χειμώνα (Εικόνα **14** B, Εικόνα **15** B) και διπλή το καλοκαίρι και το Σεπτέμβρη (Εικόνα **17** B, Εικόνα **20** B). Το πασσαλώδες παρέγχυμα, εμφανίζεται χαλαρό γενικά. Χαλάρο εμφανίζεται γενικά το φωτοσυνθετικό παρέγχυμα του φύλλου, ιδιαίτερα στην αρχή της άνοιξης που χαρακτηρίζεται από πολύ μεγάλους μεσοκυττάρους χώρους (Εικόνα **15** B). Επίσης, στα χειμωνιάτικα φύλλα, τα κύτταρα φαίνονται γενικά μικρότερα (Εικόνα **14**). Αυτό μπορεί να εξηγήσει το ότι το έλασμα του φύλλου είναι πιο λεπτό το χειμώνα από ότι το καλοκαίρι. Το σπογγώδες παρέγχυμα, καταλαμβάνει μεγάλο μέρος του μεσόφυλλου. Τα στόματα είναι σχετικά υπερυψωμένα (Εικόνα **13** A,B, Εικόνα **14** B). Δε φαίνεται να υπάρχουν αναπτυγμένοι μηχανικοί-στηρικτικοί ιστοί, εκτός από περιορισμένης έκτασης κολέγχυμα που σχηματίζεται εκατέρωθεν της κεντρικής δεσμίδας κατά την πλήρη ωρίμανση-γήρανση των καλοκαιρινών φύλλων. Αυτό παρατηρήθηκε στα τέλη Ιουλίου.

Επίσης κατά τους καλοκαιρινούς μήνες φαίνεται να συγκεντρώνονται φαινολικά συστατικά γενικά (σκούρο χρώμα), κυρίως στα επιδερμικά κύτταρα (Εικόνα 17 Β).

Τα κύτταρα του μεσόφυλλου φαίνεται να συσσωρεύουν *ελαιοσταγονίδια* των οποίων ο αριθμός και το μέγεθος ποικίλει ανάλογα με τις εποχές. Έτσι, κατά τη διάρκεια του χειμώνα αυτά είναι πού περιορισμένης έκτασης (σχεδόν ανύπαρκτα) (Εικόνα 14 Γ,Δ, Εικόνα 15 Δ,Ε), λίγο πριν την άνθιση αρχίζουν να συγκεντρώνονται και τους καλοκαιρινούς μήνες έως τις αρχές του φθινοπώρου απαντώνται σε μεγάλο βαθμό στα κύτταρα του μεσόφυλλου (Εικόνα 16 Ε,Ζ, Εικόνα 17, Εικόνα 20). Αυτά τα *ελαιοσταγονίδια* χρωματίζονται με *nadi* και *sudan* IV, κάτι που δείχνει ότι είναι λιπαρής φύσης όπως *τερπένια*, *έλαια* και *λιπαρά οξέα*. Επίσης, δεν αποστάζονται. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι αυτά τα *ελαιοσταγονίδια* τους καλοκαιρινούς μήνες φαίνονται σαν να παρατάσσονται κάτω από την άνω επιδερμίδα και δίνουν την αίσθηση ότι δημιουργούν ένα συνεχόμενο στρώμα (Εικόνα 10). Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης φαίνεται να στερούνται μεμβράνης και πολλές φορές να βρίσκονται σε στενή επαφή με τους *χλωροπλάστες* και τους *αμυλόκοκκους* (Εικόνα 29).

Επίσης, πολυάριθμοι κρύσταλλοι διαφόρων τύπων παρατηρούνται, συνήθως σε κύτταρα της επιδερμίδας αλλά και εντός ή εκτός των κυττάρων του μεσόφυλλου, στον υποστοματικό χώρο (Εικόνα 18 Η) και μέσα στα ιδιόβλαστα κύτταρα - κοιλότητες που αναφέρονται παραπάνω και πολλές φορές φθορίζουν πορτοκαλί (Εικόνα 16 Γ, Εικόνα 18 Α-Μ). Μάλιστα φαίνεται πως αυτά πληθαίνουν το καλοκαίρι περίπου όσο παλιότερο είναι το φύλλο.

Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό του φύλλου είναι η παρουσία ιδιόβλαστων *ελαιοκυττάρων* ή *κοιλοτήτων* που παρατηρούνται στο μεσόφυλλο, συνήθως πάνω από τις δευτερεύουσες αγγειακές δεσμίδες (προς την προσαξονική επιφάνεια). Σε τομές νωπού αλλά και ημίλεπτες τομές μονιμοποιημένου ιστού φύλλων, αυτές οι κοιλότητες εμφανίζονται κυρίως ως σφαιρικοί χώροι και συνδέονται με το κορυφαίο στοιχείο του ξύλου (Εικόνα 21 Α-Δ). Τα κυτταρικά τους τοιχώματα βάφονται έντονα με *Sudan* IV (Εικόνα 16 Ζ, Εικόνα 20 Ε). Με τη μικροσκοπία φθορισμού γίνεται σαφές ότι τα κυτταρικά τοιχώματα είναι ιδιαίτερα εμποτισμένα σε *κουτίνη* ή *σουβερίνη* (Εικόνα 21 Ζ,Η, Εικόνα 15 Ζ).

Παρατηρώντας εγκάρσιες τομές και σειρά εφαπτομενικών τομών μπορούμε να υποθέσουμε ότι αυτές οι κοιλότητες προσανατολίζονται από τα παρεγχυματικά κύτταρα της δεσμίδας του κολεού. Μάλιστα, έχει διαπιστωθεί ότι τουλάχιστον ορισμένες φορές ακολουθούν μία συνεχόμενη διάταξη (Εικόνα 24). Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι είναι τροποποιημένα κύτταρα κολεού (Εικόνα 23, Εικόνα 22 Ζ). Σε τομές κάθετες στις δεσμίδες κολεού, το ανώτατο κύτταρο του κολεού φαίνεται να είναι πολύ πιο μεγάλο και με τα χαρακτηριστικά τοιχώματα αυτών των κοιλοτήτων. Μερικές φορές, παρατηρούνται προεκτάσεις αυτών των τροποποιημένων κυττάρων-κοιλοτήτων, δηλαδή συναθροίζονται τέτοιοι χώροι και δημιουργούν μεγαλύτερους οβάλ σχηματισμούς, στις παρυφές των φύλλων (Εικόνα 25, Εικόνα 22 Ε). Σε αυτούς τους χώρους φαίνεται πως συσσωρεύονται κάποια

λιπόφιλα συστατικά που βάφονται με το sudan IV, nadi και με το nile blue δίνουν κόκκινο χρωματισμό. Τα εκκρίματα αυτά με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης στα διάφορα δείγματα που παρασκευάσαμε, εμφανίζονται με διαφορετική εικόνα (Εικόνα 22 Α-Δ). Κάποιες εποχές εμφανίζονται να έχουν έχουν υφή σπογγώδη άλλες φορές κοκκιώδη και μερικές φορές πιο συμπαγή υφή (θυμίζουν τυρί με τρύπες!). Σε ορισμένες εικόνες φαίνεται σαν τα εκκρίματα τους να συγκεντρώνονται σε μια χυμοτοπιακή κατασκευή της οποίας ο όγκος μεγαλώνει προοδευτικά (Εικόνα 21 Β,Γ,Η).

Επίσης, παρόμοιες δομές (Εικόνα 26 Α-Ζ) παρατηρούνται ανάμεσα στα κύτταρα του αποταμιευτικού παρεγχύματος που βρίσκεται εκατέρωθεν της κεντρικής δεσμίδας των φύλλων, χωρίς αυτές όμως να έρχονται σε επαφή με τα αγγεία του ξύλου και δε φαίνεται να ακολουθούν μία συνεχόμενη διάταξη (Εικόνα 26 Γ). Αυτά τα κύτταρα μοιάζουν πολύ με τα γειτονικά τους, αλλά τα τοιχώματα είναι αντίστοιχα με των ιδιόβλαστων ελαιοκυττάρων που αναφέρθηκαν παραπάνω (Εικόνα 26 Α,Δ). Θα μπορούσαμε να τα κατατάξουμε στα ιδιόβλαστα ελαιοκύτταρα. Με ιστοχημικές δοκιμές εμφανίζονται και αυτά να συγκεντρώνουν λιπόφιλες ουσίες αντίστοιχα.

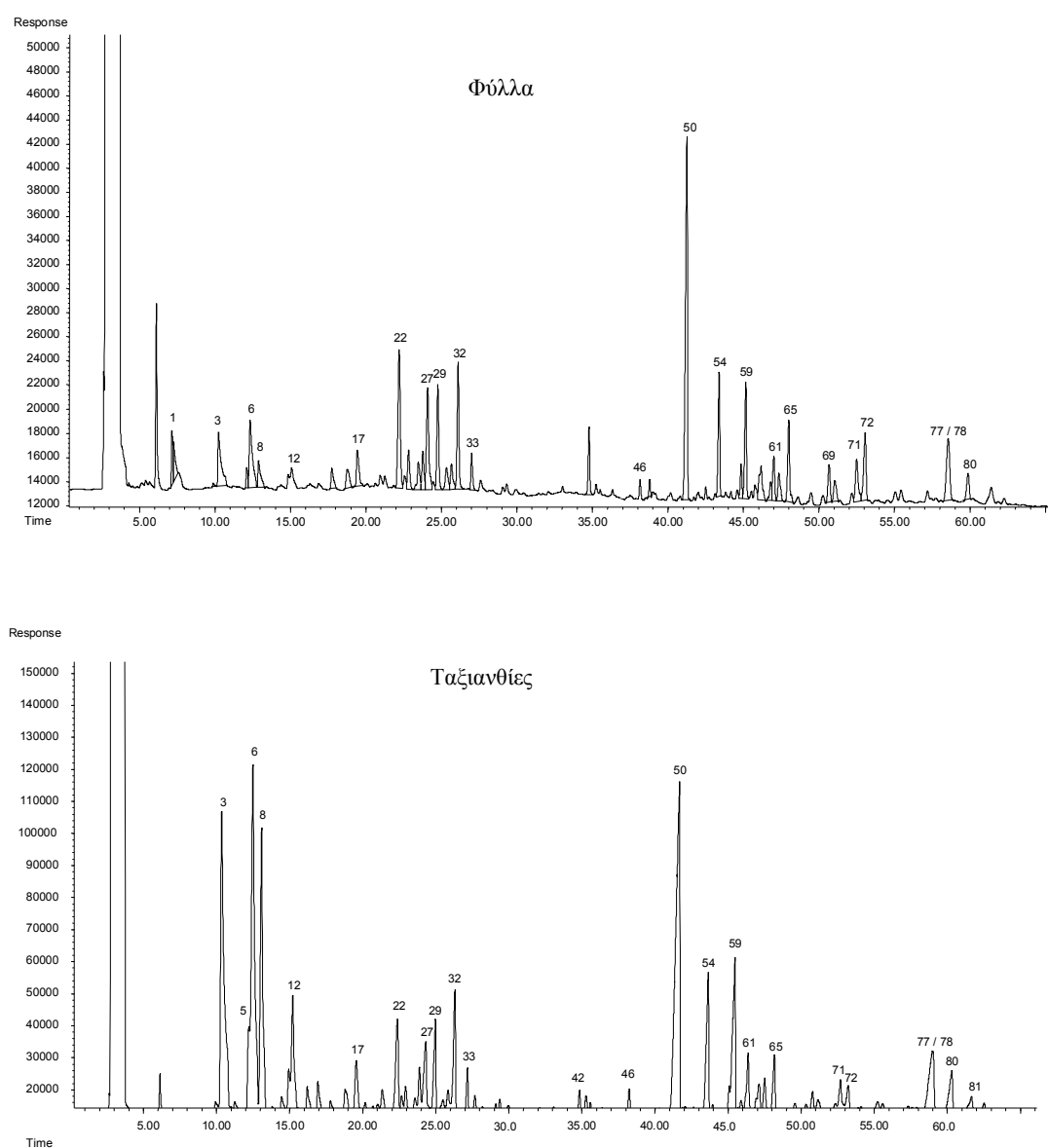
Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αυτά τα κύτταρα-κοιλότητες εμφανίζονται γενικά άδεια, χωρίς κυτόπλασμα, και πυρήνα και σπάνια απαντώνται κάποια κυτοπλασματικά οργανίδια όπως κάποια πλαστίδια (Εικόνα 27 Α,Γ). Το κυτταρικό του τοίχωμα, είναι σημαντικά λεπτότερο από αυτά των γειτονικών κυττάρων του κολεού, και είναι επενδυμένα με ένα ηλεκτρονιακά πυκνό στρώμα στο εσωτερικό, όπου πιθανότατα έχει να κάνει με τον εμποτισμό του κυτταρικού τοιχώματος με κουτίνη, ενώ από την εξωτερική πλευρά του, φαίνεται το τοίχωμα να επικαλύπτεται από ένα έντονα οσμιόφιλο στρώμα (ίσως φαινολικά) (Εικόνα 27 Β, Εικόνα 21 Δ).

Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης παρατηρούνται επίσης χαρακτηριστικές αλλαγές στους χλωροπλάστες που το χειμώνα εμφανίζονται με πολύ καλώς ανεπτυγμένα γκράνα και πολύ λίγους αμυλόκοκκους, ενώ το καλοκαίρι με λίγα και αραιά γκράνα και εξαιρετικά μεγάλους αμυλόκοκκους (Εικόνα 28 Β, Εικόνα 29 Α, Εικόνα 30 Α,Β). Ακόμα τους καλοκαιρινούς μήνες εμφανίζουν αυξημένη έκταση κάποια «ελαιοσταγονίδια» όπως αναφέρονται στη βιβλιογραφία μέσα στους χλωροπλάστες (Εικόνα 29 Β).

3.2 Χημική Ανάλυση του Αιθέριου Ελαίου του *Teucrium polium*.

Το φυτικό υλικό αποστάχθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης. Οι ανθισμένες ταξιανθίες είχαν σχεδόν τριπλάσια απόδοση σε αιθέρια έλαια (1,65%) σε σχέση με τα φύλλα (0,45%).

Τα αιθέρια ελαία των φύλλων και των ταξιανθιών του *T. polium* αναλύθηκαν ξεχωριστά, την εποχή της άνθισης (κατά τα τέλη Μαΐου), με αεριοχρωματογραφική ανάλυση. Ταυτοποιήθηκαν οι ουσίες που το συνιστούσαν και προσδιορίστηκε η εκατοστιαία περιεκτικότητά τους. Ένα τυπικό χρωματογράφημα των αιθέριων ελαίων παρουσιάζεται στο σχήμα 1.



Σχήμα 1. (GC-FID) Τυπικά αεριοχρωματογραφήματα των αιθέριων ελαίων των ταξιανθιών και των φύλλων του *Teucrium polium*, κατά την περίοδο της άνθισης.

Πίνακας 2. Χημική σύσταση των αιθέριων ελαίων του *Teucrium polium* κατά την άνθιση.

	Compounds	Συστατικά	KI*	ΦΥΛΛΑ	ΤΑΣΙΑΝΘΙΣ
1	2-Hexenal	2-Εξενάλη	855	 2,4	—
2	α-Thujene	α-Θουγένιο	930	—	 0,3
3	α-Pinene	α-Πινένιο	939	 3,0	 10,7
4	Thuja-2,4 (10)-diene	Θούγια-2,4(10)-διένιο	960	—	 0,1
5	Sabinene	Σαβινένιο	975	 0,6	 1,6
6	β-Pinene	β-Πινένιο	979	 3,7	 11,6
7	1-Octen-3-ol	1-οκτεν-3-όλη	979	v	—
8	Myrcene	Μυρκένιο	990	 1,4	 7,1
9	2-δ-Carene	2-δ-Καρένιο	1002	—	 0,2
10	α-Terpinene	α-Τερπινένιο	1017	—	 0,5
11	p-Cymene	π-Κυμένιο	1024	 0,4	 0,9
12	Limonene	Λεμονένιο	1029	 1,1	 3,1
13	z-β-Ocimene	(Z)-β-Οικιμένιο	1037	—	 0,7
14	γ-Terpinene	γ-Τερπινένιο	1059	t	 0,8
15	cis-Linalool oxide (furanoid)	cis-οξειδίο Λιναλοόλης (φουρανοειδές)	1072	 1,0	 0,4
16	trans-Linalool oxide (furanoid)	trans-οξειδίο Λιναλοόλης (φουρανοειδές)	1086	 1,3	 0,9
17	Linalool	Λιναλοόλη	1097	 2,0	 1,6
18	1-Octen-3-yl acetate	οξείκος εστέρας 1-οκτεν-3-όλης	1112	 0,3	 0,4
19	trans-Thujone	trans-θουγιόνη	1114	—	 0,2
20	dehydro Sabina ketone	αφυδρο Σαβίνα κετονη	1120	 0,4	 0,3
21	α-Campholenal	α-Καμφολενάλη	1126	 0,4	 0,7
22	trans-Pinocarveol	trans-Πινοκαρβεόλη	1139	 5,5	 2,6
23	trans-Verbenol	trans-Βερμπενόλη	1145	 0,5	 0,4
24	ισομερές του p-Metha-1,5-dien-8-ol	ισομερές του p-Μένθα-1,5-διεν-8-όλη		 1,4	 0,6
25	Sabina ketone	Σαβίνα κετόνη	1159	 1,2	 0,4
26	Pinocarvone	Πινοκαρβόνη	1164	 1,3	 1,0
27	p- Metha-1,5-dien-8-ol	p-Μένθα-1,5-διεν-8-όλη	1170	 4,2	 2,1
28	Umbellulone	Ουμπελουλόνη	1171	—	t
29	Terpinen-4-ol	Τερπινέν-4-όλη	1177	 3,3	 2,0
30	p-Cymen-8-ol	π-Κυμεν-8-όλη	1182	 1,0	 0,4
31	α-Terpineol	α-Τερπινεόλη	1188	 1,1	 0,6
32	Myrtenol	Μυρτενόλη	1195	 4,0	 2,6
33	Verbenone	Βερμπενόνη	1205	 1,0	 0,8
34	trans-Carveol	trans-Καρβεόλη	1216	 0,5	 0,4
35	Nerol	Νερόλη	1229	t	 0,1
36	Cumin aldehyde	Κυμιναλδεΐδη	1241	 0,3	 0,2
37	Carvone	Καρβόνη	1243	 0,4	 0,2
38	trans-Sabinene hydrate acetate	trans-οξείκος εστέρας του Υδροσαβινενίου	1256	—	 0,1
39	p-cymen-7-ol	π-κυμεν-7-όλη	1290	—	 0,1
40	Thymol	Θυμόλη	1290	t	—
41	Carvacrol	Καρβακρόλη	1299	 0,3	 0,1
42	Myrtenyl acetate	οξείκος εστέρας της Μυρτενόλης	1326	 1,9	 0,4
43	p- Mentha 1,4 dien-7-ol	p-Μένθα-1,4-διεν-7-όλη	1327	 0,4	 0,4
44	δ-Elemene	δ-Ελεμένιο	1338	 0,3	 0,1
45	α-Cubebene	α-Κουμπεμπένιο	1348	—	 0,1
46	α-Copaene	α-Κοπαένιο	1376	 0,5	 0,4
47	β-Bourbonene	β-Βουρμπορένιο	1388	 0,6	t
48	β-Cubebene	β-Κουμπεμπένιο	1388	 0,3	—
49	β-Elemene	β-Ελεμένιο	1390	—	 0,2
50	E-β-Caryophyllene	β-Καρυοφυλλένιο	1419	 12,0	 13,3
51	β-Copaene	β-Κοπαένιο	1432	—	 0,1
52	trans-α-Bergamotene	trans-α-Μπεργαμοτένιο	1434	 0,4	 0,2
53	z-β-Farnesene	z-β-Φαρνεσένιο	1442	 0,3	 0,1
54	α-Humulene	α-Χουμουλένιο	1454	 3,6	 3,4
55	allo-Aromadendrene	αλλο-Αρομαδενδρένιο	1460	 0,3	 0,2

56	α -Acoradiene	α -Ακοραδιένιο	1466	t	0,1
57	trans-Cadina-1(6),4 diene	trans-Καδινα-1(2)-4-διένιο	1476	0,3	0,1
58	γ -Curcumene	γ -Κουρκουμένιο	1482	1,0	0,5
59	D-Germacrene	D-Γερμακρένιο	1485	3,6	4,3
60	γ -Amorphene	γ -Αμορφένιο	1495	0,8	0,3
61	Bicyclogermacrene	Δικυκλογερμακρένιο	1500	2,2	1,5
62	β -Bisobolene	β -Μπισομπολένιο	1505	0,8	0,3
63	β -Curcumene	β -Κουρκουμένιο	1515	1,7	0,7
64	γ -Cadinene	γ -καδινένιο	1513	1,4	0,8
65	δ -Cadinene	δ -Καδινένιο	1523	3,0	1,4
66	trans-Cadina-1(2),4 diene	trans-Καδινα-1(2)-4-διένιο	1534	0,4	0,2
67	α -Calacorene	α -Καλακορένιο	1545	0,8	0,3
68	cis-Sesquisabinene hydrate	cis-Υδροσεσκισαβινένιο	1544	0,4	0,3
69	* unidentified	μη ταυτοποιημένη 2		1,5	0,6
70	* unidentified	μη ταυτοποιημένη 3		1,1	0,5
71	trans-Sesquisabinene hydrate	trans-Υδροσεσκισαβινένιο	1579	2,3	1,0
72	Caryophyllene oxide	οξείδιο του καρυοφυλλένιου	1583	3,0	0,8
73	Humulene epoxide II	εποξείδιο του Χουμουλενίου	1608	0,6	0,3
74	1-epi-Cubenol	1-epi-Κουμπενόλη	1628	0,5	0,2
75	α -Acorenol	α -Ακορενόλη	1633	t	0,2
76	β -Acorenol	β -Ακορενόλη	1637	–	0,2
77	epi- α -Cadinol	epi- α -Καδινόλη	1640	4,1	2,2
78	epi- α -Murolol	epi- α -Μουουρολόλη	1642		0,9
79	α -Murolol	α -Μουουρολόλη	1646	t	0,1
80	α -Cadinol	α -Καδινόλη	1654	1,2	1,7
81	epi- β -Bisabolol	epi- β -Μπισαμπολόλη	1671	1,2	0,7
82	Cadalene	Καδαλένιο	1676	t	t
83	Mustakone	Μυστακόνη	1677	0,3	0,3
ΣΥΝΟΛΑ			97,1		96,3

*K.I. = Kovats index βιβλιογραφίας, για μη πολικές στήλες, σύμφωνα με τον R.B. Adams. (Adams 2001)

*Το 1-οκτεν-3-όλη συνεκλύεται με το β -πινένιο. Εκτιμούμε ότι συμμετέχει σε μικρή ποσότητα και το ποσοστό που αναγράφεται στον πίνακα είναι το συνολικό.

*Τα epi- α -καδινόλη / epi- α -μουουρολόλη συνεκλύονται στην περίπτωση του δείγματος των φύλλων.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 2. Να σημειωθεί ότι η αρίθμηση των αεριοχρωματογραφημάτων του σχήματος 1, αναφέρεται στον πίνακα 2.

Από την ανάλυση των αιθέριων ελαίων των **φύλλων** κατά την περίοδο της άνθισης, προσδιορίστηκαν 62 συστατικά, τα οποία αντιπροσωπεύουν το 97,1% του συνόλου των ουσιών του δείγματος. Το αιθέριο έλαιο αποτελούνταν κυρίως από σεσκιτερπένια (48%) και μονοτερπένια (41,9%). Ειδικότερα, κυριάρχησαν τα σεσκιτερπένια τα οποία καταλαμβάνουν το 34,3% του συνόλου των ουσιών και ακολούθησαν τα οξυγονωμένα μονοτερπένια με ποσοστό 31,7% (και συνυπολογίζοντας τους οξικούς εστέρες μονοτερπενίων, φτάνει το 33,6%). Το κύριο συστατικό των αιθέριων ελαίων είναι το β-καρνοφυλλένιο με ποσοστό 12,0% και ακολουθεί το trans-πινोκαρβεόλη με ποσοστό 5,5%. Ακολουθούν η p-μένθα-1,5-διεν-8-όλη (4,2%) και η μυρτενόλη (4,0%) ενώ όλα τα υπόλοιπα συστατικά βρέθηκαν να είναι σε ποσοστό κάτω από 4%.

Από τα συστατικά των αιθέριων ελαίων των ανθισμένων **ταξιανθιών**, προσδιορίστηκαν τα 76 που αποτελούν το 96,3% του συνόλου των ουσιών του δείγματος. Το αιθέριο έλαιο αποτελούνταν κυρίως από μονοτερπένια (56,6%) και σεσκιτερπένια (37,8%). Σε αυτή την περίπτωση κυριαρχούν τα μονοτερπένια (37,7%) και ακολουθούν τα σεσκιτερπένια (28,4%). Το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου είναι το β-καρνοφυλλένιο με ποσοστό 13,3% μαζί με τα β-πινένιο (11,6%) και α-πινένιο (10,7%), ενώ ακολουθούν τα μυρκενίο (7,1%) και D-γερμακρένιο (4,3%). Τα υπόλοιπα συστατικά βρέθηκαν σε ποσοστό χαμηλότερο του 4%.

Τα αιθέρια έλαια των ταξιανθιών και των φύλλων του *T. polium* κατά την περίοδο της άνθισης έχουν το ίδιο κύριο συστατικό (β-καρνοφυλλένιο). Στη συντριπτική πλειοψηφία τους τα συστατικά που συνιστούν τα αιθέρια έλαια είναι τα ίδια. Ωστόσο, ανιχνεύονται σε διαφορετικές αναλογίες. Από τις ουσίες που υπάρχουν στο αιθέριο έλαιο των φύλλων σε αξιόλογο ποσοστό, μόνο η 2-εξενάλη δεν ανιχνεύεται στο αιθέριο έλαιο των ταξιανθιών. Στον πίνακα 3 συγκρίνονται τα κυριότερα συστατικά των αιθέριων ελαίων των ταξιανθιών και των φύλλων του *T. polium*, κατά την περίοδο της άνθισης.

Στον πίνακα 4, παρουσιάζονται οι κύριες κατηγορίες ενώσεων των συστατικών και τα ποσοστά συμμετοχής τους στη σύσταση του κάθε αιθέριου ελαίου. Επίσης, αναφέρονται οι κυριότεροι εκπρόσωποι των ομάδων. Στο σχήμα 2 δίνονται τα φάσματα μάζας των β-καρνοφυλλένιο, α-πινένιο και β-πινένιο που είναι τα κυριότερα συστατικά των αιθέριων ελαίων, και η δομή τους. Επίσης δίνεται ένα φάσμα μάζας για τα μη ταυτοποιημένα συστατικά 2, 3 (Σχήμα 3). Τα φάσματα μάζας αυτών των δύο συστατικών είναι πανομοιότυπα, και φαίνεται ότι πρόκειται για δύο ισομερείς ενώσεις {φασματομετρικά δεδομένα: 138 (100), 96 (89), 109 (70), 95 (68), 41 (47), 110 (46), 67 (45), 81 (43), 79 (38), 55 (35), 82 (33), 121 (31)}. Τέλος, το φάσμα μάζας του μη ταυτοποιημένου συστατικού 1, είναι πανομοιότυπο με αυτό της p-Μένθα-1,5-διεν-8-όλης και έτσι ερχόμαστε στην υπόθεση

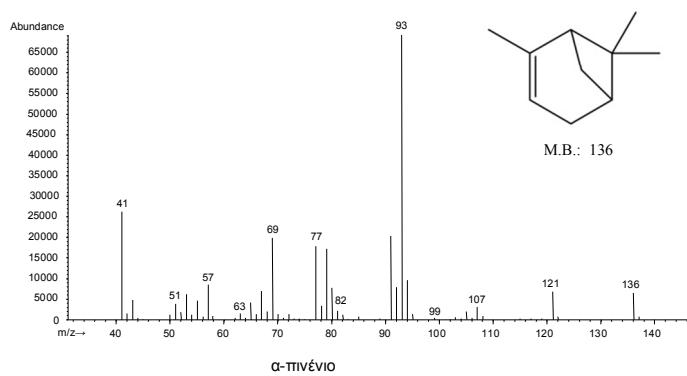
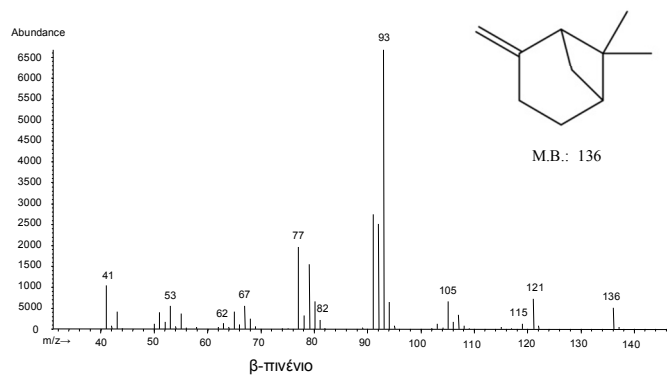
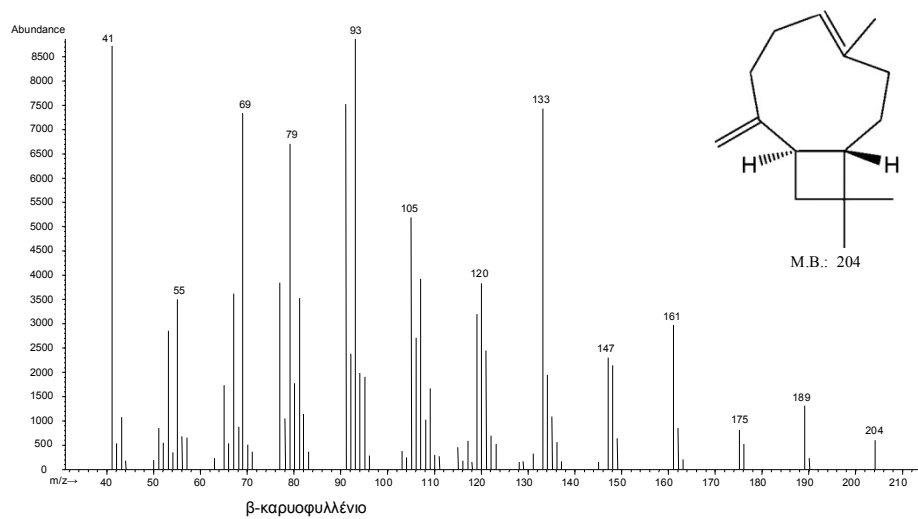
ότι είναι κάποιο ισομερές αυτής της ένωσης {φασματομετρικά δεδομένα: 59 (100), 94 (91), 79 (81), 91 (43), 43 (33), 77 (28), 92 (13), 41 (12)}.

Πίνακας 3. Συγκριτικός πίνακας των κυριότερων συστατικών των αιθέριων ελαίων των ταξιανθιών και των φύλλων του *Teucrium polium*, κατά την περίοδο της άνθισης.

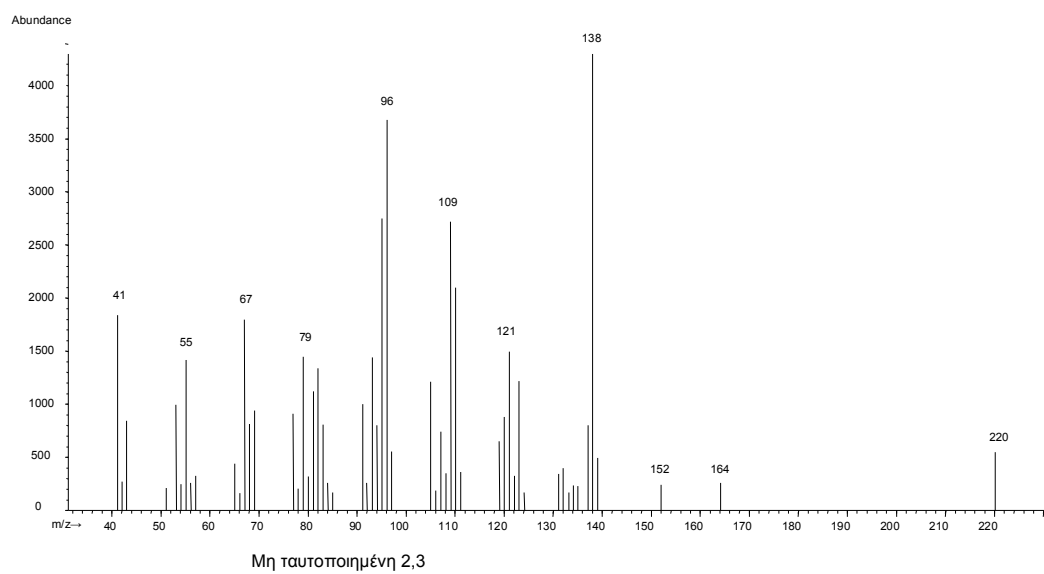
	Compounds	Συστατικά	KI	ΦΥΛΛΑ	ΤΑΞΙΑΝΘΙΕΣ
1	2-Hexenal	2-Εξενάλη	855	 2,4	—
2	α-Pinene	α-Πινένιο	939	 3,0	10,7
3	β-Pinene	β-Πινένιο	979	 3,7	11,6
4	Myrcene	Μυρκένιο	990	 1,4	7,1
5	trans-Pinocarveol	trans-Πινοκαρβεόλη	1139	 5,5	2,6
6	p- Metha-1,5-dien-8-ol	p-Μένθα-1,5-διεν-8-όλη	1170	 4,2	2,1
7	Myrtenol	Μυρτενόλη	1195	 4,0	2,6
8	E-β-Caryophyllene	β-Καρυοφυλλένιο	1419	 12,0	13,3
9	α-Humulene	α-Χουμουλένιο	1454	 3,6	3,4
10	D-Germacrene	D-Γερμακρένιο	1485	 3,6	4,3

Πίνακας 4. Κύριες κατηγορίες ενώσεων που ανιχνεύτηκαν στα φύλλα και τις ανθισμένες ταξιανθίες την περίοδο της άνθισης.

Κατηγορία Ενώσεων	Ποσοστό (%)	
	ΦΥΛΛΑ	ΤΑΞΙΑΝΘΙΕΣ
μονοτερπένια α-Πινένιο, β-Πινένιο, Λεμονένιο, Μυρκένιο, Σαβινένιο	10,2	37,7
οξυγονωμένα μονοτερπένια trans-Πινοκαρβεόλη, p-Μένθα-1,5-διεν-8-όλη, Τερπινέν-4-όλη, Μυρτενόλη, Λιναλοόλη	31,7	19,0
οξικοί εστέρες μονοτερπενίων οξικός εστέρας της Μυρτενόλης	1,9	0,5
σεσκιτερπένια β-Καρυοφυλλένιο, α-Χουμουλένιο, D-Γερμακρένιο, δ-Καδινένιο, Δικυκλογερμακρένιο, β-Κουρκουμένιο	34,3	28,4
οξυγονωμένα σεσκιτερπένια επι-α-Καδινόλη, οξείδιο του καρυοφυλλένιου, trans-Υδροσεσκισαβινένιο, α-Καδινόλη	13,7	9,3
άλλες ενώσεις 2-Εξενάλη, οξικός εστέρας 1-οκτεν-3-όλης	2,7	0,4



Σχήμα 2. Τα φάσματα μάζας και οι δομές των κυριότερων συστατικών των αιθέριων ελαίων του *T. polium*.

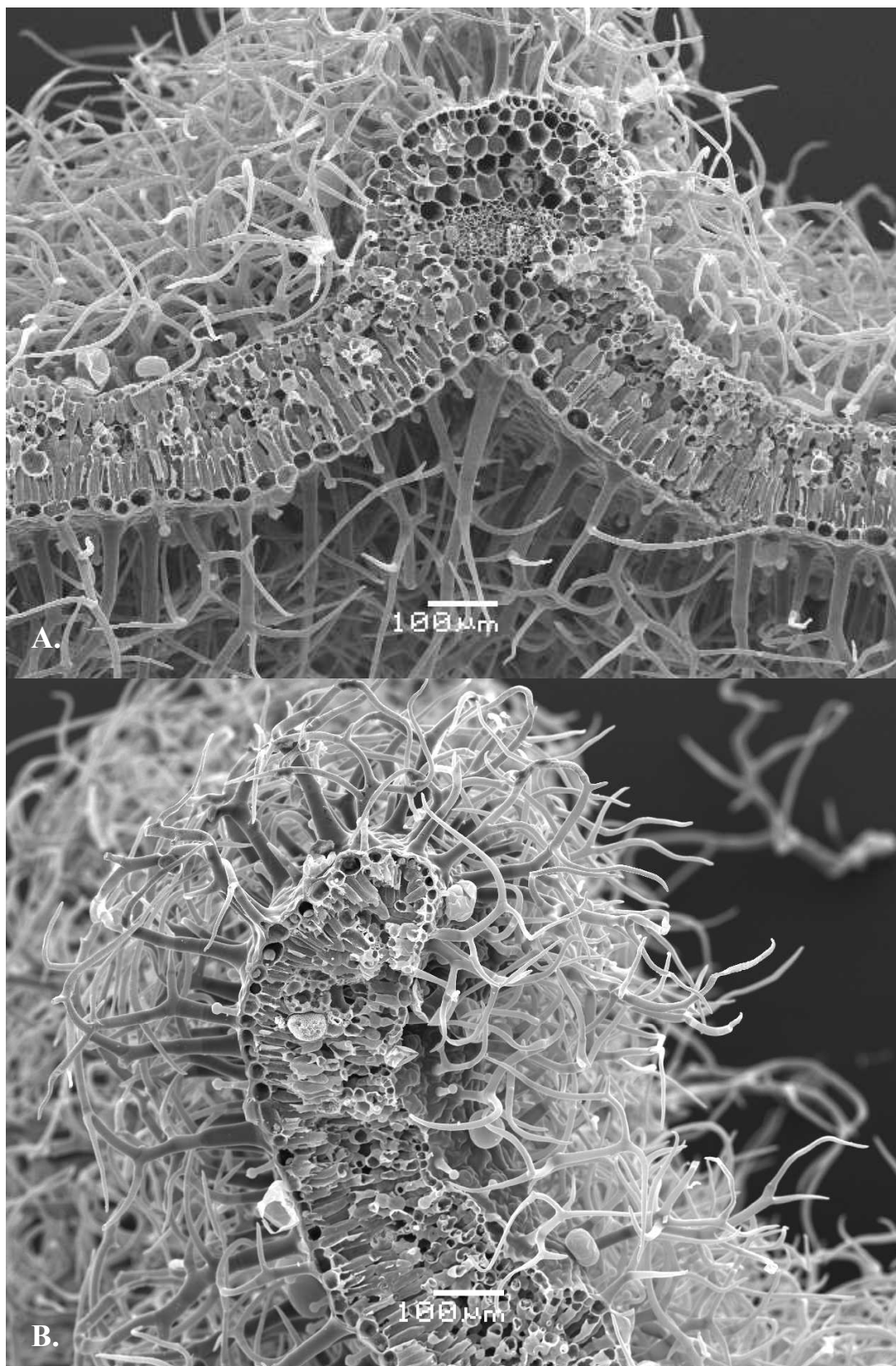


Σχήμα 3. Το φάσμα μάζας των μη ταυτοποιημένων συστατικών. Τα φάσματα μάζας αυτών των δύο συστατικών είναι πανομοιότυπα, και φαίνεται ότι πρόκειται για δύο ισομερείς ενώσεις.

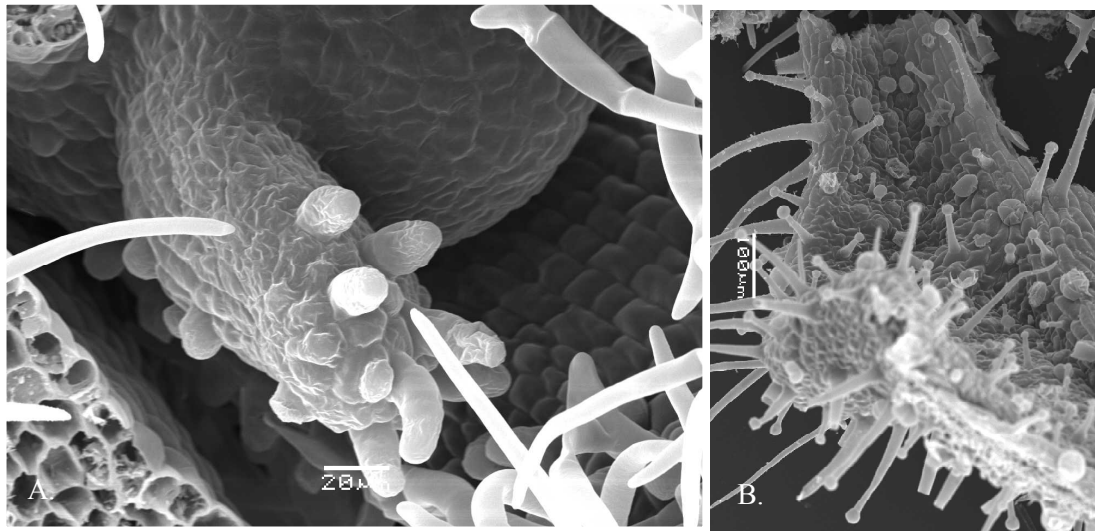
3.3 ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ



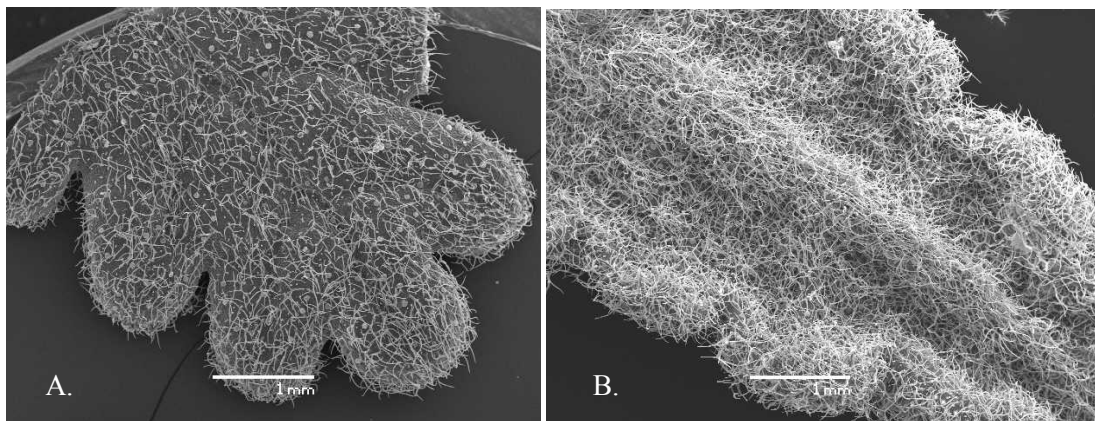
Εικόνα 3 A-Z: Μακροσκοπικές φωτογραφίες του *T. polium* σε διάφορες εποχές.



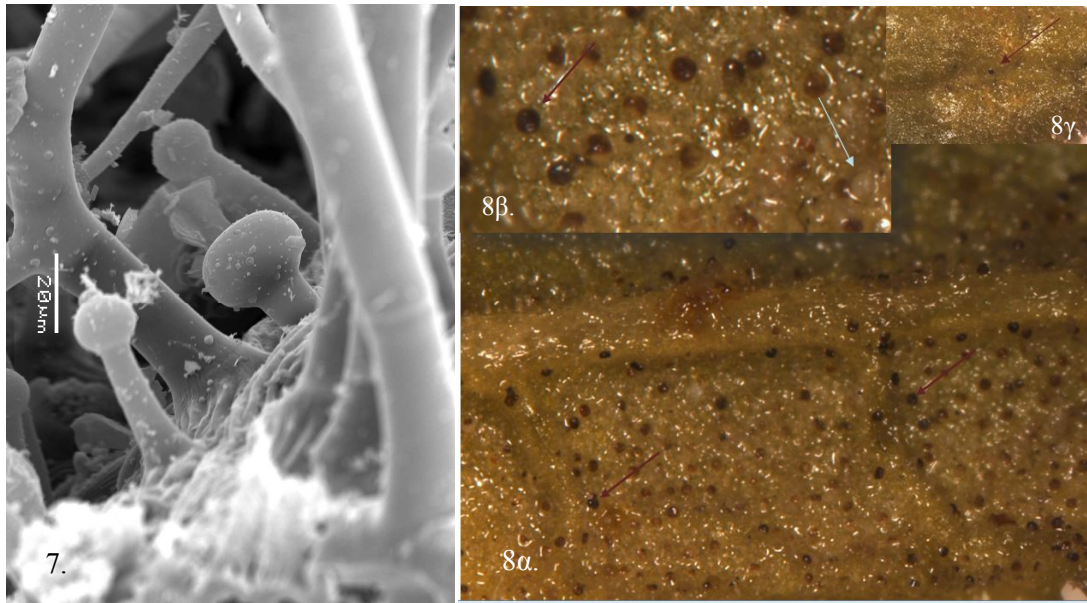
Εικόνα 4 **A-B**: Εγκάρσιες τομές φύλλου όπως φαίνονται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Οι μη αδενώδεις τρίχες πλέκονται σχηματίζοντας ένα σχεδόν ενιαίο φράγμα προστασίας το οποίο συνιστά την πρώτη στρώση του τριχώματος.



Εικόνα 5. Α: Εμβρυακό φύλλο και Β: φύλλο σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης, όπως φαίνονται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Παρατηρείται η πλήρη έλλειψη αδενωδών τριχωμάτων από τα εμβρυακά φύλλα. Σε λίγο μεγαλύτερα φύλλα, αναπτύσσονται ασπιδοειδείς και μακριές κεφαλοειδείς αδενώδεις τρίχες.

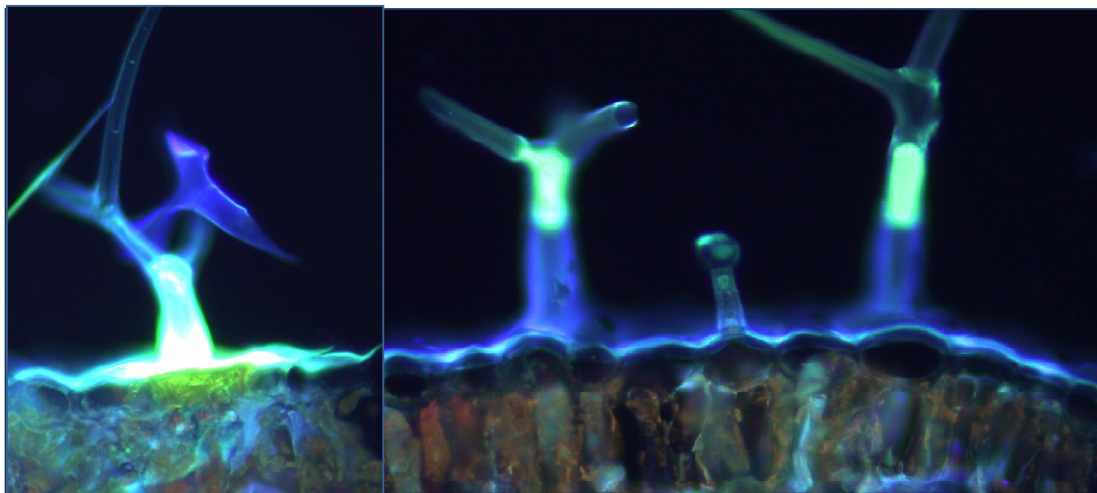


Εικόνα 6. Α.: Προσαξονική επιφάνεια χειμωνιάτικου φύλλου και Β. Αποαξονική επιφάνεια καλοκαιρινού φύλλου, όπως φαίνονται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Παρατηρείται ότι τα χειμωνιάτικα φύλλα είναι περισσότερο ευθυτενή και έχουν λιγότερο τρίχωμα από τα καλοκαιρινά.



Εικόνα 7: Η δεύτερη στρώση του τριχώματος βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια της επιδερμίδας και σχηματίζεται από αδενώδη τριχίδια. Το εξωτερικό στρώμα των μη αδενωδών τριχών φαίνεται να προστατεύει το εσωτερικό.

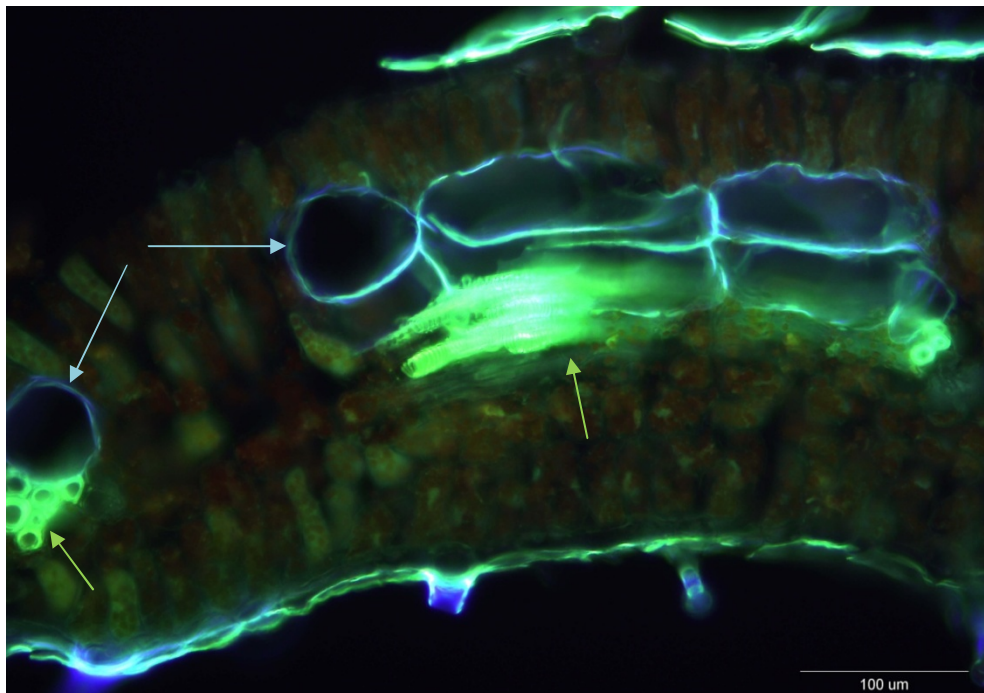
Εικόνα 8: Χρώση με 4-νιτροσοφαινόλη σε πυκνό H_2SO_4 . 8α., 8β. αποαζονική και 8γ. προσαζονική επιφάνεια. Παρατηρήθηκε άμεση αλλαγή στο χρώμα των περισσότερων ασπιδοειδών αδένων, οι οποίοι βρίσκονται κυρίως στην αποαζονική επιφάνεια. Η παρατήρηση έγινε με το στερεοσκόπιο.



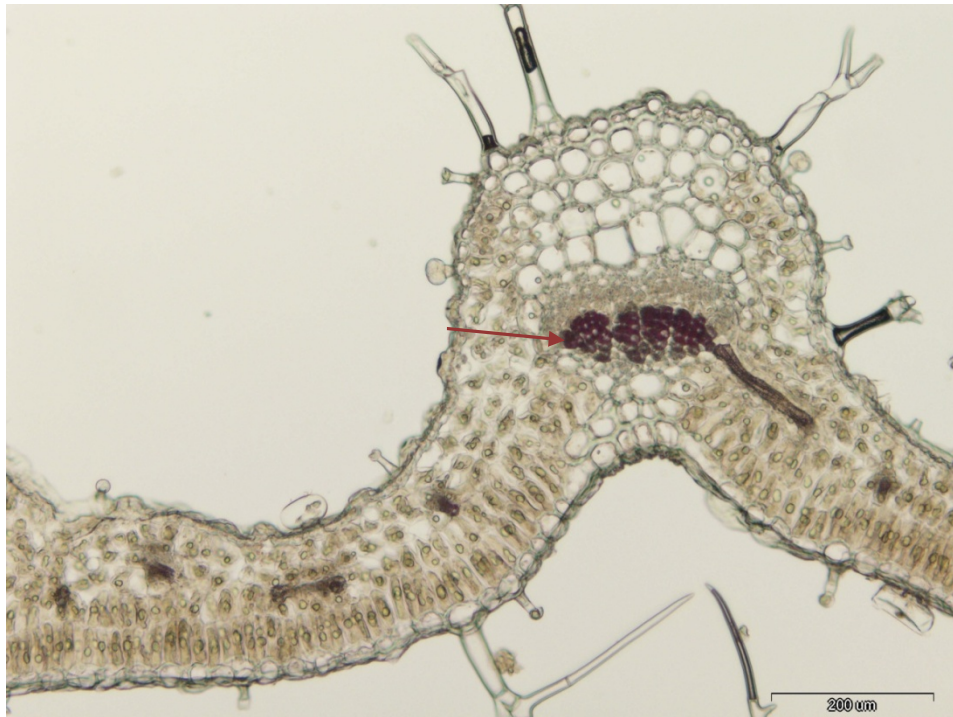
Εικόνα 9: Οι μη αδενώδεις τρίχες συνήθως νεκρώνονται, αφού πρώτα, κατά την ανάπτυξη τους, συσσωρεύονται σε αυτές δευτερογενείς μεταβολίτες που θα μπορούσε να είναι φλαβονοειδή ή φαινολικά, όπως φαίνεται με τη μικροσκοπία φθορισμού.



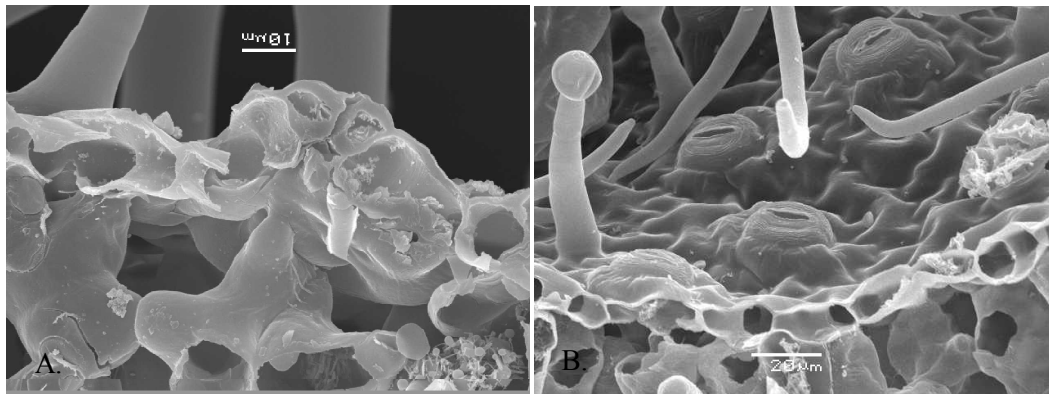
Εικόνα 10: Εγκάρσια τομή νωπού φύλλου κατά το Σεπτέμβριο με χρώση με Sudan IV. Παρατηρούνται τα ελαιοσταγονίδια που φαίνονται σαν να παρατάσσονται κάτω από την άνω επιδερμίδα και δίνουν την αίσθηση ότι δημιουργούν ένα συνεχόμενο στρώμα. Η παρατήρηση έγινε με το οπτικό μικροσκόπιο.



Εικόνα 11: Εγκάρσια τομή σε νωπό παρασκεύασμα που είχε χειριστεί με λουσιφερίνη. Η χρωστική ακολουθώντας την ανοδική πορεία του νερού, τόσο αποπλάσμικά όσο και συμπλάσμικά, δίνει χαρακτηριστικό *κίτρινο* φθορισμό σε όλους τους ιστούς στους οποίους κινήθηκε το νερό. Παρατηρείται κίτρινος φθορισμός στα αγγεία του ξύλου ενώ αρνητική ήταν η χρώση των ιδιόβλαστων χώρων οι οποίοι φθορίζουν γαλάζια λόγω της κουτίνης.

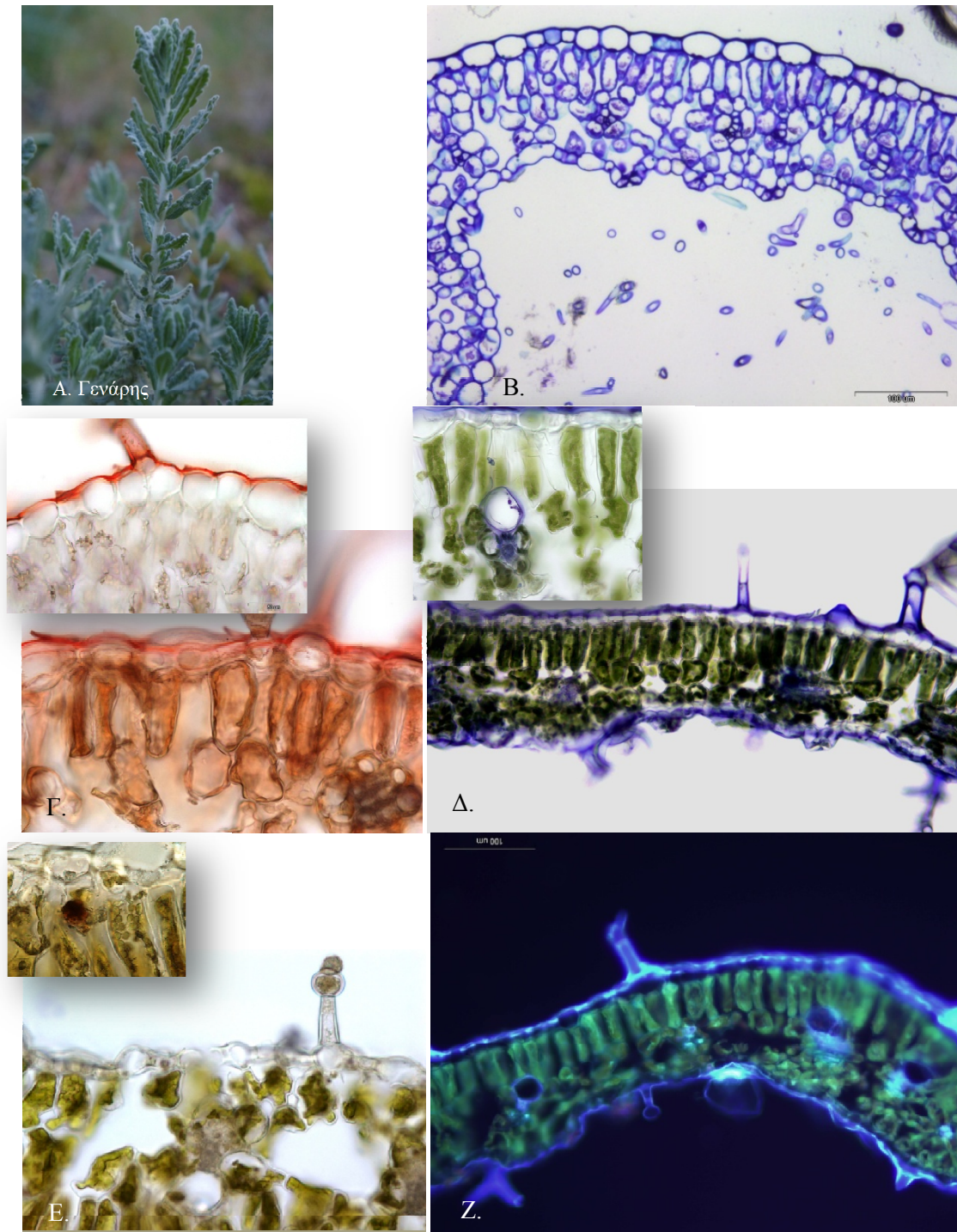


Εικόνα 12: Εγκάρσια τομή σε νωπό παρασκεύασμα και χρώση με φλωρογλυκίνη. Χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό της λιγνίνης. Θετική χρώση έδωσαν μόνο τα αγγεία του ξύλου. Η παρατήρηση έγινε με το οπτικό μικροσκόπιο.



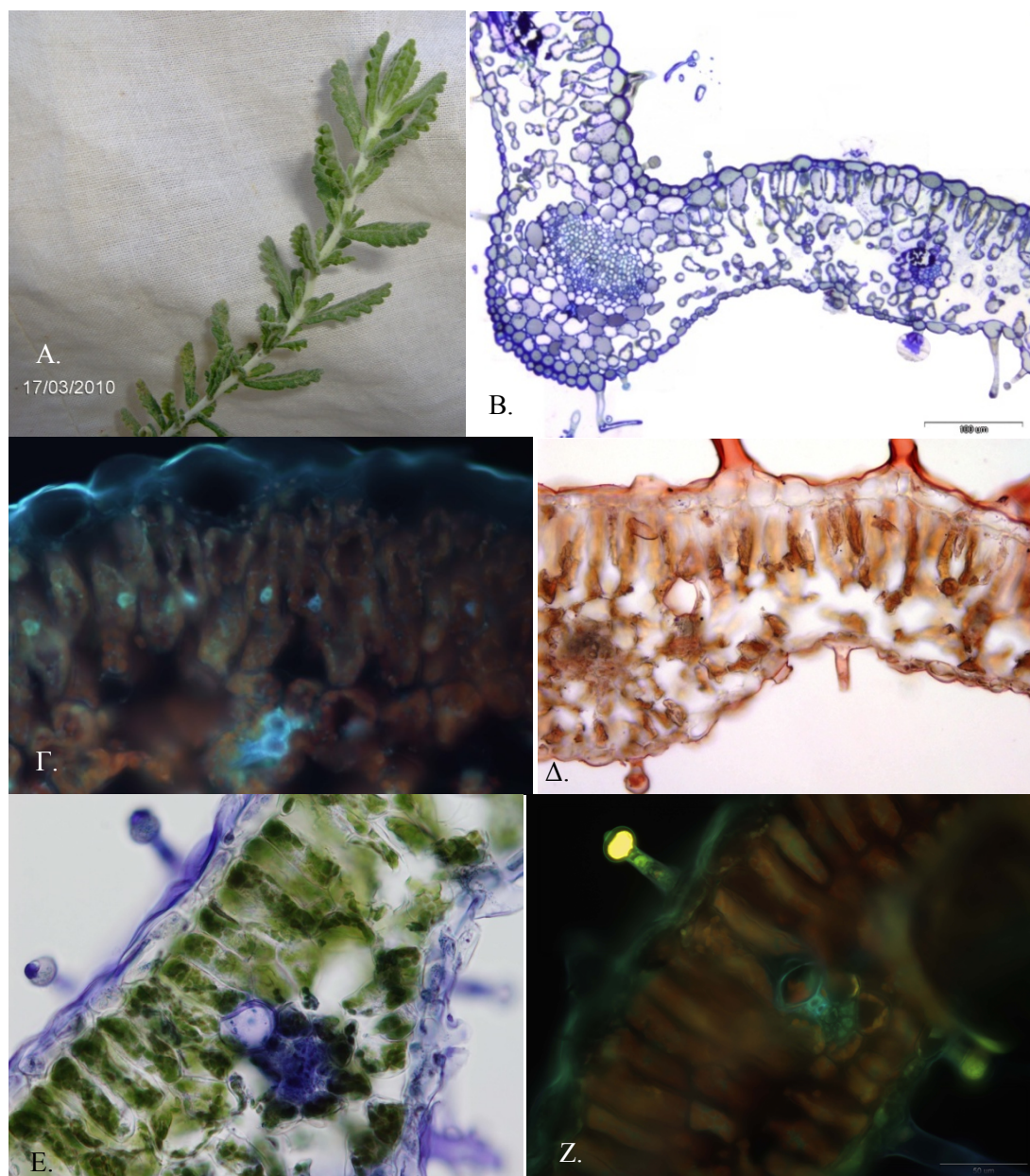
Εικόνα 13. **A,B:** Τα υπερυψωμένα στομάτια στην αποαξονική πλευρά των φύλλων του *T. polium*, όπως φαίνονται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

3.3.1 Χειμώνας. (Ιανουάριος)



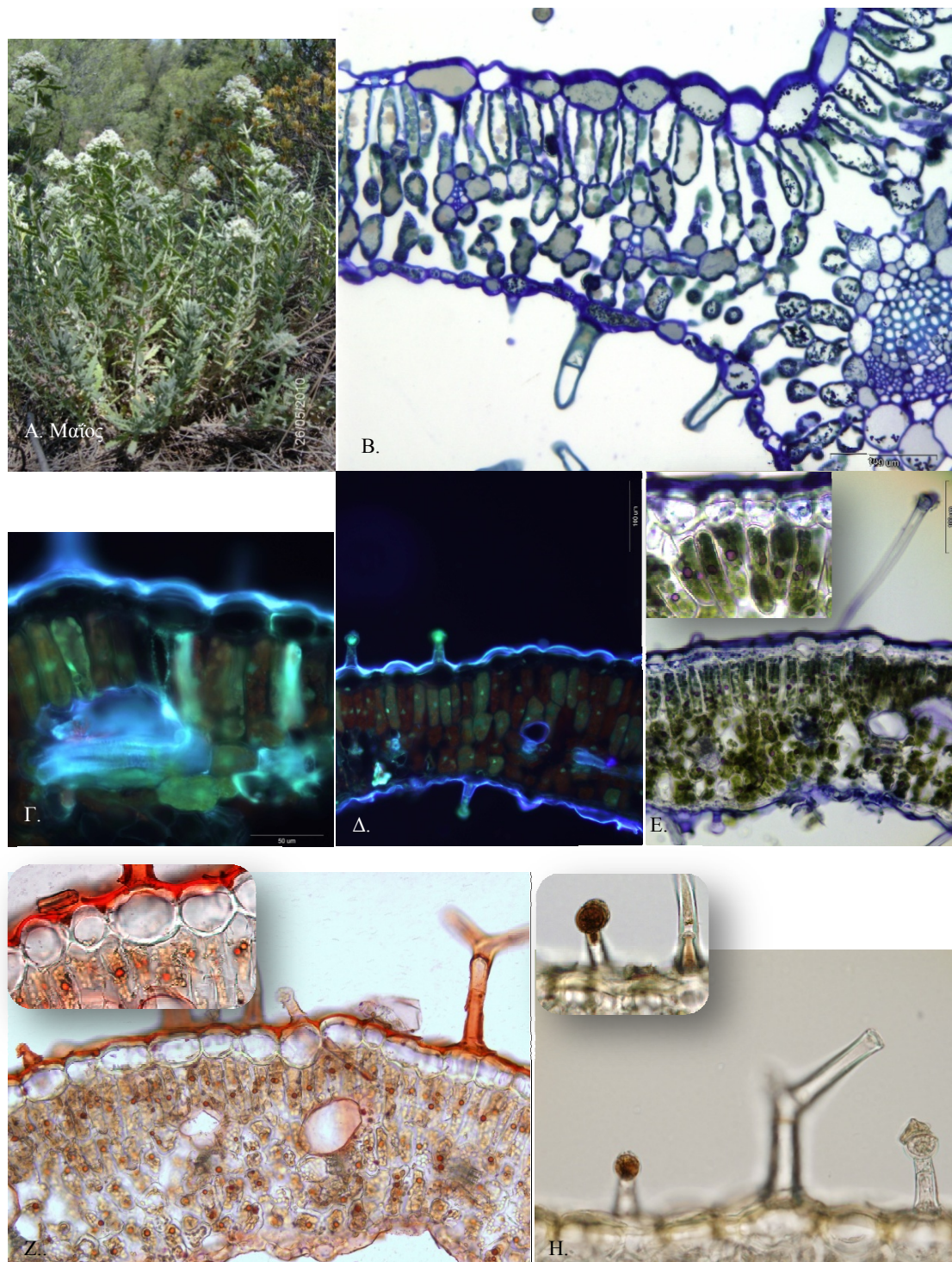
Εικόνα 14. Μακροσκοπική φωτογραφία βλαστού (Α) και εγκάρσιες τομές φύλλων του *T. polium* τον Ιανουάριο. Β: εγκάρσια ημίλεπτη τομή φύλλου, Γ: εγκάρσια τομή σε νωπό παρασκεύασμα και χρώση με sudan IV, Δ: εγκάρσια τομή σε νωπό παρασκεύασμα και χρώση με nadi, Ε: εγκάρσια τομή σε νωπό παρασκεύασμα και χρώση με FeSO₄, Ζ: Αυτοφθορισμός εγκάρσιας τομής νωπού παρασκευάσματος. Παρατηρείται το μικρό πάχος του ελάσματος, η απουσία ελαιοσταγονιδίων από το μεσόφυλλο, τα σχετικά λεπτότερα κυτταρικά τοιχώματα και εφυμένιδα σε σχέση με τους θερινούς μήνες. Η παρατήρηση έγινε με το οπτικό μικροσκόπιο (Β-Ζ).

3.3.2 Χειμώνας προς άνοιξη (Μάρτης)



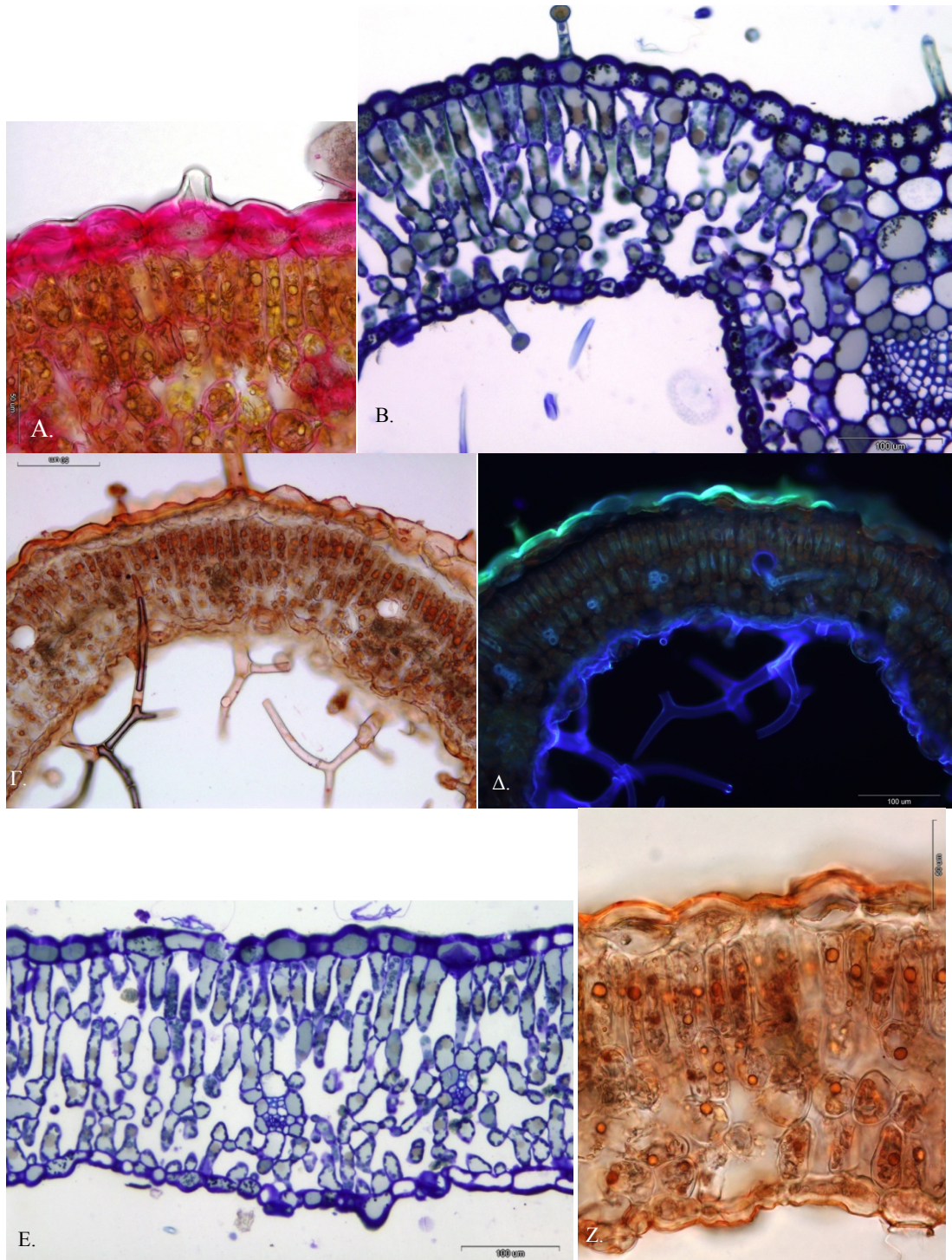
Εικόνα 15. Α: Μακροσκοπική φωτογραφία βλαστού (Α) και εγκάρσιες τομές φύλλων του *T. polium* το Μάρτη. Β: εγκάρσια ημίεπτη τομή φύλλου. Παρατηρούνται οι αυξημένοι μεσοκυττάριοι χώροι, Γ: Αυτοφθορισμός εγκάρσιας τομής νωπού παρασκευάσματος. Παρατηρείται έντονος φθορισμός των πυρήνων των κυττάρων, Δ. εγκάρσια τομή σε νωπό παρασκεύασμα και χρώση με sudan IV, Ε: εγκάρσια τομή σε νωπό παρασκεύασμα και χρώση με padi, Ζ. Αυτοφθορισμός εγκάρσιας τομής νωπού παρασκευάσματος. Παρατηρούνται η απουσία ελαιοσταγονιδίων από το μεσόφυλλο, τα σχετικά λεπτότερα κυτταρικά τοιχώματα και εφυμενίδα σε σχέση με τους θερινούς μήνες. Η παρατήρηση έγινε με το οπτικό μικροσκόπιο (Β-Ζ).

3.3.3 Άνθιση - Μάιος

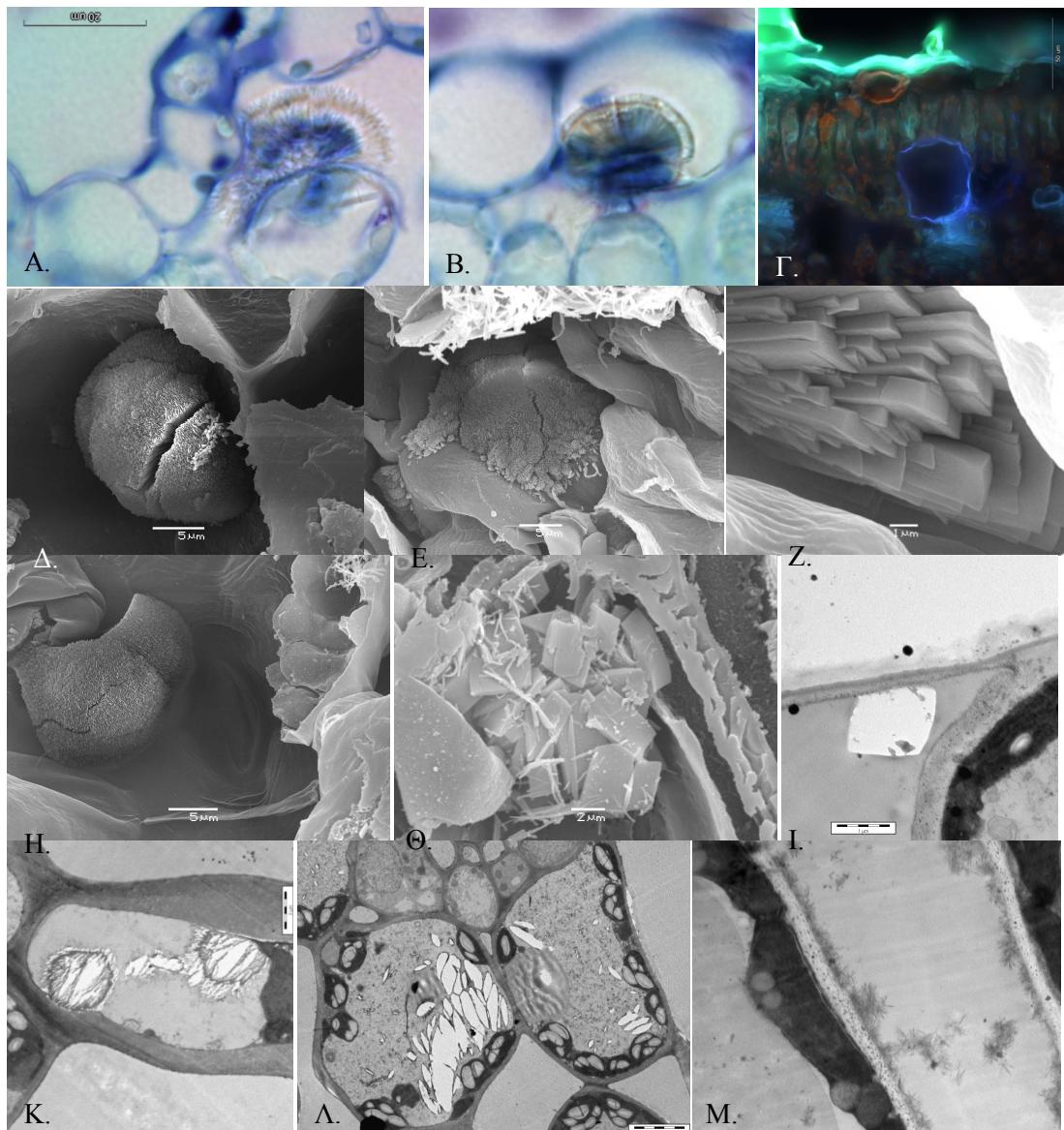


Εικόνα 16. Μακροσκοπική φωτογραφία βλαστού (Α) και εγκάρσιες τομές φύλλων του *T. polium* την άνθιση, κατά τα τέλη Μαΐου. Β: Εγκάρσια ημίλεπτη τομή φύλλου, Γ,Δ: Αυτοφθορισμός εγκάρσιας τομής νωπού παρασκευάσματος, Παρατηρείται ο κίτρινος φθορισμός των πυρήνων των κυττάρων του μεσόφυλλου καθώς επίσης ο πορτοκαλί φθορισμός του κρυστάλλου που βρίσκεται μέσα στον ιδιόβλαστο χώρο, Ε: εγκάρσια τομή σε νωπό παρασκεύασμα και χρώση με nadί, Ζ εγκάρσια τομή σε νωπό παρασκεύασμα και χρώση με sudan IV, Η: εγκάρσια τομή σε νωπό παρασκεύασμα και χρώση με FeSO_4 . Η παρατήρηση έγινε με το οπτικό μικροσκόπιο (Β-Η).

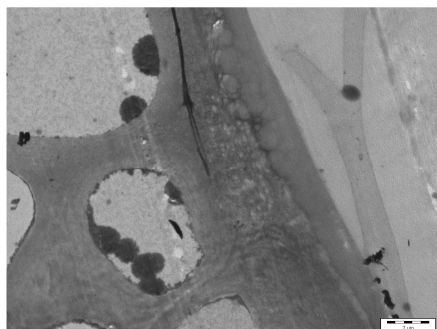
3.3.4 Ιούλιος



Εικόνα 17. Εγκάρσιες τομές φύλλων *T. polium* τον Ιούλιο. Α: σε νωπό παρασκεύασμα και χρώση με ruthenium red. Παρατηρούνται τα παχιά κυτταρικά τοιχώματα της επιδερμίδας, Β: εγκάρσια ημίλεπτη τομή φύλλου, Γ&Ζ: εγκάρσια τομή σε νωπό παρασκεύασμα και χρώση με sudan IV. Παρατηρούνται τα ελαιοσταγονίδια που αρχίζουν να συγκεντρώνονται στα κύτταρα του μεσόφυλλου και το πάχος της εφυμενίδας που είναι αυξημένο, ιδιαίτερα στην προσαξονική πλευρά, Δ: Αυτοφθορισμός εγκάρσιας τομής νωπού παρασκευάσματος. Παρατηρείται ο πράσινος φθορισμός της προσαξονικής επιφάνειας σε σχέση με το γαλάζιο της αποαξονικής, Ε: εγκάρσια ημίλεπτη τομή φύλλου. Παρατηρείται η ανάπτυξη της δεύτερης στρώσης του πασσαλώδους παρεγχύματος. Η παρατήρηση έγινε με το οπτικό μικροσκόπιο (Α-Ζ).

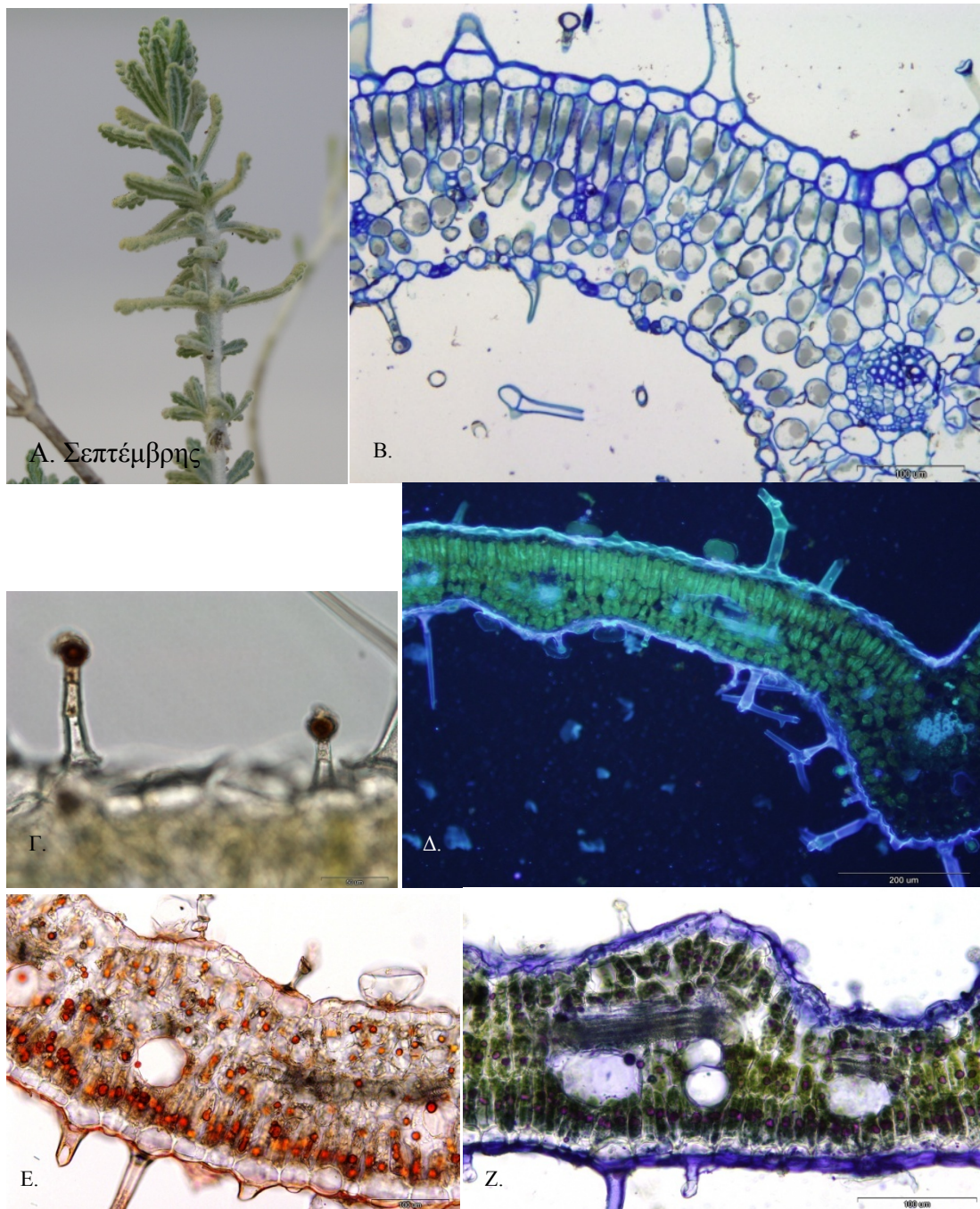


Εικόνα 18. Πολυάριθμοι κρύσταλλοι διαφόρων τύπων συγκεντρώνονται κυρίως στα επιδερμικά κύτταρα αλλά και στα άλλα κύτταρα του μεσόφυλλου και παρατηρούνται συχνά και στους μεσοκυττάριους χώρους, Α-Β. Κρύσταλλος όπως φαίνεται σε εγκάρσια ημίλεπτη τομή με το οπτικό μικροσκόπιο, Γ. αυτοφθορισμός κρυστάλλου σε επιδερμικό κύτταρο. Παρατήρηση με το οπτικό μικροσκόπιο, Δ-Θ: Διάφοροι τύποι κρυστάλλων όπως φαίνονται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, Ι-Μ: Διάφοροι τύποι κρυστάλλων όπως φαίνονται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης.

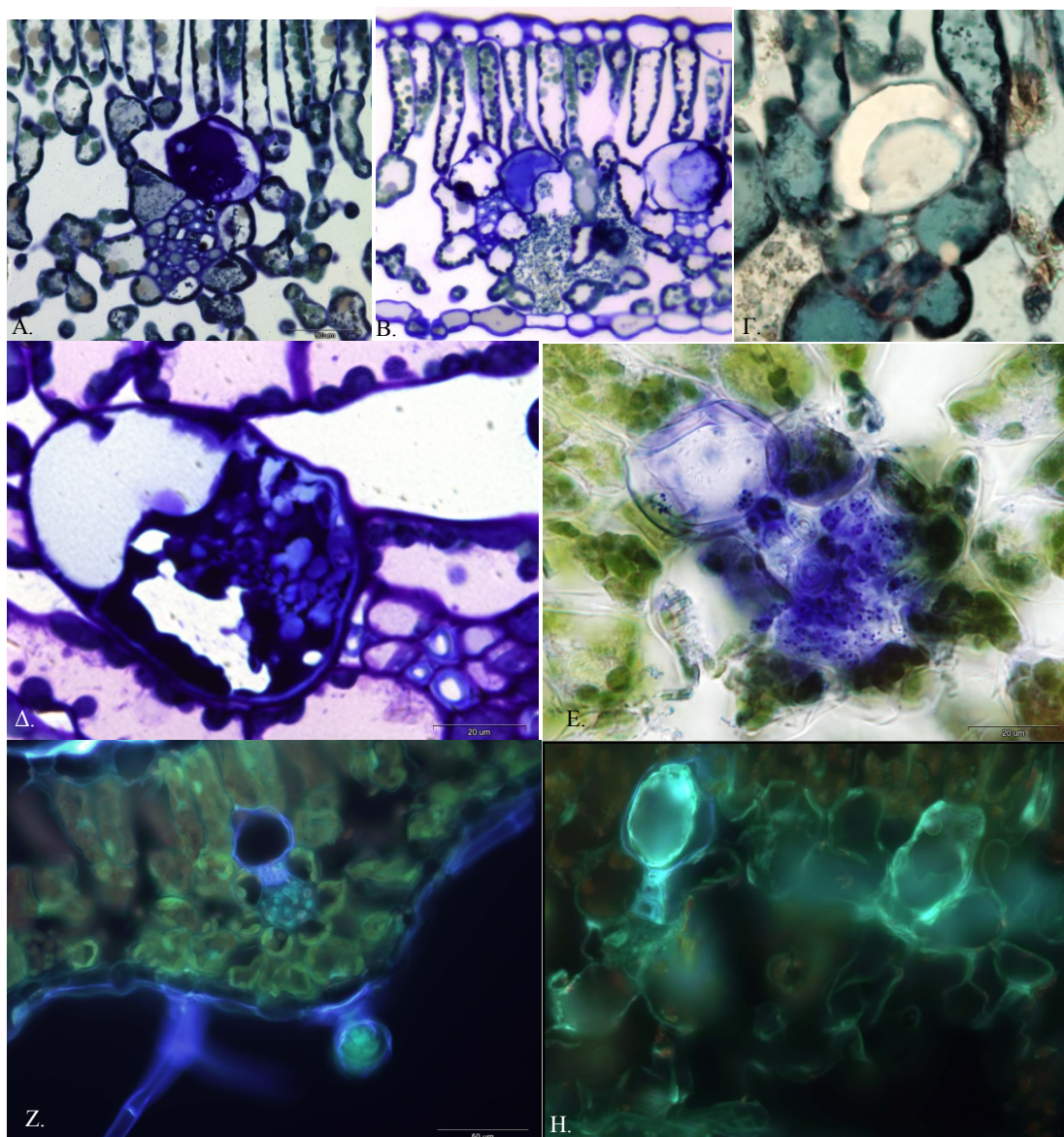


Εικόνα 19. Εναπόθεση εφυμενίδας όπως φαίνεται με το ηλεκτρονικό διέλευσης.

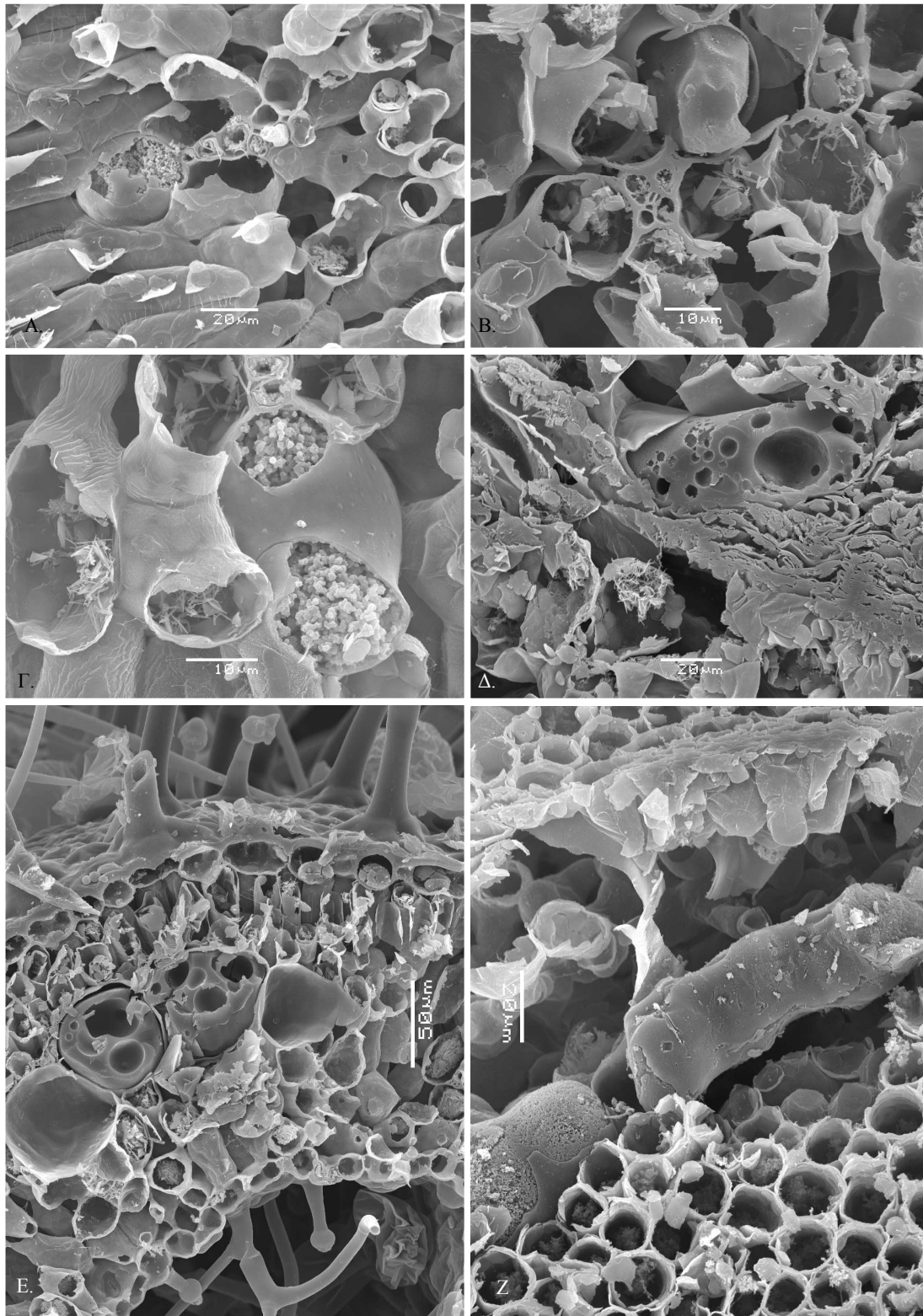
3.3.5 Σεπτέμβρης



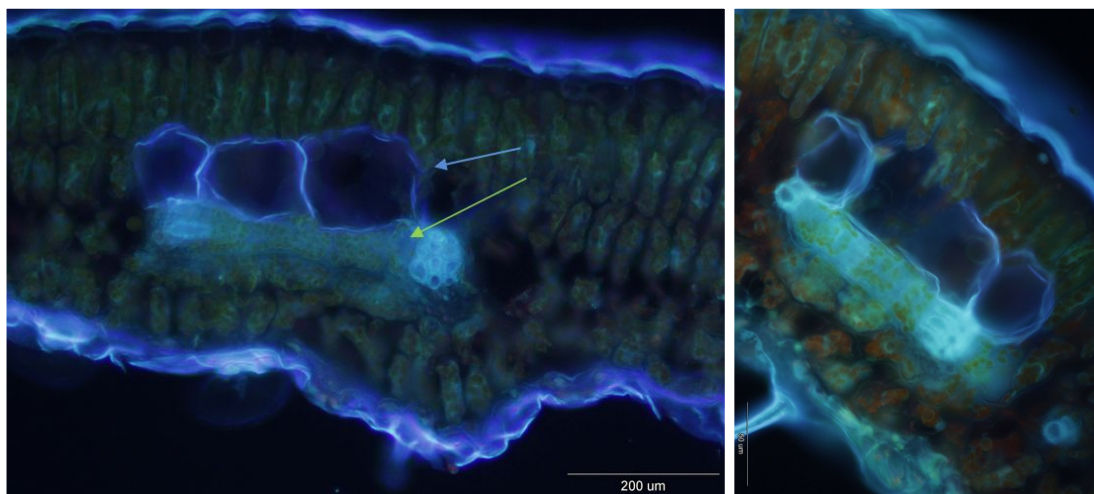
Εικόνα 20. Α: Μακροσκοπική φωτογραφία βλαστού (Α) και εγκάρσιες τομές φύλλων του *T. polium* το Σεπτέμβριο. Β:εγκάρσια ημίλεπτη τομή φύλλου. Το μεσόφυλλο έχει παραπάνω από μία στρώσεις πασσαλώσους παρεγχύματος, Γ: εγκάρσια τομή σε νωπό παρασκεύασμα και χρώση με FeSO₄, Δ: Αυτοφθορισμός εγκάρσιας τομής νωπού παρασκευάσματος, Ε: εγκάρσια τομή σε νωπό παρασκεύασμα και χρώση με sudan IV, Ζ: εγκάρσια τομή σε νωπό παρασκεύασμα και χρώση με nadi. Παρατηρείται η έντονη παρουσία των ελαιοσταγονιδίων στα κύτταρα του μεσόφυλλου. (Ε-Ζ). Η παρατήρηση έγινε με το οπτικό μικροσκόπιο (Β-Ζ).



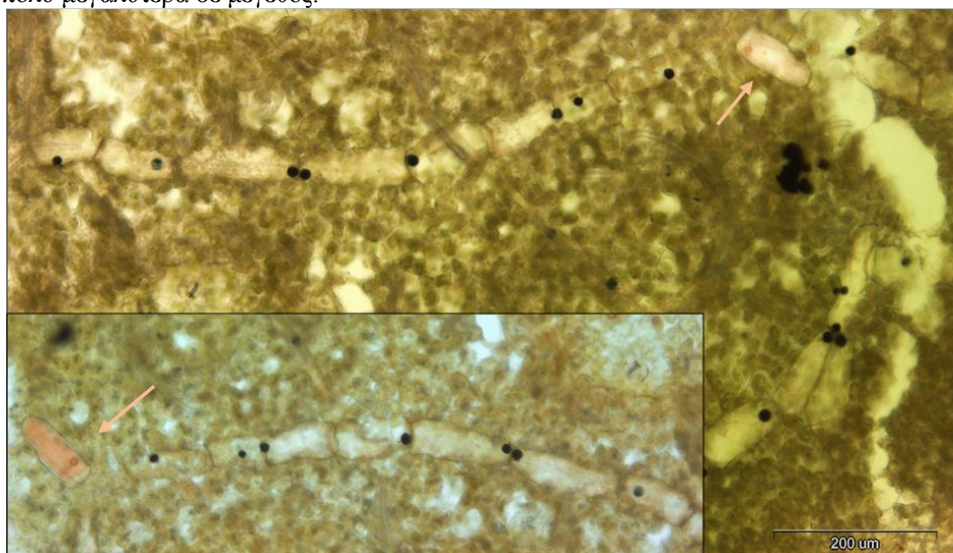
Εικόνα 21. Οι κοιλότητες όπως φαίνονται με το οπτικό μικροσκόπιο. Α-Δ: εγκάρσιες ημύλεπτες τομές, Ε: Εγκάρσια τομή σε νωπό παρασκεύασμα και χρώση με nadi, Ζ-Η: Αυτοφθορισμός εγκάρσιας τομής νωπού παρασκευάσματος.



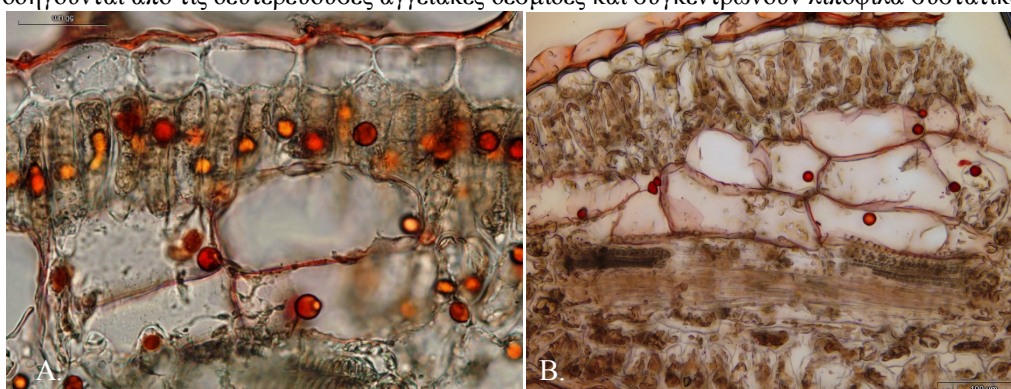
Εικόνα 22 Α-Ζ: Οι κοιλότητες όπως φαίνονται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Η υφή του περιεχομένου εμφανίζεται με διαφορετική εικόνα στα διάφορα παρασκευάσματα.



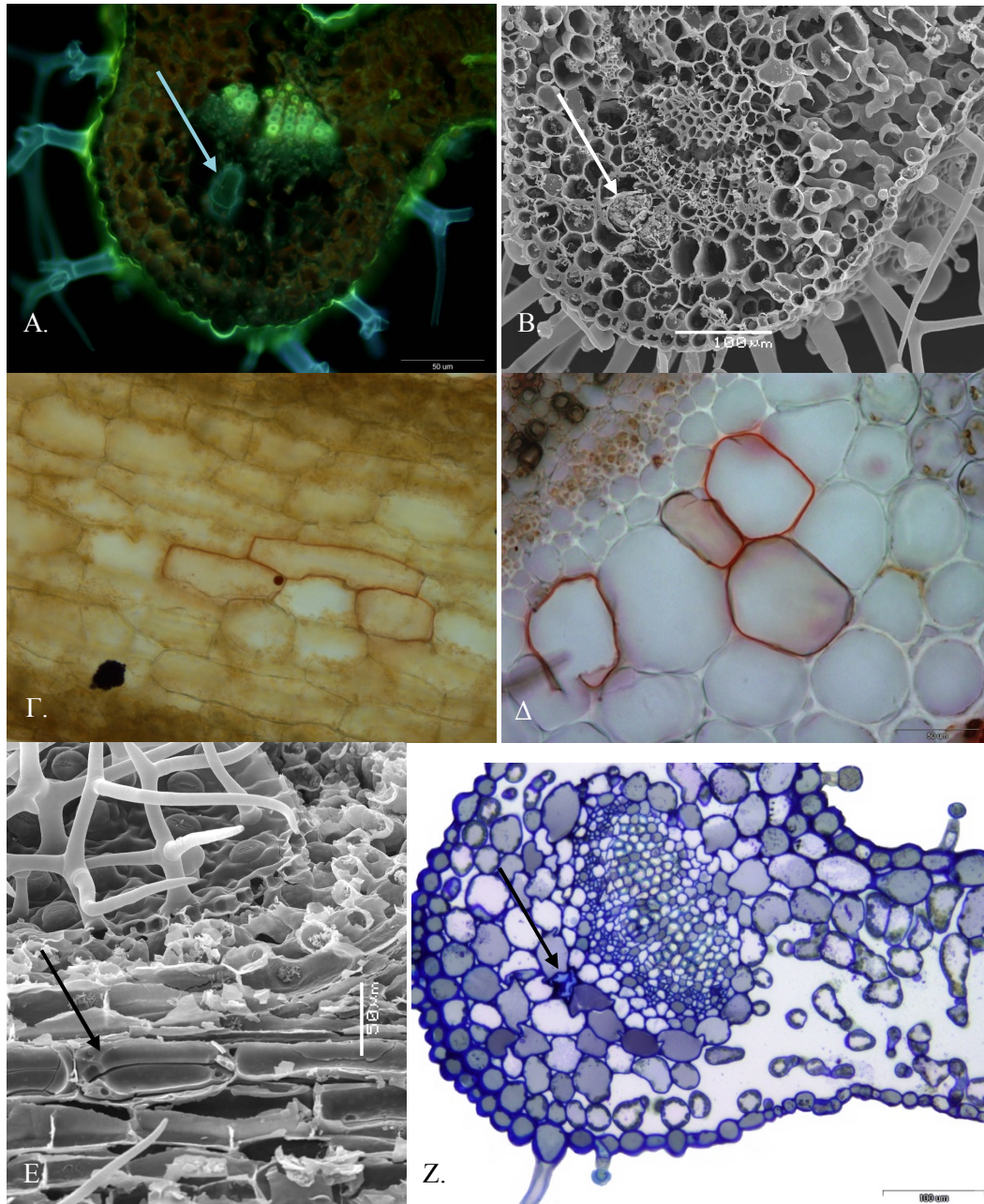
Εικόνα 23. Αυτοφθορισμός εγκάρσιας τομής νωπού παρασκευάσματος. Οι κοιλότητες αυτές δείχνουν να είναι τροποποιημένα κύτταρα κολεού. Τα κυτταρικά τους τοιχώματα φθορίζουν έντονα, και είναι πολύ μεγαλύτερα σε μέγεθος.



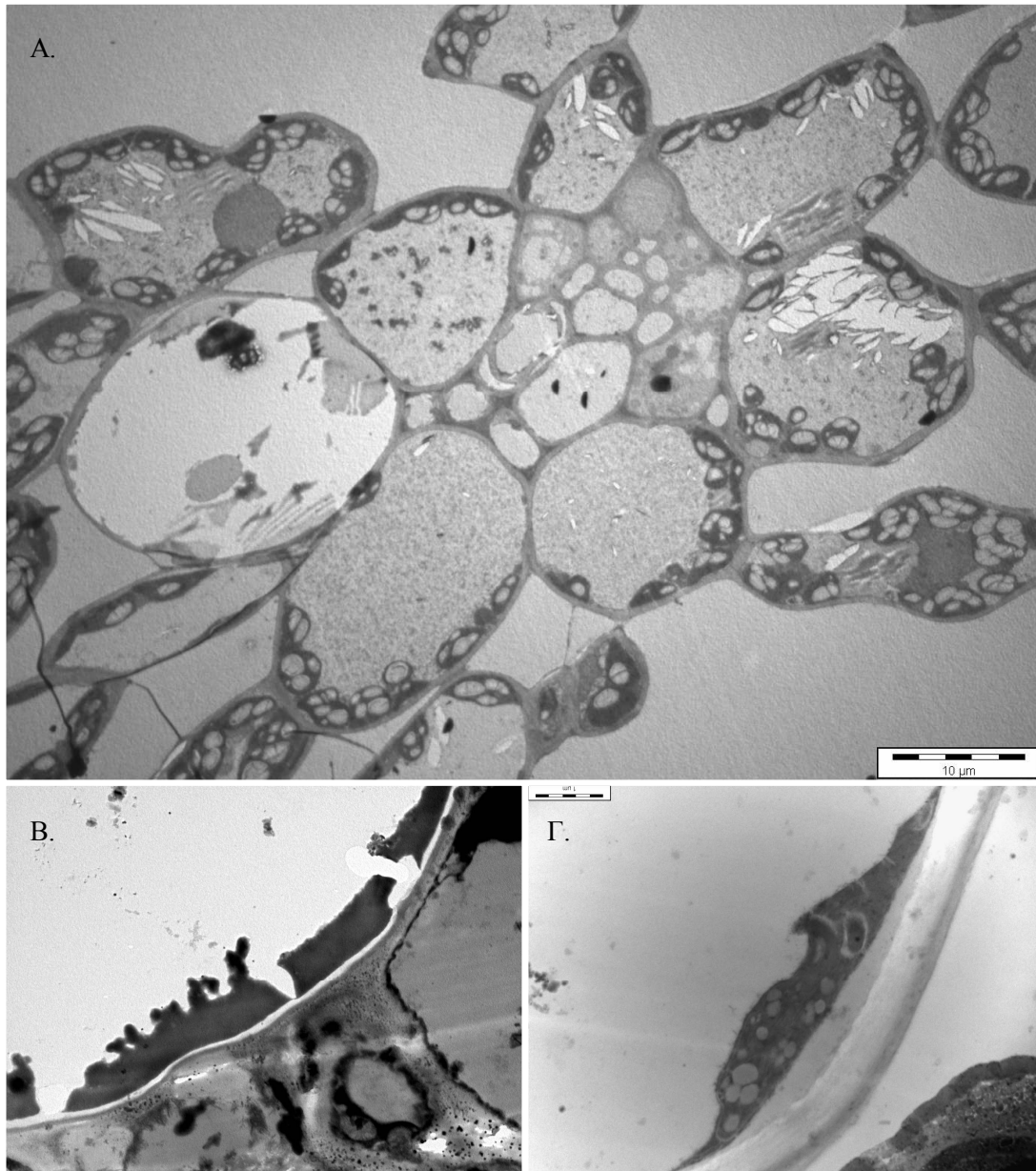
Εικόνα 24. Εφαπτομενικές τομές σε νωπό φύλλο με χρώση sudan IV. Φαίνεται ότι οι κοιλότητες αυτές οδηγούνται από τις δευτερεύουσες αγγειακές δεσμίδες και συγκεντρώνουν λιπόφιλα συστατικά.



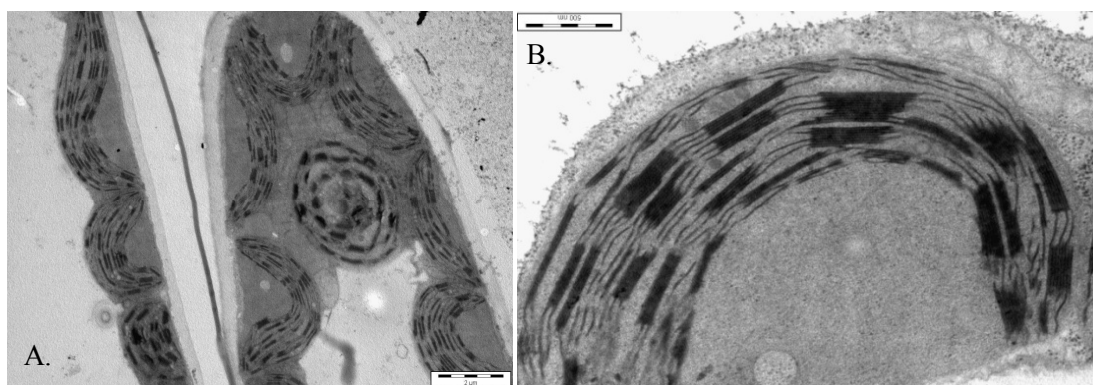
Εικόνα 25: Εγκάρσιες τομές σε νωπό A: Σεπτεμβρίου και B: χειμερινό φύλλο με χρώση sudan IV. Συχνά συνενώνονται αυτές οι κοιλότητες σχηματίζοντας μεγαλύτερες δομές, συνήθως προς τα κράσπεδα των φύλλων. Τα κυτταρικά τους τοιχώματα βάφονται έντονα, κάτι που δηλώνει την ύπαρξη κουτίνης.



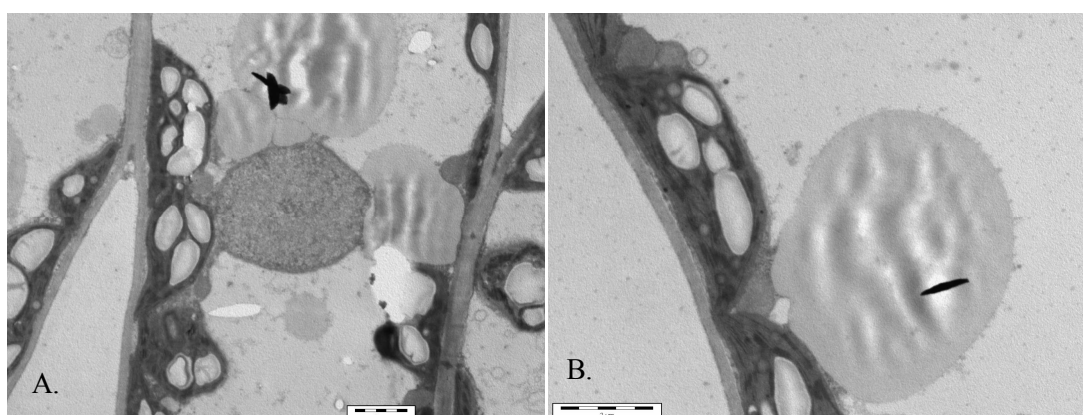
Εικόνα 26. Α: Εγκάρσια τομή σε νωπό παρασκεύασμα που είχε χειριστεί με λουσιφερίνη. Παρατηρείται κίτρινος φθορισμός στα αγγεία του ξύλου ενώ αρνητική είναι η χρώση των ιδιόβλαστων χώρων με μικροσκοπία φθορισμού των οποίων τα κουτινοποιημένα κυτταρικά τοιχώματα φθορίζουν έντονα γαλάζιο. Οι μη αδενώδεις τρίχες επίσης φθορίζουν γαλάζια κάτι που δείχνει πως είναι απονεκρωμένες. Β,Ε: Τα ιδιόβλαστα ελαιοκύτταρα της κεντρικής νεύρωσης όπως φαίνονται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης σε εγκάρσια τομή (Β) και σε εφαπτομενική (Ε), Γ: Εφαπτομενική και Δ: εγκάρσια τομή σε νωπό παρασκεύασμα και χρώση με sudan IV, Ζ: Εγκάρσια ημίεπτη τομή. Για τα Α,Γ,Δ,Ζ η παρατήρηση έγινε με το οπτικό μικροσκόπιο.



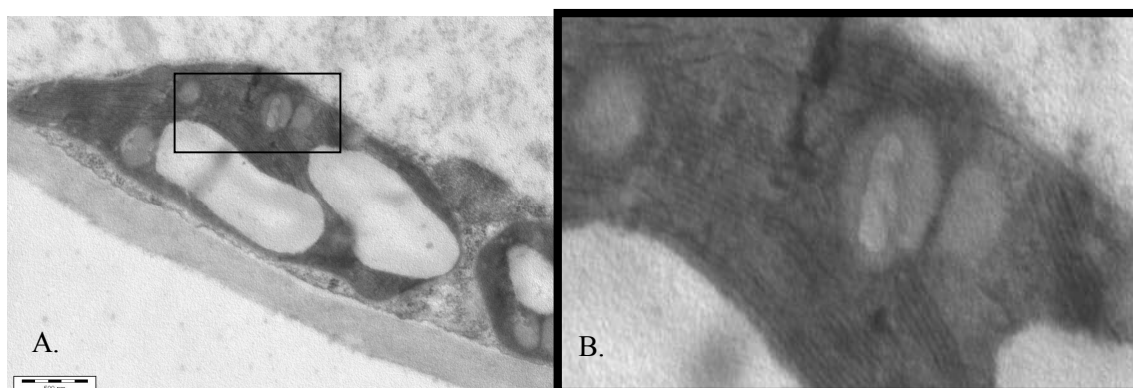
Εικόνα 27. Α-Γ: Τα ιδιόβλαστα κύτταρα- κοιλότητες, όπως φαίνονται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης. Εμφανίζονται γενικά άδεια (Α) χωρίς κυτόπλασμα και πυρήνα και σπάνια απαντώνται κάποια κυτοπλασματικά οργανίδια όπως είναι τα πλαστίδια (Εικόνα 27Γ). Το κυτταρικό του τοίχωμα, είναι σημαντικά λεπτότερο από αυτά των γειτονικών κυττάρων του κολεού, και είναι επενδυμένο με ένα ηλεκτρονιακά πυκνό στρώμα στο εσωτερικό, όπου πιθανότατα έχει να κάνει με τον εμποτισμό του κυτταρικού τοιχώματος με κουτίνη, ενώ από την εξωτερική πλευρά του, φαίνεται το τοίχωμα να επικαλύπτεται από ένα έντονα οσμιοφίλο στρώμα (Β).



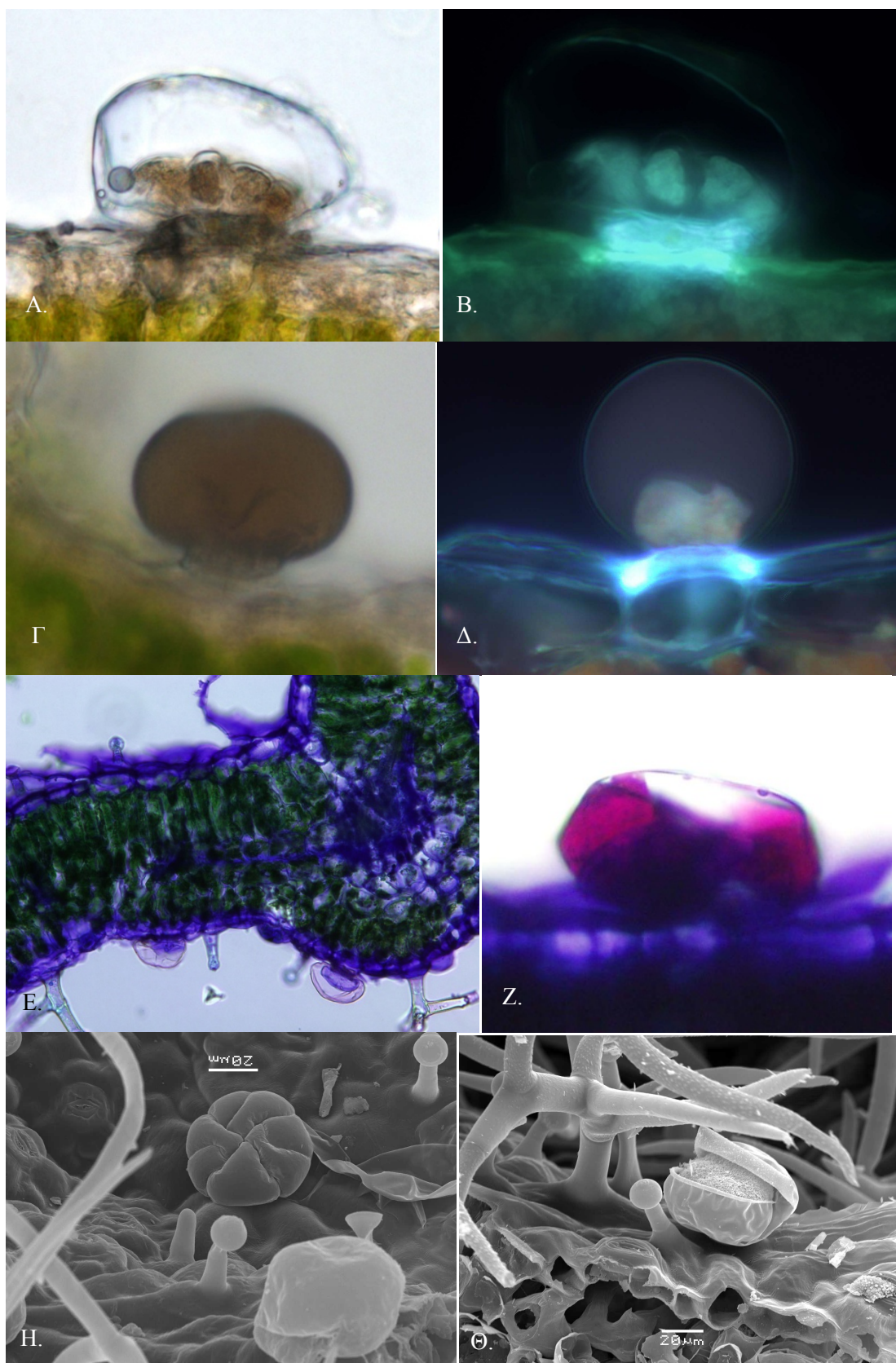
Εικόνα 28 Α: Υπέρλεπτη τομή χειμωνιάτικων φύλλων του *T. polium*. Κύτταρα πασσαλώδους παρεγχύματος και Β: ένας χλωροπλάστης σε μεγέθυνση. Παρατηρείται η πολύ καλή ανάπτυξη των γκράνα και η έλλειψη μεγάλων αμυλόκοκκων.



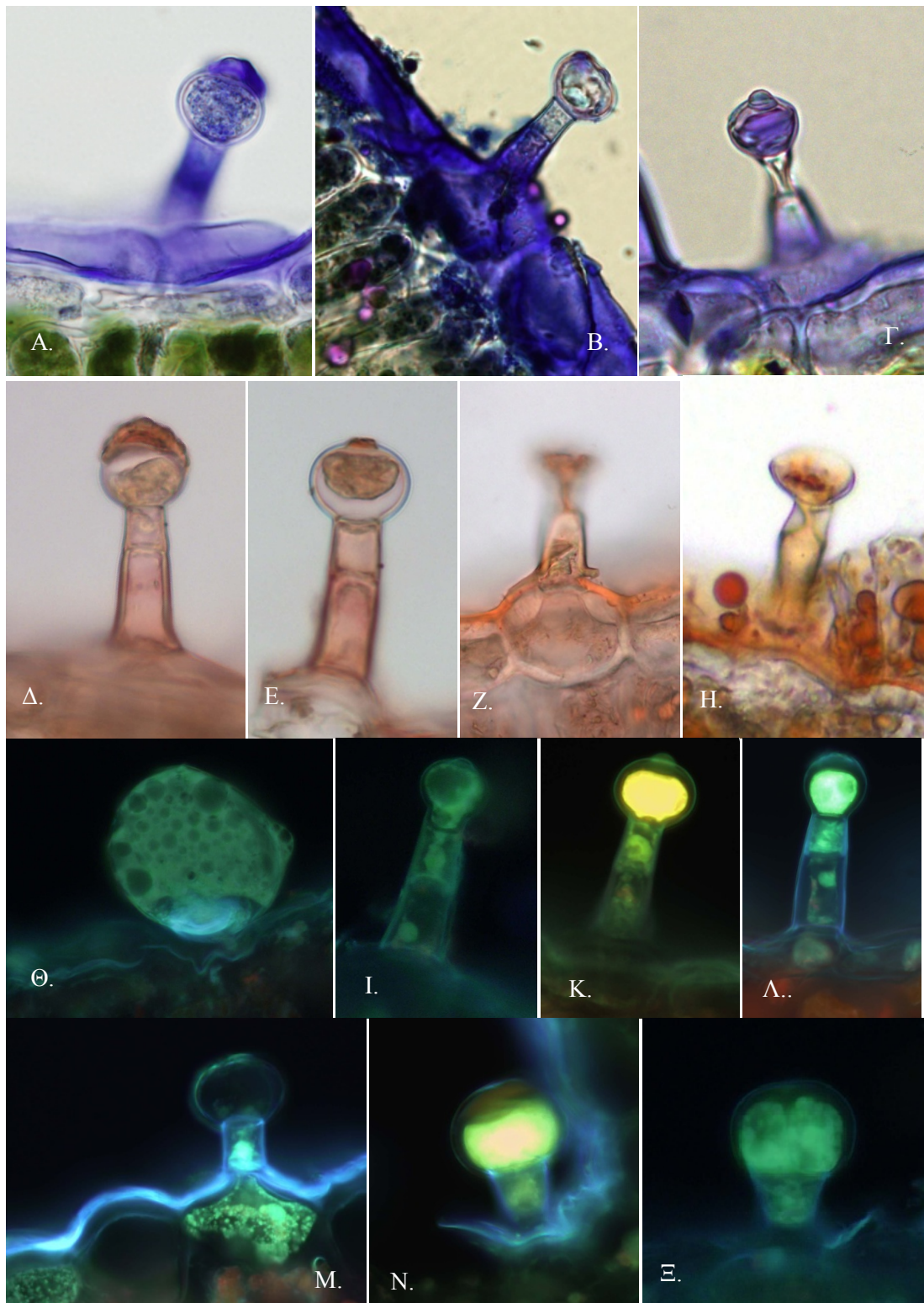
Εικόνα 29 Α: Υπέρλεπτη τομή καλοκαιρινών φύλλων του *T. polium* (κατά την άνθιση). Κύτταρα πασσαλώδους παρεγχύματος όπου εκτός των χλωροπλαστών διακρίνονται και τα ελαιοσταγονίδια που συγκεντρώνονται τους θερινούς μήνες καθώς επίσης ο πυρήνας, Β: ένα ελαιοσταγονίδιο (oil body) σε μεγέθυνση. Φαίνεται να βρίσκεται σε στενή επαφή με τους χλωροπλάστες και τους αμυλόκοκκους και στερείται μεμβράνης.



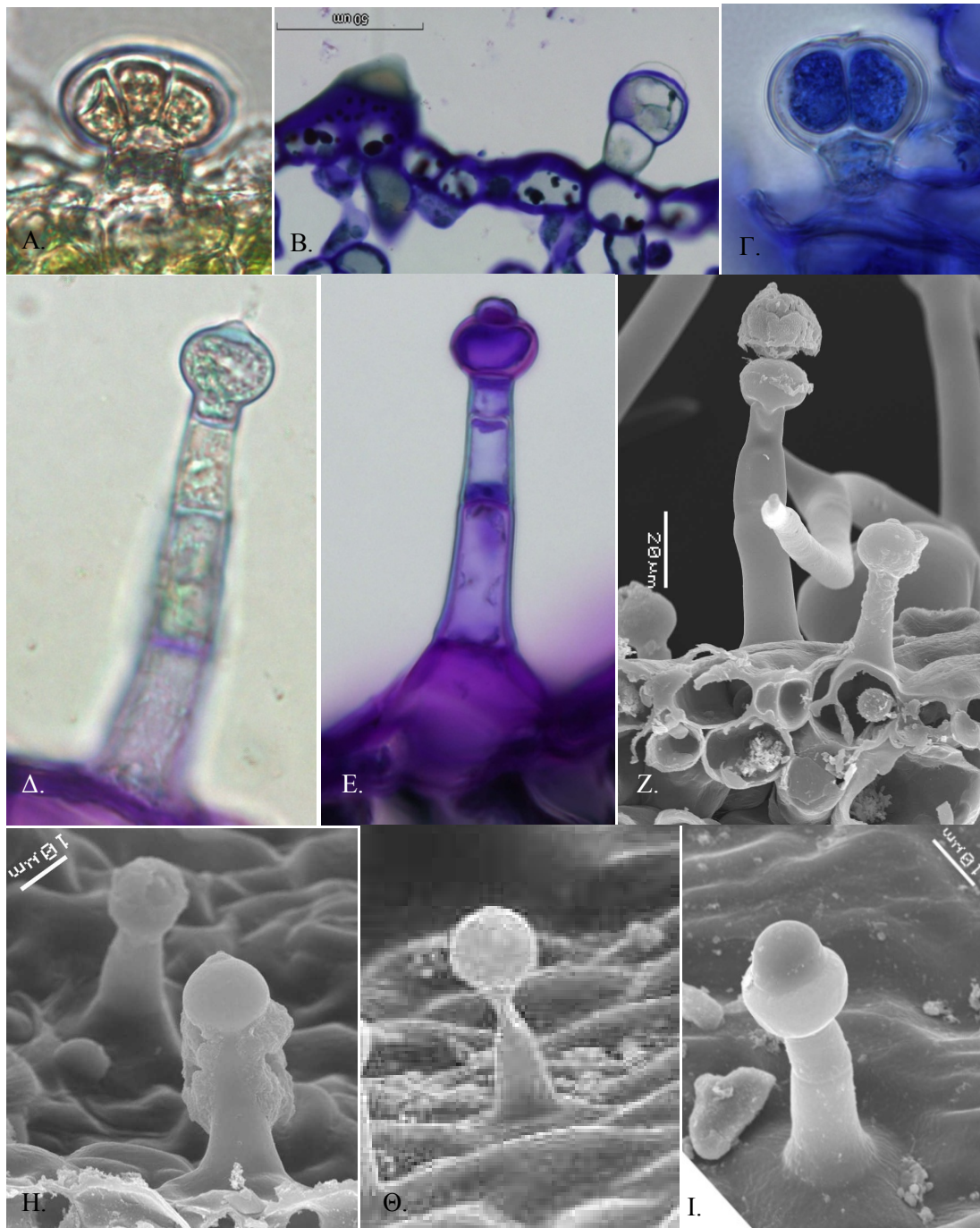
Εικόνα 30 Α: Λεπτομέρεια υπέρλεπτης τομής καλοκαιρινού φύλλου. Ο χλωροπλάστης δεν έχει τόσο καλά αναπτυγμένα γκράνα και χαρακτηρίζεται από μεγάλους αμυλόκοκκους και μικρά ελαιοσταγονίδια, Β: λεπτομέρεια του χλωροπλάστη όπου φαίνεται η δομή των γκράνα.



Εικόνα 31 Α&Γ: Εγκάρσια τομή σε νωπά παρασκευάσματα (χωρίς χρώση) και Β&Δ: αυτοφθορισμός των ίδιων παρασκευασμάτων, Ε&Ζ: Εγκάρσια τομή νωπού παρασκευάσματος με χρώση Nile blue. Οι ασπιδοειδείς αδένες της προσαξονικής πλευράς βάφονται κόκκινο-ροζ σε αντίθεση με αυτούς της αποαξονικής που φαίνονται διαφανείς. Α-Ζ: παρατήρηση με το οπτικό μικροσκόπιο. Η: Τα κύτταρα της κεφαλής ενός ασπιδοειδούς αδένος και Θ: τα εκκρίματα ενός άλλου που συσσωρεύονται στον υποεφυμενικό χώρο όπως φαίνονται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.



Εικόνα 32 Α-Γ: Παρατήρηση κεφαλοειδών αδένων σε εγκάρσιες τομές νωπών παρασκευασμάτων με χρώση nadi, Δ-Η: Παρατήρηση κεφαλοειδών αδένων σε εγκάρσιες τομές νωπών παρασκευασμάτων με χρώση sudan. Θ-Ξ: Παρατήρηση του αυτοφθορισμού διαφόρων τύπων αδένων σε εγκάρσιες τομές νωπών παρασκευασμάτων νωπού παρασκευάσματος. Οι παρατηρήσεις έγιναν με το οπτικό μικροσκόπιο.



Εικόνα 33. Παρατήρηση αδενωδών τριχωμάτων: Α: σε εγκάρσιες τομές νωπών παρασκευασμάτων (χωρίς χρώση), Β: σε εγκάρσια ημίλεπτη τομή, Γ: εγκάρσια τομή σε νωπό παρασκεύασμα με χρώση aniline blue, Δ&Ε: εγκάρσια τομή σε νωπό παρασκεύασμα με χρώση τολουιδίνης, Ζ-Ι: διάφοροι τύποι αδένων και τα εκρίματά τους, όπως φαίνονται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

4 Συζήτηση

4.1 Αιθέρια έλαια

Η χημική σύσταση του φυτού και ανάλυση των αιθέριων ελαίων *Teucrium polium* L., έχει αποτελέσει το αντικείμενο πολλών ερευνών. Από μια γρήγορη ανασκόπηση στη βιβλιογραφία το *T. polium*, φαίνεται να περιέχει πληθώρα συστατικών. Η απόδοση του σε αιθέριο έλαιο ποικίλλει από 0,15 έως 1,1%. Η χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου ποικίλλει έντονα. Γενικά, αποτελείται κυρίως από μονοτερπένια και σεσκιτερπένια οξυγονωμένα ή μη, σε διάφορες αναλογίες.

Οι Vokou και Bessiere (1984) ανέλυσαν τα αιθέρια έλαια του *T. polium* που συνέλεξαν από την περιοχή του Υμηττού, όπως και στην παρούσα εργασία, κατά την περίοδο της άνθισης. Το αιθέριο έλαιο παραλήφθηκε με απόδοση 1,1% επί ξηρού βάρους συνολικά κάτω που ισοδυναμεί και με το δικό μας αποτέλεσμα αν θα κάναμε την αναγωγή στη συνολική απόδοση του αιθέριου ελαίου. Με τον τρόπο που παραλήφθηκε το αιθέριο έλαιο στην παρούσα εργασία διαπιστώθηκε και το γεγονός ότι οι ανθισμένες ταξιανθίες είχαν σχεδόν τριπλάσια απόδοση σε αιθέρια έλαια (1,65%) σε σχέση με τα φύλλα (0,45%). Έτσι, φαίνεται σκόπιμο για το συγκεκριμένο φυτό να συλλέγεται την άνθιση μαζί με τις ταξιανθίες του όταν επιθυμείται να αξιοποιηθεί το αιθέριο έλαιο του. Επίσης, με αυτόν τον τρόπο δόθηκε η ευκαιρία να διαπιστώσουμε διαφορές στη σύσταση των αιθερίων ελαίων των δύο ιστών. Τα κύρια συστατικά που διαπίστωσαν οι Vokou και Bessiere (1984), είναι συστατικά που ανιχνεύτηκαν σε σημαντικές ποσότητες και στα δικά μας δείγματα όπως είναι t-καδινόλη, β-καρνοφυλλένιο, οξείδιο του καρνοφυλλένιου, α-καδινόλη, χουμουλένιο, trans-βερμπενόλη και γ-καδινένιο.

Τα αιθέρια έλαια των ταξιανθιών και των φύλλων του *T. polium* κατά την περίοδο της άνθισης έχουν το ίδιο κύριο συστατικό (β-καρνοφυλλένιο). Στη συντριπτική πλειοψηφία τους τα συστατικά που συνιστούν τα αιθέρια έλαια είναι τα ίδια. Ωστόσο, ανιχνεύονται σε διαφορετικές αναλογίες. Η διαφορά στην απόδοση των αιθερίων ελαίων και στις αναλογίες των συστατικών που παρουσιάζονται ανάμεσα στις ταξιανθίες και τα φύλλα, δεν συνδυάζεται με τυχόν διαφορές στην πυκνότητα ή το είδος των αδενωδών τριχών που υπάρχουν στους δύο διαφορετικούς ιστούς. Από τις ουσίες που υπάρχουν στο αιθέριο έλαιο των φύλλων σε αξιόλογο ποσοστό, μόνο η 2-εξενάλη δεν ανιχνεύεται στο αιθέριο έλαιο των ταξιανθιών. Στα αιθέρια έλαια των φύλλων του *T. polium* την εποχή της άνθισης, τα μη οξυγονωμένα τερπένια κατέχουν σχεδόν ίδιο ποσοστό (44,5%) του συνόλου των συστατικών με τα οξυγονωμένα (45,4%), ενώ στις ταξιανθίες υπερτερούν κατά πολύ τα μη οξυγονωμένα συστατικά με ποσοστά 66,2% έναντι των 28,3% αντίστοιχα.

Ο Chizzola (2006) ανέλυσε με αέρια χρωματογραφία τα εκχυλίσματα (σε οξικό αιθυλεστέρα) φύλλων και ταξιανθιών *T. polium* από διάφορες περιοχές της νότιας Γαλλίας σε πλήρη άνθιση. Καταλήγει στο συμπέρασμα ότι τα εκχυλίσματα των ταξιανθιών και των φύλλων μοιάζουν σε κάθε περίπτωση ενώ ομαδοποιεί σε δύο κατηγορίες τα φυτά από τις διάφορες περιοχές συλλογής, αναλόγως των πτητικών συστατικών που κυριαρχούν.

Τα αποτελέσματα των Menichini et al. (2009) φαίνεται να ταιριάζουν με αυτά των Vokou και Bessiere (1984) αλλά και τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας όσον αφορά στη γενική σύσταση του αιθέριου ελαίου όπου βρέθηκε και από τους δύο κυριαρχία σεσκιτερπενίων, βέβαια με πολλές διαφορές στα επιμέρους συστατικά.

Οι Cozzani et al. (2005), πήραν το φυτικό δείγμα τον Οκτώβρη από την Κορσική με απόδοση σε αιθέριο έλαιο ήταν 0,6%, και διαπίστωσαν κυριαρχία μονοτερπενίων (74.7%) τα περισσότερα από τα οποία ήταν οξυγονωμένα, ενώ τα σεσκιτερπένια αποτελούν το 5.4%. Τα κύρια συστατικά ήταν τα α-πινένιο (28.8%), β-πινένιο (7.2%) και *p*-κυμένιο (7.0%). Οι Antunes et al. (2004) βρήκαν σημαντικές διαφορές στα κύρια συστατικά των αιθέριων ελαίων στους 5 πληθυσμούς φυτών *T. polium* που μελέτησαν. Τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων, έδειξαν σημαντικές διαφορές στη σύσταση των αιθέριων ελαίων, ακόμα και από τα φυτά που συλλέχτηκαν στα ίδια αναπτυξιακά στάδια, από κοντινές περιοχές, με παρόμοια οικολογικά και εδαφικά χαρακτηριστικά και γεωγραφική προέλευση των φυτών, όπως επισημαίνεται από τους Antunes et al. (2004). Αυτό αποτελεί μια ένδειξη ότι ο χημικός πολυμορφισμός του αιθέριου ελαίου μπορεί να οφείλεται, εν μέρει, και σε γενετικούς παράγοντες.

Πλήθος βιολογικών δράσεων αναφέρονται για αιθέρια έλαια του *T. polium*, αρκετά από τα οποία αναφέρονται στο σχετικό κεφάλαιο (1.1.2). Έχει διαπιστωθεί επίσης η αλληλοπαθητική/φυτοτοξική δράση του αιθέριου ελαίου κυρίως σε φυτά που αυτοφύονται (Vokou και Margaris 1982). Σχετικές φυτοχημικές μελέτες μπορεί να αποτελέσουν βάση στην επιλογή του κατάλληλου φυτικού υλικού για φαρμακευτικούς σκοπούς. Είναι σημαντικό να ταυτοποιηθούν τα σημαντικά συστατικά και να διαπιστωθεί ποια είναι η κατάλληλη εποχή και μέρος του ιστού για συλλογή.

Χρήση φαρμακευτικών φυτών και κίνδυνοι

Η πώληση των φυτικών φαρμάκων έχει αυξηθεί σημαντικά κατά τα τελευταία χρόνια στις βιομηχανικές χώρες. Αυτό ωστόσο εμπεριέχει κινδύνους. Η αυξανόμενη τάση προς τη χρήση φαρμακευτικών φυτών για τη θεραπεία μεγάλου εύρους παθήσεων, έχει υποκινηθεί από πολλούς παράγοντες όπως: i. την εμφάνιση νέων παθήσεων ή επιπλοκών για τις οποίες εξακολουθεί να μην υπάρχει κατάλληλη θεραπεία, ii. την πεποίθηση ότι τα βότανα είναι ακίνδυνα, σε αντίθεση με τα συμβατικά φάρμακα, iii. την ιδέα πως ό,τι είναι φυσικό είναι

καλό και iv. την πεποίθηση ότι τα φυτικά φάρμακα είναι ανώτερα από συνθετικά ναρκωτικά (Capasso et al. 2000).

Είναι γνωστό ότι πολλά φυτά παράγουν τοξικές ουσίες ώστε να αποθαρρύνουν την κατανάλωση τους από τα ζώα. Είναι επίσης γνωστό ότι ορισμένα φυτά πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή γιατί μπορεί να είναι τοξικά για το συκώτι, για τα νεφρά για το δέρμα και άλλους ιστούς. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η θεραπευτική αποτελεσματικότητα των φυτικών φαρμάκων δεν επηρεάζεται από μόνο μια κατηγορία ενώσεων των συστατικών. Τα συστατικά αυτά συνήθως δρουν συνεργιστικά ή ανταγωνιστικά μεταξύ τους. Χρειάζεται να γίνει προσδιορισμός των δραστικών ουσιών εκείνων που είναι υπεύθυνες για τις ιδιότητες του εκχυλίσματος και να διευκρινιστούν οι συνεργιστικές ή οι ανταγωνιστικές σχέσεις των επιμέρους συστατικών του εκχυλίσματος.

Επιπλέον η χημική σύσταση ενός φυτού ποικίλλει έντονα, ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του φυτού, τις συνθήκες του περιβάλλοντος στο οποίο ζει και άλλους γενετικούς παράγοντες. Οι τοξικές επιδράσεις ενός φυτικού εκχυλίσματος μπορεί να οφείλονται στην τοξικότητα των συστατικών μπορεί όμως να αποδοθεί και σε διάφορους άλλους παράγοντες όπως τυχόν μολύνσεις των παρασκευασμάτων από μικροοργανισμούς, φυτοφάρμακα και βαρέα μέταλλα. Για αυτούς τους λόγους κρίνεται αναγκαία η τυποποίηση των φυτικών εκχυλίσμάτων ώστε να συμπεριλαμβάνονται οι βιολογικά δραστικές ενώσεις με τρόπο σταθερό και αν είναι δυνατόν να εξαιρούνται οι τοξικές (Capasso, et al., 2000).

Η χημική ανάλυση των συστατικών είναι το πιο σημαντικό μέρος της τυποποίησης γιατί όπως φαίνεται και από τη βιβλιογραφία, η χημική σύσταση ενός φυτικού εκχυλίσματος ποικίλλει έντονα ποιοτικά και ποσοτικά από φυτό σε φυτό (διαφορετικές ποικιλίες, διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, στάδιο ανάπτυξης φυτού και εποχής, συνθήκες καταπονήσεως που επάγουν τη βιοσύνθεση ορισμένων δευτερογενών μεταβολιτών και από πολλούς παράγοντες όπως τον τρόπο που παραλαμβάνεται το εκχύλισμα). Ωστόσο, τα φυτικά φάρμακα μπορεί να είναι δυνητικά τοξικά αν χρησιμοποιηθούν εσφαλμένα και ως υποκατάστατα των συμβατικών φαρμάκων.

Είναι εύλογο το ενδιαφέρον για την έρευνα γύρω από τα συστατικά των φαρμακευτικών φυτών και την προσπάθεια να ταυτοποιηθούν τα βιολογικά ενεργά συστατικά, να μελετηθεί το πώς αυτά δρουν και να χρησιμοποιηθούν για τους αντίστοιχους σκοπούς. Η φυτοχημική ανάλυση πραγματοποιείται με το συνδυασμό όλων των τεχνικών ενόργανης ανάλυσης ώστε να προσεγγίζονται όσο το δυνατόν τα περισσότερα συστατικά του φυτού που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες ενώσεων (μεταβολίτες με διαφορετική φύση).

4.2 Ανατομικά χαρακτηριστικά

Ξηρομορφισμός- τρίχες

Η λεπτή δομή του φύλλου του *Teucrium polium* L., δείχνει σχετικά χαλαρό δρυφακτοειδές παρέγχυμα, ειδικά τους χειμερινούς μήνες κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τη συνηθισμένη εικόνα του καλώς ανεπτυγμένου και συμπαγούς πασσαλώδους παρεγχύματος που χαρακτηρίζει τα ξηρόφυτα. Τόσο τα καλοκαιρινά όσο και τα χειμωνιάτικα φύλλα πολλών εποχιακά διμορφικών χαμηλών θάμνων παρουσιάζουν ένα πολύστρωμο και καλώς αναπτυγμένο πασσαλώδες παρέγχυμα (Christodoulakis & Bazos 1990). Εντούτοις, τους καλοκαιρινούς μήνες το πασσαλώδες παρέγχυμα αυξάνει σε έκταση, κάτι που πιστεύεται ότι είναι αναγκαίο για να αυξάνεται η επιφάνεια απορρόφησης του CO₂ στο μεσόφυλλο στα ξηρόφυτα (Rhizopoulou & Psaras 2003). Οι Lakusic et al. (2010) αναφέρουν ότι το μεσόφυλλο του *T. polium* αποτελείται αποκλειστικά από πασσαλώδες παρέγχυμα κάτι που δε φαίνεται στις φωτογραφίες τους.

Επιπλέον, το μάλλον χαλαρό σπογγώδες παρέγχυμα τα σχετικά υπερυψωμένα στομάτια και η απουσία σημαντικά, ανεπτυγμένων μηχανικών-στηρικτικών ιστών, δεν υποδηλώνουν ξηρομορφική δομή. Δεν παρατηρήθηκαν στόματα στην πάνω επιφάνεια, παρόλο που η υποαμφιστοματικότητα θεωρείται ξηρομορφικό χαρακτηριστικό (Fahn & Cutler, 1992). Οι Lakusic et al. (2010) χαρακτηρίζουν το *T. polium* ως αμφυποστοματικό κάτι που εμείς δεν παρατηρήσαμε. Αυτό το χαρακτηριστικό θεωρείται ότι μειώνει την απόσταση για τη διάχυση του CO₂ στα κύτταρα του μεσόφυλλου (Terashima et al. 2005). Έτσι κι αλλιώς η αμφιστοματικότητα εκλείπει εντελώς από τα αειθαλή μεσογειακά σκληρόφυλλα και εμφανίζεται μόνο σποραδικά στα χειμωνιάτικα φύλλα κάποιων εποχιακά διμορφικών όπως τα *Anthyllis hermaniae*, *Thymus capitatus* (Christodoulakis 1989). Επομένως, το *T. polium*, παρόλο που αναπτύσσεται σε φρυγανική διάπλαση (formations), δείχνει να ακολουθεί το πρότυπο των αειθαλών σκληρόφυλλων.

Συνυπολογίζοντας τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά του φύλλου φαίνεται ότι το *T. polium* αποκλίνει κατά κάποιο τρόπο, από τον τυπικό ξηρομορφικό χαρακτήρα και πιθανώς αντισταθμίζει αυτό το "ελάττωμα", με την αξιοποίηση της προστασίας που παρέχεται από το παχύ και πυκνό τρίχωμα. Ωστόσο, πυκνά και πολύπλοκα τριχώματα είναι κοινά μεταξύ των φυτών της περιοχής της Μεσογείου, ιδίως στα εποχικά διμορφικά είδη (Christodoulakis 1989, Christodoulakis & Fasseas 1991). Το πυκνό τρίχωμα μπορεί ακόμα να έχει προστατευτικό ρόλο έναντι στην υπεριώδη ακτινοβολία -ultraviolet B- όπως και σε άλλες περιπτώσεις (Karabourniotis & Fasseas 1996).

Στη βιβλιογραφία ως τώρα αναφέρεται από τους ερευνητές ότι οι κεφαλοειδείς αδένες έχουν ένα επιδερμικό κύτταρο βάσης, δύο κύτταρα μίσχου και ένα αδενικό κύτταρο κεφαλής,

ενώ οι ασπιδοειδείς ένα κύτταρο βάσης, ένα πολύ κοντό κύτταρο μίσχου και πολυκύτταρη κεφαλή (Antunes et al. 2004, Christodoulakis et al. 2010). Τα πολυκύτταρα μη αδενώδη τριχώματα, με τη δενδροειδή μορφή, παρατηρούνται στα φύλλα και στον κάλυκα και κάνουν την παρατήρηση των αδενωδών τριχωμάτων δυσκολότερη. Όμως με μια πιο προσεκτική ματιά παρατηρείται ότι υπάρχουν αρκετοί τύποι κεφαλοειδών αδένων όπως περιγράφηκαν στα αποτελέσματα. Επίσης, απαντώνται πολύ συχνά αδένες που δεν κατατάσσονται ξεκάθαρα ούτε στους κεφαλοειδείς ούτε στους ασπιδοειδείς. Τέτοιοι περιγράφονται και από άλλους ερευνητές (Argyropoulou et al. 2010, Combrinck et al. 2007), για φυτά της οικογένειας Verbenaceae, ως «μικροί ασπιδοειδείς αδένες με μίσχο» (small-stalked peltate). Επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι και οι ασπιδοειδείς αδένες κατατάσσονται σε περισσότερους από ένα τύπους και ότι διαφοροποιούνται της προσαξονικής πλευράς από αυτούς της αποαξονικής, τουλάχιστον ως προς τα εκκρίματα τους. Οι κεφαλοειδείς αδένες κατανέμονται ομοιόμορφα τόσο στην αποαξονική επιφάνεια όσο και στην προσαξονική ενώ οι ασπιδοειδείς αδένες εμφανίζονται κυρίως στην αποαξονική. Οι Antunes et al. (2004) αναφέρουν ότι οι ασπιδοειδείς αδένες εμφανίζονται μόνο στην αποαξονική μεριά κάτι το οποίο δε παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία. Θα χρειαζόταν περισσότερο έρευνα γύρω από τις αδενώδεις τρίχες και την ταξινόμηση αυτών.

Με τις ιστοχημικές δοκιμές παρατηρήθηκε ότι τα τερπένια, και ταννίνες παράγονται κυρίως τις αδενώδεις τρίχες αλλά και στα κύτταρα του φύλλου, ενώ φλαβόνες και φλαβονόλες εντοπίζονται στα αδενώδη και μη αδενώδη τριχώματα. Αυτό είναι σύμφωνο με τη βιβλιογραφία αφού φλαβόνες όπως λουτεολίνη, κισιλιόλη, κισιμαριτίνη, απιγενίνη, σαλβιγενίνη και φλαβονόλες όπως κερκετίνη ρουτίνη έχουν εντοπιστεί στα εναέρια τμήματα του *T. polium* και αναφέρονται στη βιβλιογραφία (τα μόνα φλαβονοειδή που αναφέρονται) (Verykokidou-Vitsaropoulou & Vajias 1986, Oganessian et al. (1985), όπως αναφέρεται από τους Oganessian et al. 1992, Proestos & Komaitis 2007, Rizk et al. 1986).

Ελαιοκύτταρα

Τα ελαιοκύτταρα-κοιλότητες που παρατηρούνται στο μεσόφυλλο, αναφέρονται ως ιδιόβλαστα ελαιοκύτταρα από τους Lakusic et al. 2010, οι οποίοι αναφέρουν και αντίστοιχες δομές για το συγγενές είδος *T. montanum*. Στην οικογένεια Lamiaceae και υποτριττό Melittidinae παρατηρήθηκαν δύο είδη ιδιαίτερων ιδιόβλαστων (Abu-Asab & Cantino 1987). Ένα από αυτά βρέθηκε μόνο στο γένος *Pogostemon* και μοιάζει με ελαιώδη αδένα, μέσα στο φύλλο. Αυτές οι δομές έχουν ήδη σημειωθεί από το Solereder (1908), ο οποίος τις περιέγραψε ως "εσωτερικές αδενώδεις τρίχες" και αποτελούνται από ένα κοντό μίσχο από δύο ή τρία φελλοποιημένα (suberized) κύτταρα και μια μονοκύτταρη, cuticularized κεφαλή που προβάλλει σε μεσοκυττάρια διαστήματα. Είχε παρατηρήσει επίσης ότι οι εκκρίσεις

συσσωρεύονται κάτω από την εφυμενίδα., η οποία ανασηκώνεται σαν κύστη, όπως ένα εξωτερικό αδενικό τρίχωμα.

Το δεύτερο είδος ιδιοβλάστη είναι ένα μεγάλο, ασκοειδές κύτταρο, πιθανώς εκκριτικό σε λειτουργία. Αυτό το είδος παρατηρήθηκε σε όλα τα είδη *Brazoria* και *Physostegia*, που μελετήθηκαν από τους ερευνητές. Αυτές οι δομές έχουν σημειωθεί από το Solerender (1908) στο *Physostegia intermedia*. Και οι δύο ερευνητές που αναφέρουν τις δομές αυτές προτείνουν ότι στα Lamiales αυτοί οι ασκοειδείς ιδιοβλάστες είναι μοναδικοί σε αυτά τα δύο γένη (όπως αναφέρεται στους Abu-Asab & Cantino 1987). Οι Lersten και Curtis (1998) ανέφεραν την παρουσία παρόμοιων "ιδιοβλαστών κυττάρων» σε δύο είδη της οικογένειας Lamiaceae. Τα ιδιοβλάστα κύτταρα που παρατηρήθηκαν από τους Lersten και Curtis (1998) εντοπίζονται οπουδήποτε στο μεσόφυλλο. Τα ιδιοβλάστα ελαιοφόρα κύτταρα αποτελούν πιο απλές δομές και απαντώνται σε ανώτερα και κατώτερα φυτά. Πρόκειται για διάσπαρτα μεμονωμένα κύτταρα μέσα σε ιστούς τα οποία ξεχωρίζουν από τα γειτονικά τους λόγω μεγέθους και ενδοκυτταρικής δομής. Το αιθέριο έλαιο συγκεντρώνεται σε μια χυμοτοπιακή κατασκευή της οποίας ο όγκος μεγαλώνει προοδευτικά (Μποζαμπαλίδης 2008). Μερικές φορές εμφανίζονται απομονωμένα. Δεν είναι κατ'ανάγκη σε επαφή με την ηθμαγγειώδη δεσμίδα και αν είναι, τότε αυτό μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε σημείο της δεσμίδας. Αντίθετα, στις κοιλότητες του *T. polium* εμφανίζονται σε επαφή με τη δεσμίδα, προς την προσαξονική επιφάνεια και όπως ένα κύτταρο της δεσμίδας του κολεού.

Οι Christodoulakis et al. (2010), αναφέρουν πως αυτές οι κοιλότητες εμφανίζονται άδειες. Χρειάζεται να σημειωθεί ότι υπάρχει μεγάλη δυσκολία στη μονιμοποίηση και εμποτισμό με ρητίνη αυτών των χώρων λόγω του ισχυρά κουτινοποιημένου κυτταρικού τοιχώματος και χρειάστηκαν πολλές δοκιμές ώσπου να πετύχουμε μια καλή μονιμοποίηση αυτών των χώρων και εμποτισμό με ρητίνη. Με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας φαίνεται να είναι κυτταρικής προέλευσης, πιθανά να σχετίζονται με τα κύτταρα του δεσμικού κολεού και τα πλαστίδια που συναντήθηκαν σε αυτό μας επιτρέπει να υποθέσουμε ότι πρόκειται για ζωντανά εκκριτικά κύτταρα. Το ότι το κυτταρικό τοίχωμα είναι τόσο ισχυρά κουτινοποιημένο δημιουργεί επιπρόσθετο προβληματισμό σχετικά με τη λειτουργία αυτών των κοιλότητων. Αυτοί οι χώροι θα μπορούσε να σχετίζονται με την αποθήκευση ουσιών που πιθανά να χρειάζεται να απομονωθούν από το υπόλοιπο κύτταρο, απ' την άλλη, η σύνδεση των κοιλότητων αυτών με τα ξυλώδη αγγεία των αγωγών ιστών δείχνει πιθανώς την εξάρτηση των κυττάρων αυτών στη ροή του νερού. Εναλλακτικά θα μπορούσε να είναι εμποτισμένα με σουβερίνη που αναφέρεται ότι περιβάλλει επίσης τα κύτταρα του περιδεσμικού κολεού στα C₄ φυτά. Η λειτουργία της σουβερίνης σε αυτήν την περίπτωση πιθανόν συνίσταται στο να εμποδίζει τη διάχυση του CO₂, το οποίο παράγεται από τις αντιδράσεις αποκαρβοξυλίωσης, έξω από τα κύτταρα του περιδεσμικού κολεού.

Διμορφισμός-Πολυμορφισμός.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας φαίνεται ότι τα φύλλα του *T. polium* παρουσιάζουν μορφολογικές αλλά κυρίως ανατομικές διαφορές κατά τη διάρκεια του έτους, κάτι που υποστηρίζει την υπόθεση ότι είναι πολυμορφικό. Καταρχάς, το πάχος του ελάσματος στα χειμωνιάτικα φύλλα είναι πολύ μικρότερο σε σχέση με τις άλλες εποχές. Οι αυξήσεις στο πάχος ανάμεσα στα φύλλα του χειμώνα και της άνοιξης, αποδίδονται καταρχάς στη γενική αύξηση του μεγέθους όλων των κυττάρων και την αύξηση των μεσοκυττάρων χώρων. Οι διαφορές που εντοπίζονται όσον αφορά το πάχος του φύλλου μοιάζουν με τις διαφορές που παρουσιάζουν τα φύλλα «σκιάς και φωτός» σύμφωνα με τους Terashima et al. (2006). Σύμφωνα με αυτό τα φύλλα που εκτίθενται σε υψηλή ηλιακή ακτινοβολία, είναι πιο παχιά αυτών που αναπτύσσονται στη σκιά, τα οποία είναι πιο λεπτά και με πιο λεπτούς χλωροπλάστες. Η αντίσταση στη διάχυση του CO₂ στο φύλλο είναι σημαντικός παράγοντας ώστε η συγκέντρωση του CO₂ στους χλωροπλάστες να μην είναι χαμηλή. Σύμφωνα με αυτό, τα φύλλα που εκτίθενται σε υψηλή ηλιακή ακτινοβολία και έχουν υψηλό φωτοσυνθετικό μεταβολισμό χρειάζονται μεγάλο εσωτερικό χώρο για ανταλλαγή αερίων. Αυτό εξηγεί κατά μία εκδοχή γιατί αυτά τα φύλλα είναι πιο παχιά από εκείνα που είναι στη σκιά (Terashima et al. 2006).

Στα καλοκαιρινά φύλλα επιπλέον αυξάνεται ο αριθμός των στρώσεων του πασσαλώδους παρεγχύματος. Αύξηση του πάχους του φύλλου με την αύξηση των στοιβάδων του πασσαλώδους παρεγχύματος, δε δημιουργεί προβλήματα φωτισμού στα κατώτερα στρώματα και αυτό είναι πολύ σημαντικό για τα ξηρόφυτα, αφού επιτρέπει την αποδοτικότερη φωτοσύνθεση χωρίς μεγάλες απώλειες νερού. Γενικά, με την αύξηση του πάχους του ελάσματος μπορεί να επιτυγχάνεται μειωμένη εξωτερική επιφάνεια σε σχέση με τον όγκο τους. Ακόμα το έλασμα του φύλλου τους πιο ζεστούς μήνες είναι περισσότερο συστρεμμένο που έχει σχέση με την τάση για περιορισμό των επιφανειών των οργάνων τα οποία έρχονται σε επαφή με την ατμόσφαιρα.

Τους καλοκαιρινούς μήνες τα επιδερμικά κύτταρα των φυτών είναι μεγαλύτερα και έχουν πιο παχιά κυτταρικά τοιχώματα, ιδιαίτερα της άνω επιδερμίδας. Παρατηρείται σημαντική αύξηση του πάχους της εφυμενίδας. Ακόμα, τα μη αδενώδη τριχώματα των φύλλων παρουσιάζουν κάποια αύξηση τους θερινούς μήνες. Τα παραπάνω αποτελούν σημαντικούς παράγοντες οι οποίοι προβάλλουν ισχυρή αντίσταση στις διαπνευστικές απώλειες νερού. Δεν παρατηρηθήκαν αλλαγές στην πυκνότητα των αδενωδών τριχών ανάμεσα στις διάφορες εποχές. Μετρήσεις σχετικά με την πυκνότητα και τον αριθμό των αδενωδών τριχών φαίνεται να είναι σχεδόν αδύνατες όπως σχολιάζουν και άλλοι ερευνητές (Antunes et al. 2004), λόγω του πολύ πυκνού στρώματος μη αδενωδών τριχών που καλύπτουν την επιφάνεια του φύλλου.

Ακόμα, φαίνεται να συγκεντρώνονται φαινολικά ή άλλοι μεταβολίτες και το κυτόπλασμα εμφανίζεται πιο σκούρο, ειδικά στα επιδερμικά κύτταρα. Παρατηρήθηκε επίσης μια διαφορετική ανάπτυξη των χλωροπλαστών οι οποίοι τους καλοκαιρινούς μήνες εμφανίζονται με μεγάλους αμυλόκοκκους και οι μεμβράνες των γκράνα δεν είναι τόσο καλά ανεπτυγμένες. Όλα τα παραπάνω συμφωνούν με τα αποτελέσματα αντίστοιχων εργασιών που εξετάζουν ανατομικές διαφορές στα φύλλα διμορφικών φυτών στο μεσογειακό οικοσύστημα και αναφέρονται σε αντίστοιχο κεφάλαιο της εισαγωγής (Christodoulakis 1989, Christodoulakis & Bazos 1990, Kofidis et al. 2003, Kofidis et al. 2007, Kofidis and Bosabalidis 2008). Οι διαφορές στη λεπτή δομή των χλωροπλαστών που παρατηρούνται είναι αντίστοιχες με αυτές που παρατηρούνται σε φύλλα υψηλού και χαμηλού φωτισμού στο φυτό *Spathiphyllum* (Akoumianaki-Ioannidou 2004).

Ακόμα παρατηρείται μια αύξηση στους κρυστάλλους που συγκεντρώνονται στο μεσόφυλλο τους καλοκαιρινούς μήνες που τα φύλλα είναι γηραιότερα. Οι κρύσταλλοι συνήθως σχηματίζονται στις κοιλότητες των κυττάρων και συχνότερα των επιδερμικών, όμως μπορεί να εντοπίζονται στους μεσοκυττάριους χώρους και στον υποστοματικό χώρο. Οι παραπάνω παρατηρήσεις συμφωνούν με τη σχετική βιβλιογραφία όπου αναφέρεται ότι κρύσταλλοι μπορεί να εντοπίζονται σε οποιοδήποτε μέρος του φύλλου αλλά συχνότερα απαντώνται στην επιδερμίδα και ότι πολλές φορές η παρουσία κρυστάλλων γίνεται πιο συχνή, όσο το φυτό μεγαλώνει (Metcalf & Chalk 1985).

Οι κρύσταλλοι στα αγγειόσπερμα συνήθως αποτελούνται από οξαλικό ασβέστιο. Η ουσία αυτή μπορεί να περιέχει προσμίξεις ή οι κρύσταλλοι μπορεί να αποτελείται εξ ολοκλήρου από άλλα άλατα ασβεστίου όπως μηλικού ασβεστίου (σφαιρικοί κρύσταλλοι) και φωσφορικού ασβεστίου (κυβικοί ή σφαιρικοί κρύσταλλοι). Απαντώνται όμως και κρύσταλλοι διαφορετικής χημικής φύσεως, ορισμένοι από τους οποίους είναι οργανικοί. Τέτοιες είναι οι κρυσταλλικές ουσίες εσπεριδίνη και διοσμίνη που ανήκουν στα φλαβονοειδή. Η διοσμίνη είναι γλυκοζίτης της φλαβόνης διοσμετίνης. Αν και ως καθαρές ουσίες αποτελούνται από βελόνες σε σχήμα κρυστάλλων, απαντώνται σε φυτικά κύτταρα ως εξειδικευμένες μορφές κρυσταλλικών συμπλεγμάτων (Metcalf & Chalk 1985). Ο Solereder (1908) αναφέρει την εσπεριδίνη με τη μορφή των δενδριτικών κρυστάλλων σε δέκα γένη Rutaceae και ως σφαιρο-κρυσταλλικές (sphaerocrystalline) μάζες στην επιδερμίδα ορισμένων ειδών. Οι Metcalf & Chalk (1985) αναφέρονται στην παρουσία κρυστάλλων εσπεριδίνης ή διοσμίνης σε ορισμένα Lamiaceae όπως *Mentha piperita* L. και το *Teucrium montanum* L.. Πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι απαντώνται στα φυτά τόσο σε άμορφη όσο και σε κρυσταλλική μορφή. Οι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι είναι συνήθως μικροί και ατρακτοειδούς σχήματος ή κυβικοί.

Ορισμένοι υποστηρίζουν ότι στους κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου «εναποθέτουν» τα φυτά το ανεπιθύμητο οξαλικό οξύ, και άλλοι ότι λειτουργεί σαν απόθεμα που επανεντάσσεται

στο μεταβολικό κύκλο κατά περίσταση. Δυστυχώς υπάρχουν πολλά στοιχεία που παραμένουν ασαφή και οι γνώμες διαφέρουν σχετικά με το ρόλο που έχουν οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου στο μεταβολισμό των φυτών. Περισσότερα τελεολογική είναι η άποψη ότι οι κρύσταλλοι, αναλαμβάνουν την προστασία των φυτών κατά των ζώων, ή ότι παρέχουν μηχανική υποστήριξη στους ιστούς σε περιόδους ξηρασίας. Οι κρύσταλλοι ταξινομούνται και βάση σχήματος (Metcalf & Chalk 1985).

Οι μορφολογικές διαφορές που παρατηρούνται θα πρέπει να οφείλεται τόσο στην ανανέωση του φυλλώματος όσο και στην διαφοροποίηση-εξέλιξη των φύλλων που διατηρούνται. Εφ'όσον το φυτό παύει να εκπύσσει καινούρια μεγάλα φύλλα από την περίοδο που ξεκινάει να αναπτύσσει την ταξιανθία του επάκρια, οι αλλαγές που παρατηρούνται τους θερινούς μήνες λογικά οφείλονται σε εξέλιξη των ίδιων φύλλων, όπως δευτερογενείς αυξήσεις των κυτταρικών τοιχωμάτων της επιδερμίδας, ανάπτυξη υποτυπώδους κολλεγχύματος, αύξηση του αριθμού των στρώσεων του πασσαλώδους παρεγχύματος, παχύνσεις της εφυμενίδας και ανάπτυξη περισσότερων τριχιδίων. Από την άλλη το φυτό μετά το τέλος της περιόδου της άνθισης ανανεώνει τα φύλλα του οπότε τα φθινοπωρινά φύλλα πρόκειται για φύλλα που αναπτύσσονται εκείνη την εποχή και παρουσιάζουν επίσης διαφορές. Έτσι, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι ο διμορφισμός ή πολυμορφισμός δεν επιτυγχάνεται με ένα μόνο τρόπο, συμπέρασμα και άλλων ερευνητών που εξετάζουν ανατομικές διαφορές στα φύλλα διμορφικών φυτών στο μεσογειακό οικοσύστημα (Κυπαρίσσης 1995).

Ελαιοσταγονίδια

Μια σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε κυρίως με την ιστοχημεία είναι μια εποχιακή διακύμανση στα ελαιοσταγονίδια των κυττάρων του μεσόφυλλου. Σύμφωνα με τους Lersten et al. (2006), πρόκειται για ουδέτερα αποθηκευτικά «ελαιοσώματα» που απαντώνται σε κύτταρα του μεσόφυλλου πολλών αγγειοσπέρμων αλλά είναι κάπως ξεχασμένα από τη βιβλιογραφία. Τα ουδέτερα έλαια δε συμπυκνώνονται ούτε εξατμίζονται στον αέρα, δεν είναι αρωματικά και έχουν ήπια γεύση. Συνθέτονται από τριγλυκερίδια που είναι τριεστέρες λιπαρών οξέων γλυκερόλης. Τα τελευταία αποτελούν την συνηθέστερη μορφή αποθήκευσης λιπιδίων στα φυτά (Facciotti and Knauf, 1998 όπως αναφέρεται από τους Lersten et al. 2006). Τα τριγλυκερίδια συναντώνται και ως ανεξάρτητα ελαιοσωμάτια (oil bodies, μερικές φορές λέγονται και oleosomes) στο κυτόπλασμα ή ως αποθήκες μέσα στα πλαστίδια. Ένα ελαιοσωμάτιο είναι μία σφαίρα από τριγλυκερίδια που περιβάλλονται και καλύπτονται από συγκεκριμένες πρωτεΐνες, οι οποίες ονομάζονται *ελαιοσίνες*. Ο Lidforss (1893), όπως αναφέρεται από τους Lersten et al. (2006) περισσότερο από έναν αιώνα πριν, ανέφερε ήδη ότι, ενώ είναι γνωστός ο αποθηκευτικός ρόλος των ελαίων για τα σπέρματα εντούτοις έχει

δοθεί πολύ μικρή σημασία στις αποθήκες ελαίων στο μεσόφυλλο των φύλλων, με εξαίρεση τις σταγόνες ελαίου που βρίσκονται στους χλωροπλάστες.

Τα ελαιοσώματα στα κύτταρα του μεσόφυλλου των φύλλων του σιταριού έχει αναφερθεί ότι ποικίλουν όσον αφορά τη διάμετρο και ότι παραμένουν κατά την ωρίμανση και τη γήρανση του. Η ανάλυσή τους έδειξε ότι η σύνθεση αυτών των ελαιοσωματίων είναι 50–60% τριγλυκεριδίων και 15–40% εστέρες κηρών (Lersten et al. 2006). Οι Oliver et al. (2009) με χημικές αναλύσεις των λιπιδίων που βρίσκονται στα φύλλα έχουν τεκμηριώσει ότι πρόκειται για τριγλυκερίδια και αυτά τα λιπαρά οξέα που συνδέονται με την κατηγορία αυτή των λιπιδίων έχουν μικρότερο μήκος αλυσίδας. Σύγκριση με την ανάλυση των τριγλυκεριδίων των Lin & Oliver (2008), στα φύλλα διάφορων φυτικών ειδών, έδειξε ότι υπάρχουν διαφορετικά επίπεδα ανάμεσα στα διάφορα φυτικά είδη αλλά και ότι η σύνθεση τους ενδέχεται να ποικίλει μεταξύ διαφορετικών ιστών και οργάνων. Τα λιπαρά οξέα φάνηκαν να είναι παρόμοια με εκείνα που βρέθηκαν στις τριακυλογλυκερόλες των σπερμάτων, παρά με αυτά των λιπιδίων των μεμβρανών των φύλλων, στα ίδια τα φυτά.

Πολλά φύλλα περιέχουν τριγλυκερίδια. Δεν υπάρχει αρκετή πληροφόρηση για το ρόλο τους στα φύλλα των φυτών. Οι Lin & Oliver (2008) προτείνουν ότι τα τριγλυκερίδια εξυπηρετούν μαζί με τους υδατάνθρακες ως ημερήσια φωτοσυνθετική αποθήκη στα φυτά. Οι Pihakaski et al. (1987) έκανε επισκόπηση της βιβλιογραφίας γύρω από αυτό το θέμα και έδειξε ότι ένα σκληρόφυλλο αειθαλές φυτό υποαρκτικών περιοχών *Diapensia lapponica* (Diapensiaceae), έχει ένα μόνο μεγάλο σώμα λιπιδίου σε κάθε κύτταρο του μεσόφυλλου τους πιο θερμούς καλοκαιρινούς μήνες, και πολλά μικρότερα κατά τη διάρκεια του ψυχρού χειμώνα. Αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι αυτή η συγκέντρωση σε έλαια στα κύτταρα του μεσόφυλλου υπόκεινται σε εποχική διακύμανση. Ωστόσο εκείνοι δίνουν σαν πιθανή λειτουργία για τα ελαιοσώματα την προσαρμογή σε χαμηλές θερμοκρασίες. Οι ερευνητές υποθέτουν ότι βοηθάει στο να μειωθεί το σημείο πήξης των κυττάρων. Δεν παρατηρήθηκαν ελαιοσώματα στα επιδερμικά κύτταρα σε κάποιο από τα είδη σε αυτή την έρευνα, ούτε κάποια αναφορά στις αναφορές της βιβλιογραφίας. (όπως αναφέρεται από τους Lersten et al. 2006)

Το ποιος μοριακός μηχανισμός ελέγχει αυτό το ενδιαφέρον φαινόμενο «της φυσιολογίας» μπορεί να αξίζει περαιτέρω διερεύνηση. Δεν είναι ξεκάθαρο το γιατί τα συγκεκριμένα φυτά χρησιμοποιούν τόσο τα λιπίδια όσο και τους υδρογονάνθρακες σαν αποθέματα ενέργειας. Είναι πιθανό ότι τα τριγλυκερίδια των φύλλων μπορεί να αποτελούν τα ημερήσια αποθέματα ενέργειας και άνθρακα, εν μέρει, συμπληρώνοντας το ρόλο που παραδοσιακά έχει το άμυλο σε αυτά τα φυτά. Οι Oliver et al. (2009) στα φύλλα, υπολογίζοντας τις διαφορές στα επίπεδα κατά τη διάρκεια της ημέρας δείχνουν ότι περίπου το 5% του συνόλου της φωτοσύνθεσης, ενσωματώνεται σε τριακυλογλυκερόλες στα φύλλα του ξινόμηλου. Αυτή είναι μια ενδιαφέρουσα ιδέα και θα μπορούσε να δίνει ένα νέο ρόλο για τα λιπίδια που υπάρχουν στα

φύλλα (Oliver et al. 2009). Στην παρούσα εργασία φαίνεται ότι υπάρχει μια εποχική διακύμανση στην έκταση των ελαιοσταγονιδίων τα οποία αυξάνουν τις θερμές περιόδους και υψηλής ηλιοφάνειας οι οποίες συμπίπτουν και με τις περιόδους ξηρασίας. Με αυτό τον τρόπο, θα μπορούσε πιθανά να αποθηκεύεται ενέργεια ή μεταβολικό νερό - μια στρατηγική που ακολουθούν και τα ζώα της ερήμου. Ακόμα, ο τρόπος που παρατάσσονται κάτω από την άνω επιδερμίδα να δημιουργούν ένα συνεχές στρώμα μας επιτρέπει να υποθέσουμε ότι μπορεί να προσφέρει κάποιο είδος προστασίας.

Επιπλέον, θα μπορούσε να αποτελούν σημαντικές πηγές εμπορικών ελαίων. Το ένα τέταρτο τουλάχιστον των φυτών που έχουν μελετηθεί ανατομικά περιέχουν ένα ή περισσότερα ελαιосωμάτια στα κύτταρα του μεσόφυλλου τους. Τα τριγλυκερίδια πολλών σπόρων και φρούτων έχουν ιδιαίτερη σημασία από οικονομική άποψη και ως εκ τούτου, έχει δοθεί σε αυτά μεγάλη έμφαση στη βιβλιογραφία. (Oliver et al. 2009)

Συμπεράσματα.

Τα φύλλα του *T. polium* χαρακτηρίζονται από πλούσιο τρίχωμα (indumentum), που καλύπτει και τις δύο πλευρές των φύλλων και αποτελείται από πολυάριθμα αδενώδη και πολυκύτταρα μη αδενώδη τριχώματα, με δενδροειδή μορφή. Το σχετικά χαλαρό πασσαλώδες παρέγχυμα, τα σχετικά υπερυψωμένα στομάτια και η απουσία ανεπτυγμένων μηχανικών-στηρικτικών ιστών, έρχεται σε αντίθεση με τη συνηθισμένη εικόνα του τυπικού ξηρόφυτου. Φαίνεται ότι το *T. polium* αποκλίνει κατά κάποιο τρόπο, από τον ξηρομορφικό χαρακτήρα και πιθανώς αντισταθμίζει αυτό το "ελάττωμα", με την αξιοποίηση της προστασίας που παρέχεται από το πυκνό τρίχωμα.

Οι αδενώδεις τρίχες που καλύπτουν επίσης όλα τα εναέρια μέρη του φυτού φαίνεται να είναι διαφόρων ειδών και είναι υπεύθυνες για την έκκριση του αιθέριου ελαίου. Οι κεφαλοειδείς αδένες κατανέμονται ομοιόμορφα τόσο στην αποαξονική επιφάνεια όσο και στην προσαξονική ενώ οι ασπιδοειδείς αδένες εμφανίζονται κυρίως στην αποαξονική. Τα αποτελέσματα των ιστοχημικών δοκιμών έδειξαν ότι τα τερπένια, και ταννίνες παράγονται κυρίως στις αδενώδεις τρίχες αλλά και στα κύτταρα του φύλλου, ενώ φλαβόνες και φλαβανόλες εντοπίζονται στα αδενώδη και μη αδενώδη τριχώματα.

Τα αιθέρια έλαια των ταξιανθιών και των φύλλων του *T. polium* παραλήφθηκαν με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης. Οι ανθισμένες ταξιανθίες είχαν σχεδόν τριπλάσια απόδοση σε αιθέρια έλαια (1,65%) σε σχέση με τα φύλλα (0,45%). Η διαφορά στην απόδοση των αιθέριων ελαίων και στις αναλογίες των συστατικών που παρουσιάζονται ανάμεσα στις ταξιανθίες και τα φύλλα, δεν συνδυάζεται με τυχόν διαφορές στην πυκνότητα ή το είδος των αδενωδών τριχών που υπάρχουν στους δύο διαφορετικούς ιστούς. Φαίνεται σκόπιμο για το συγκεκριμένο φυτό να συλλέγεται κατά τη διάρκεια της άνθισης μαζί με τις ταξιανθίες του προκειμένου να αξιοποιηθεί το αιθέριο έλαιό του. Τα αιθέρια έλαια των φύλλων και των

ταξιανθιών αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία. Βρέθηκε να αποτελούνται σχεδόν αποκλειστικά από μονοτερπένια και σεσκιτερπένια οξυγονωμένα ή μη. Τα συστατικά που τα συνιστούν στη συντριπτική τους πλειοψηφία είναι κοινά και έχουν ως κύριο συστατικό το β-καρυοφυλλένιο.

Η ανατομία των φύλλων του *T. polium* είναι αρκετά απλή και παρουσιάζει αρκετές εποχικές διαφορές. Οι μορφολογικές διαφορές που παρατηρούνται θα πρέπει να οφείλονται τόσο στην ανανέωση του φυλλώματος όσο και στην διαφοροποίηση των φύλλων που διατηρούνται. Γενικά, τους καλοκαιρινούς μήνες ενισχύονται χαρακτηριστικά που μπορεί να βοηθούν στον περιορισμό των απωλειών νερού, όπως: αύξηση του πάχους του ελάσματος των φύλλων και αυξημένη συστροφή που ισοδυναμεί με μειωμένη εξωτερική επιφάνεια σε σχέση με τον όγκο τους, αύξηση του πάχους των κυτταρικών τοιχωμάτων της επιδερμίδας και της εφυμενίδας, αύξηση του τριχώματος του ελάσματος. Επίσης παρατηρείται αύξηση του αριθμού των στρώσεων του πασσαλώδους παρεγχύματος από μία σε δύο και, ανάπτυξη υποτυπώδους κολλεγχύματος στα καλοκαιρινά φύλλα. Ακόμα, παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στη λεπτή δομή των χλωροπλαστών. Τα κύτταρα του μεσόφυλλου φαίνεται να συσσωρεύουν ελαιοσταγονίδια, των οποίων ο αριθμός και το μέγεθος αυξάνεται σημαντικά, τους ζεστούς μήνες του έτους.

Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό του φύλλου είναι η παρουσία ιδιόβλαστων ελαιοκυττάρων-κοιλοτήτων που παρατηρούνται στο μεσόφυλλο, πάνω από τις δευτερεύουσες αγγειακές δεσμίδες. Τα κυτταρικά τους τοιχώματα είναι ιδιαίτερα εμποτισμένα σε κουτίνη ή σουβερίνη, και φαίνεται πως συσσωρεύονται σε αυτούς κάποια λιπόφιλα συστατικά. Φαίνεται να είναι κυτταρικής προέλευσης και πιθανά να σχετίζονται με τα κύτταρα του δεσμικού κολεού. Σπάνια εντοπίζονται πλαστίδια σε αυτούς τους χώρους κάτι που μας επιτρέπει να υποθέσουμε ότι πρόκειται για ζωντανά εκκριτικά κύτταρα. Κάποια τέτοια δομή δεν βρήκαμε να αναφέρεται στη βιβλιογραφία για συγγενές ή άλλο είδος.

Θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι ανατομικές διαφορές ανάμεσα στις εποχές, η παραγωγή αιθέριων ελαίων και δευτερογενών μεταβολιτών όπως τερπενοειδή, φλαβονοειδή και φαινολικές ενώσεις φαίνεται να αποτελούν μέρος της αμυντικής αντίδρασης του φύλλου έναντι στις καταπονήσεις του μεσογειακού οικοσυστήματος και αυτό κατά μια εκδοχή εξηγεί την ευρεία χρήση αυτού του φυτού για φαρμακευτικούς σκοπούς.

5 Βιβλιογραφία:

- Abdollahi, M., Karimpour, H., & Monsef-Esfehani, H.R. (2003). Antinociceptive effects of *Teucrium polium* L. Total extract and essential oil in mouse writhing test. *Pharmacological Research* **48**: 31-35.
- Adams, R. P. (2001). Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, IL, USA.
- Akournianaki-Ioannidou, A., Georgakopoulos, J.H., Fasseas, C., Argyroudi-Akoyunoglou, J.H. (2004) Photoacclimation in *Spathiphyllum*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **73**: 149-158.
- Antunes, T., Sevinate-Pinto, I., Barroso, J. G., Caveleiro, C., & Salgueiro, L. R. (2004). Micromorphology of trichomes and composition of essential oil of *Teucrium polium*. *Flavour Fragr. J.* **19**. 336-340.
- Aronne, G., & De Micco, V., (2001). Seasonal dimorphism in the Mediterranean *Cistus incanus* L. subsp. *incanus*. *Annals of Botany* **87**(6): 789-794.
- Ascensão, L., Mota, L., and De M., Castro, M. 1999. Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: Morphology, distribution and Cytochemistry. *Annals of Botany* **84**: 437-447.
- Autore, G., Capasso, F., De Fusco, R., Fasulo, M.P., Lembo, M., Mascolo, N., & Menghini, A. (1984). Antipyretic and antibacterial actions of *Teucrium polium*. *Pharmacological Research Communications*, vol. **16**, no 1.
- Badisa, R.B., Tzakou, O., Couladis, M., Pilarinou, E. (2003) Cytotoxic Activities of some Greek Labiatae Herbs. *Phytother. Res.* **17**: 472-476.
- Baluchnejadmojarad, T., Roghani, M., & Roghani-Dehkordi, F. (2005) Antinociceptive effect of *Teucrium polium* leaf extract in the diabetic rat formalin test. *Journal of Ethnopharmacology* **97**: 207-210.
- Bedir, E., Tasdemir, D., Calis, I., Zerbe, O., Sticher, O. (1999). Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium polium*, *Phytochemistry*, vol.**51**, no 7, pp. 921-925.
- Berenbaum, M. (1985). Brementown revisited: allelochemical interactions in plants. *Rec. Adv. Phytochem.* **19**: 139-169.
- Bisio, A., Corallo, A., Gastaldo, P., Romussi, G., Ciarallo, G., Fontana, N., De Tommasi, N. and Profumo, P. (1999). Glandular Hairs and Secreted Material in *Salvia blepharophylla* Brandegees ex Epling Grown in Italy. *Annals of Botany* **83**: 441-452.
- Bosabalidis, A.,M. (2010). Ultrastructure, development and histochemistry of the polysaccharide-containing subcuticular compartments in *Origanum dictamnus* L. peltate glandular hairs. *Flavour Fragr. J.* **25**: 202-205.
- Bosabalidis, A.,M., & Skoula, M. (1998). A Comparative Study of the Glandular Trichomes on the Upper and Lower Leaf Surfaces of *Origanum x intercedens* Rech. *Journal of Essential Oil Research* **10**: 277-286.
- Bosabalidis, A.,M., & Tsekos, I. (1982). Glandular scale development and essential oil secretion in *Origanum dictamnus* L. *Planta* **156**: 496-504.
- Bosabalidis, A.,M., & Tsekos, I. (1984). Glandular Hair Formation in *Origanum* Species. *Annals of Botany* **53**: 559-563.
- Brown, D., (1995). Encyclopedia of herbs and their uses. Dorling Kindersley, London.
- Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R. L. (2000). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, ML.
- Camps, F., Coll, J., Dargallo, O., Rius, J., & Miravittles, C. (1986). Clerodane diterpenoids from *teucrium* and *ajuga* plants. *Phytochemistry* vol. **26**, No. 5, pp.1475-1479.
- Capasso F, Cerri R, Morrica P, Senatore F., 1983. Chemical composition and anti-inflammatory activity of an alcoholic extract of *Teucrium polium* L. *L. Boll Soc Ital Sper.* **59**(11): 1639-1643.

- Capasso, R., Izzo, A. A., Pinto, L., Bifulco, T., Vitobello, C., & Mascolo, N. (2000). Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia* **71**: 58-65.
- Chizzola, R., (2006). Volatile compounds from some wild growing aromatic herbs of the Lamiaceae from southern France. *Plant Biosyst.* **40(2)**:206–210.
- Christodoulakis NS and Bazos J (1990). Leaf Anatomy of three Seasonally Dimorphic Subshrubs. *Acta Oecologica* **11**: 291-296.
- Christodoulakis NS (1989). An Anatomical Study of Seasonal Dimorphism in the Leaves of *Phlomis fruticosa*. *Annals of Botany* **63**: 389-394.
- Christodoulakis NS, Tsimbani H and Fasseas C (1990). Leaf Structural Peculiarities in *Sarcopoterium spinosum*, a Seasonally Dimorphic Subshrub. *Annals of Botany* **65**: 291-300.
- Christodoulakis, N.S. 1992. Structural Diversity and Adaptations in Some Mediterranean Evergreen Sclerophyllous Species. *Environmental and Experimental Botany* **32**: 295-305.
- Christodoulakis, N., S. Kogia, D., Mavroeidi, D., and Fasseas, C. (2010). Anatomical and histochemical investigation of the leaf of *Teucrium polium*, a pharmaceutical sub-shrub of the Greek phryganic formations. *Journal of Biological Research-Thessaloniki* **14**: 199 – 209.
- Clark, G. (1981). Staining Procedures. 4th Edition. Williams and Wilkins.
- Couladis, M., Tzakou, O., Verykokidou, E., & Harvala, C. (2003). Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. *Phytother. Res.* **17**: 194-195.
- Cozzani, S., Muselli, A., Desjobert, J.M., Bernardini, A.F., Tomi, F., Casanova, J. (2005). Chemical composition of essential oil of *Teucrium polium subsp. capitatum* (L.) from Corsica. *Flavour Fragr. J.* **20**: 436–441.
- Darabpour, E., Motamedi, H., Mansour, S., Mansour, N. (2010). Antimicrobial properties of *Teucrium polium* against some clinical pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, pp. 124-127.
- Davidson, R., Choudhury, H., Origgi, S., Castellan, A., Trichet, V. and Capretti, G. (1995). The reaction of phloroglucinol in the presence of acid with lignin-containing materials. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **91**: 87-93.
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., Capasso, F. (1999). Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*, vol. **65**, No. 4, pp. 337-353.
- Diej, M., J., Ojeda, F., Colomer, M., (1993). Contribucion a la Palinologia del genero *Teucrium* L. en la Peninsula Iberica e islas Baleares y su interes taxonomico. *Lagascalia* **17(1)**: 119-134.
- Dubey, V. S., Bhalla, R. and Luthra, R. (2003). An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biosciences* **28(5)**: 637-646.
- Dudareva, N., Pichersky, E. and Gershenzon, J. (2004). Update on Biochemistry of Plant Volatiles. *Biochemistry of Plant Volatiles. Plant Physiology* **135**: 1893-1902.
- Duke, S. O., Canel, C., Rimando, A. M., Tellez, M. R., Duke, M. V. and Paul, R. N. (2000). Current and Potential Exploitation of Plant Glandular Trichome Productivity. *Advances in Botanical Research* **31**: 121-151.
- Eisenreich, W., Rohdich, F. and Bacher, A. (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science* **6(2)**: 78-84.
- El Oualidi, J., Verneau, O., Puech, S., Dubuisson, J.-Y. (1999) Utility of rDNA ITS sequences in the systematics of *Teucrium* section *Polium* (Lamiaceae). *Pl. Syst. Evol.* **215**: 49-70.
- El Oualidi, J., Rascol, J., P., Martin, A., & Puech, S. (1996). Le Poliumoside, marqueur chimique de la section *Polium* du genre *Teucrium* (Labiatae): l'exception du *T. mideltense*, espèce endémique du Maroc. *Bioch. Syst. Ecol.* **24(3)**: 261-272.
- Esmaili, M. A., & Yazdanparast, R. (2004). Hypoglycaemic effect of *Teucrium polium*: studies with rat pancreatic islets. *Journal of Ethnopharmacology* **95**: 27-30.
- Facciola, S. (1990). Cornucopia – A source book of edible plants. Kampong. Publications
- Fahn, A. (1979). Secretory Tissues in Plants. Academic Press, London
- Fahn, A. (1986). Structural and Functional Properties of Trichomes of Xeromorphic Leaves. *Annals of Botany* **57**: 631-637.

- Fahn, A. (1988). Transley Review No. 14. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist* **108**: 229-257.
- Fahn, A., and Cutler, D.F. (1992). Xerophytes. In: Braun HJ, Carlquist S, Ozenda D, Roth I, eds. *Encyclopedia of plant anatomy, Vol. XIII, 3*. Gebruder Borntraeger, Berlin-Stuttgart: 58-84.
- Fahn, A. (2000). Structure and Function of Secretory Cells. *Advances in Botanical Research* **31**: 37-75.
- Feder, n., and O'Brien, T.P. (1968) Plant Microtechnique. Some principles and new methods. *American Journal of Botany* **55 (1)**: pp.123-142.
- Fernandez, P., Rodriquez, B., Savona, G., & Piozzi, F. (1986). Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium polium* sumsp. capitatum. *Rhytochemistry*, vol. **25**, No. 1, (pp.181-184)
- Fisher, D.B. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie* **16**: 92-96.
- Furr, M., and Mahlberg, P.G. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* **44**: 153-159.
- Galstyan, A. M., Shashkov, A. S., Oganessian, G. B., Mnatsakanyan, V. A. Serebryakov, E. P. (1992). Structures of two new diterpenoids from *Teucrium polium*. *Armenian Academy of Sciences*, No 5, (pp.503-508).
- Gardner, R.O. 1975. Vanillin - hydrochloric acid as a histochemical test for tannin. *Stain Technology* **50**: 315-317.
- Gershenzon, J., McCaskill, D., Rajaonarivony, J. I. M., Mihaliak, C., Karp, F. and Croteau, R. (1992). Isolation of Secretory Cells from Plant Glandular Trichomes and Their use in Biosynthetic Studies of Monoterpenes and Other Gland Products. *Analytical Biochemistry* **200**: 130-138.
- Gershenzon, J., Maffei, M. and Croteau, R. (1989). Biochemical and Histochemical Localization of Monoterpene Biosynthesis in the Glandular Trichomes of Spearmint (*Mentha spicata*). *Plant Physiology* **89**: 1351-1357.
- Gersbach, P.V., Wyllie, S.G., and Sarafis, V. 2001. A new histochemical method for localization of the site of monoterpene phenol accumulation in plant secretory structures. *Annals of Botany* **88**: 521-525.
- Gertsch, J., Leonti, M., Raduner, S., Racz, Il., Chen, J.-Z., Xie, X.-Q., Altamann, K.-H., Karsak, M., Zimmer, An. (2008). Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *PNAS*. vol. **105**, no 26, 9099-9104.
- Gharaibeh, M. N., Elayan, H. H., Salhab, A. S. (1988). Hypoglycemic effects of *Teucrium polium*. *Journal of Ethnopharmacology* **24**: 93-99.
- Grimstone, A., and Skaer, R. (1972). A guidebook to microscopical methods. Cambridge University Press, London.
- Greuter, W., Burdet, H.M., Long, G. (1986). Med-Checklist 3, Trust of OPTIMA, Geneva.
- Guerin, H., Delaveau, P., and Paris, R. (1971). Localisations histochimiques.II : Procedes simples de localization de pigments flavoniques. Application a quelques Phanerogames. *Societe Botanique de France* **118**: pp.29-36.
- Hallahan, D.L. (2000). Monoterpenoid Biosynthesis in Glandular Trichomes of Labiate Plants. *Advances in Botanical Research* **31**: 77-120.
- Harborne, J.,B., Tomaw-Barberan, F.,A., Williams, C.,A., Gil, M., I. (1986) Chemotaxonomic study of flavonoids from european *Teucrium* species. *Phytochemistry* Vol. **25**, no. 12, pp. 2811-2816.
- Hardman, R., and Sofowora, E.A. (1972). Antimony trichloride as a test reagent for steroids, especially diosgenin and yamogenin, in plant tissues. *Stain Technology* **47**: 205-222.
- Hanson, J.R. (1995). Diterpenoids. *Nat.Rrod.Rep.* **13**: 59.
- Harley, R.M., Atkins, S., Budansteve, A.L., Cantino, P.D., Conn, B.J., Grayer, R., Harley, M.M., et al. (2004). Labiatae. In: Kubitzki, K. (Ed.), The Families and Genera of Vascular Plants VII. Springer, Berlin/Heidelberg.
- Hassan, M.,M.,A., Muhtadi,F.,J., Al-Badr, A.,A. (1978). GLC-Mass Spectrometry of *Teucrium polium* Oil. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol.**68**, No 6.

- Hellmir, S., Hedrich, R., Robert-Nicoud, M., Robinson, D.G. (1990) Uptake of Lucifer Yellow CH in leaves of *Commelina communis* is mediated by endocytosis. *Protoplasma* **158**: 142-148.
- Hummelbrunner, L., A., Isman, M., B. (2001). Acute, Sublethal, Antifeedant, and Synergistic Effects of Monoterpenoid Essential Oil Compounds on the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *J. Agric. Food Chem.* **49**: 715-720.
- Jensen, W., (1962). Botanical Histochemistry Principles and Practice. 1st Edition, W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Johansen, D. (1940). Plant Microtechnique. Edition I. Mc Graw-Hill.
- Juriscic Grubescic, R., Vlaimir-Knezevic, S., Kremer, D., Kalodera, Z., & Vukovic, J. (2007). Trichome micromorphology in *Teucrium* (Lamiaceae) species growing in Croatia, *Biologia*, Bratislava **62/2**: 148-156.
- Kamel, A., Sandra, P. (1994). Gas chromatography-mass spectrometry analysis of the volatile oils of two *Teucrium polium* varieties. *Biochemical systematics and ecology*, vol. **22**, no5, pp. 529-532.
- Karabourniotis, G. and Fasseas, C. (1996). The dense indumentum with its polyphenol content may replace the protective role of the epidermis in some young xeromorphic leaves. *Canadian Journal of Botany* **74**: 347-351.
- Kawashty, S.A., Gamal El-Din, E.M., Saleh, N.A.M., 1999. The flavonoid chemosystematics of two *Teucrium* species from Southern Sinai, Egypt. *Biochemical Systematics and Ecology* **27**: 657-660.
- Kandouza, M., Alachkarb, A., Zhange, L., Dekhila, H., Chehnab, F., Yasmeena, A., Moustafa, A. (2010). *Teucrium polium* plant extract inhibits cell invasion and motility of human prostate cancer cells via the restoration of the E-cadherin/catenin complex. *Journal of Ethnopharmacology* **129**: 410-415.
- Khleifat et al. (2002), Vessal, M., Zal, F., Vasei, M. (2003) Effects of *teucrium polium* on oral glucose Tolerance test, regeneration of pancreatic Islets and activity of hepatic glucokinase in Diabetic rats. *Arch Iranian Med.* **6 (1)**: 35-39.
- Koffidis, G., Bosabalidis, A. (2008). Effects of altitude and season on glandular hairs and leaf structural traits of *Nepeta nuda* L. *Botanic Studies* **49**: 363-372.
- Kofidis, G., Bosabalidis, A.M., Moustakas, M. (2007). Combined effects of altitude and season on leaf characteristics of *Clinopodium vulgare* L. (Labiatae). *Environmental and Experimental Botany* **60**: 69-76.
- Kofidis, G., Bosabalidis, A.M., Moustakas, M. (2003). Contemporary Seasonal and Altitudinal Variations of Leaf Structural Features in *Oregano* (*Origanum vulgare* L.) *Annals of Botany* **92**: 635-645.
- Kovacevic, N. N., Lakusic, B. S., & Ristic, M. S. (2001). Composition of the essential oils of seven *Teucrium* species from Serbia and Montenegro. *Journal of Essential Oil Research* **13**: 163-165.
- Kummerow, J. 1973. Comparative anatomy of sclerophylls of Mediterranean climatic areas. In: di Castri F. and Mooney H.A. (Eds.), *Mediterranean type ecosystems. Origin and Structure*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 157-167.
- Lahlou, M. (2004). Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Flavour and Fragrance Journal* **19**: 159-165.
- Lakusic, B., Stevanovic, B., Jancic, R., Lakusic, (2010). Habitat-related adaptations in morphology and anatomy of *Teucrium* (Lamiaceae) species from the Balkan peninsula (Serbia and Montenegro). *Flora* **205**: 633-646.
- Lawrencet, B. M. (2000). Essential oils: From agriculture to chemistry. *The International Journal of Aromatherapy* **10(3/4)**: 82-98.
- Lersten, N., R., Czapinski, A., R., Curtis, J., D., Freckmann, R., & Horner, H., T. (2006). Oil bodies in leaf mesophyll cells of angiosperms: overview and a selected survey. *American Journal of Botany* **93(12)**: 1731-1739.
- Levin, D. A. (1973). The role of trichomes in plant defense. *The Quarterly Review of Biology* **48(1)**: 3-15.

- Lichtenthaler, H. K. (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 47-65.
- Lin, W., Oliver, D., J. (2008). Role of triacylglycerols in leaves. *Plant Science* **175**: 233-237.
- Lison, L. 1960. Histochemie et cytochemie animales. Principes et methodes. Vol. 1, 2. Paris: Gauthier-Villars.
- Ljubuncic, P., Dakwar, S., Portnaya, I., Cogan, U., Azaizeh, H., & Bomzon, A. (2006). Aqueous extracts of *Teucrium polium* possess. Remarkable antioxidant activity in vitro. *Evid Based Complement Alternat Med* **13**(3).
- Mace, M.E., and Howell, C.R. 1974. Histochemistry and identification of condensed tannin precursors in root of cotton seedlings. *Canadian Journal of Botany* **52**: 2423-2426.
- Manetas, Y. (2003). The Importance of Being Hairy: The Adverse Effects of Hair Removal on Stem Photosynthesis of *Verbascum speciosum* Are Due to Solar UV-B Radiation. Author(s): *New Phytologist*. Vol. **158**, No. 3 pp. 503-508.
- Margaris, N.S., (1979). Non-structural Carbohydrate status in a Phrygian (East Mediterranean) Ecosystem. *Int. J. Biometeor.* vol. **4**, pp. 337-342.
- Margaris, N.S., (1981). Adaptive strategies in plants dominating Mediterranean-type Ecosystems, in : *Mediterranean Type Shrublands*, F. Di Castri et al (Eds), Elsevier, The Netherlands.
- Marin, P., D., Petkovic, B., Duletic S., (1994) Nutlet sculpturing of selected *Teucrium* species (Lamiaceae): a character of taxonomic significance. *Pl. Syst. Evol.* **192**: 199-214.
- Marquez, C., Rabanal, R. M., Ververde, S., Eguren, L., Perales, A., & Fayos, J. (1980). Diterpenes from *Teucrium capitatum* L. X-Ray crystal and molecular structure of capitatin. *Tetrahedron Letters*, vol. **21**: pp. 5039- 5042.
- McCaskill, D. and Croteau, R. (1995). Monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*) rely exclusively on plastid-derived isopentenyl diphosphate. *Planta* **197**: 49-56.
- McCaskill, D., Gershenzon, J. and Croteau, R. (1992). Morphology and monoterpene biosynthetic capabilities of secretory cell clusters isolated from glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Planta* **187**: 445-454.
- Medeiros, R., Passos, G. F., Vitor, C. E., Koepp, J., Mazzuco, T. L., Pianowski, L. F., et al. (2007). Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *British Journal of Pharmacology* **151**: 618-627.
- Menichini, F., Conforti, F., Rigano, D., Formisano, C., Piozzi, F., & Senatore, F. (2009). Photochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium* essential oils from Greece. *Food Chemistry* **115**: 79-686.
- Metcalf, C. R. and Chalk, L. (1985). Anatomy of the dicotyledons Vol. 1 (2nd ed.). Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject. Clarendon Press. Oxford.
- Metcalf, C. R. and Chalk, L. (1985). Anatomy of the dicotyledons Vol. 2 (2nd ed.). Wood structure and conclusion of the general introduction. Clarendon Press. Oxford.
- Mitrakos, K. 1980. A theory of Mediterranean plant life. *Oecol Plantarum* **1**: 245-252.
- Moghtader, M. (2009). Chemical composition of the essential oil of *Teucrium polium* L. From Iran. *American-Eurasian J. Agric. & Environ Sci.* **5** (6): 843-846.
- Mooney, H.A., and Parsons D.J. 1973. Structure and function in the California chaparral – an example from San Dimas. In: di Castri F. and Mooney H.A. (Eds.), *Mediterranean type ecosystems. Origin and Structure*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 83-112.
- Mowry, R.W. 1956. Alcian blue techniques for the histochemical study of acidic carbohydrates. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **4**: 407-411.
- Navarro, T. & J. El Oualidi (1997). Synopsis of the genus *Teucrium* L. (Lamiaceae) in Morocco. *Acta Bot. Malacitana* **22**: 187-205.
- Navarro, T., El Oualidi, J. 2000. Trichome morphology in *Teucrium* L. (Labiatae). A taxonomic review. *Anales J.Ard. Bot. Madrid* **57**(2):277-297

- Nematollahi-Mahani, S. N., Rezazadeh-Kermani, M., Mehrabani, M., & Nakhaee, N. (2007). Cytotoxic effects of *Teucrium polium* on some established cell lines. *Pharmaceutical Biology*, vol. **45**, no, 4 pp. 295-298.
- Oliver, D., J., Nikolau B., J., Wurtele, E., S. (2009). Acetyl-CoA-Life at the metabolic nexus. *Plant Science* **176**: 597-601.
- Orshan, G. (1961) The British Ecological Society Symposium: The Water Relations of Plants (edited by Willey, A.J. and Whitehead, F.H.), John Willey and Sons inc New York, pp.206-222.
- Oganesyan, G. B., Galstyan, A. M., Mnatsakanyan, V. A., Shashkov, A. S., & Agababyan, P. V. (1992). Phenylpropanoid glycosides of *Teucrium polium*. *Armenian Academy of Sciences*, No **5**: pp. 630-634.
- Parker, J. (1968) Drought Resistance mechanisms. In : «*Water Stresses in Plants*» ed. by T. T. Kozlowski, Academic Press Inc., New York, pp. 195-234.
- Pasqua, G., Monacelli, B., and Silvestrini, A. (2003). Accumulation of essential oils in reaction to root differentiation in *Angelica archangelica* L. *European Journal of Histochemistry* **47** (1): pp.87-90.
- Popa, D. P., Fan Tkhu An & Salei, L. A. (1977). Diterpenoids of *Teucrium polium*. The structure of teucrin P₁. *Academy of Sciences of the Moldavian SSR*. No **1**, pp. 40-54.
- Proestos, C., Sereli, D., & Komaitis, M. (2006). Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry* **95**: 44-52.
- Proestos, C. & Komaitis, M. (2008). Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. Swiss Society of Science and Technology. *LWT*. **41**: 652-659.
- Rajabalian, S. (2008). Methanolic extract of *Teucrium polium* L. potentiates the cytotoxic and apoptotic effects of anticancer drugs of vincristine, vinblastine and doxorubicin against a panel of cancerous cell lines. *Experimental Oncology* **30**: 133–138.
- Rasekh, H. R., Khoshnood-Mansourkhani, & Kamalinejad, M. (2001). Hypolipidemic effects of *Teucrium polium* in rats. *Fitoterapia* **72**: 937-939.
- Rasekh, H., R., Yazdanpanah, H., Hosseinzadeh, L., Bazmohammadi, N., Kamalinejad, M. (2005). Acute and Subchronic Toxicity of *Teucrium polium* Total Extract in Rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **4**: 245-249.
- Reeve, R.M. (1951). Histochemical tests for polyphenols in plant tissues. *Stain Technology* **26**: 91-96.
- Rhizopoulou, S., Psaras, G.K. (2003). Development and structure of drought-tolerant leaves of the Mediterranean shrub *Capparis spinosa* L. *Annals of Botany* **92**: 377-383.
- Rice-Evans, C., A., Miller, N. J., & Paganga G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, vol **2**, No 4.
- Rizk, A. M., Hammouda, F. M., Rimpler, H., & Kamel A. (1986). Iridoids and Flavonoids of *Teucrium polium* Herb1. *Planta Med.* **52**(2): 87-8.
- Rost, F.W.D. (1992). Fluorescence microscopy. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sabatini, D., Bensch, K., and Barnett, B. (1963). Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *Journal of Cell Biology* **17**: 208-212.
- Sangwan, N. S., Farooqi, A. H. A., Shabih, F. and Sangwan, R. S. (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* **34**: 3-21.
- Savvidou, S., Goulis, J., Giavazis, I., Patsiaoura, K., Hytioglou, P., & Arvanitakis, C. (2006). Herb-induced hepatitis by *Teucrium polium* L.: report of two cases and review of the literature. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* **19**: 507-511.
- Shakhanbeh, J., Atrouse, O. (2001) *Teucrium polium* Inhibits Nerve Conduction and Carrageenan Induced Inflammation in the Rat Skin. *Turk J Med Sci.* **31**: 15-21.
- Sharififar, F., Dehghn-Nudeh, G., & Mirtajalini, M. (2009). Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry* **112**: 885-888.
- Shakhanbeh, J., Atrouse, O. (2001). *Teucrium polium* inhibits nerve conduction and carrageenan induced inflammation in the rat skin. *Turk J Med Sci.* **31**: 15-21.

- Solereder, H. (1908). Systematic anatomy of the dicotyledons. Clarendon press, Oxford.
- Stewart, W., W., (1981). Lucifer dyes fluorescent dyes for biological tracing. *Nature*. **292**:17-21.
- Suleiman, M.-S., Abdul-Chani, A.-S., Al-Khalil, S., & Amin, R. (1988). Effect of *Teucrium polium* boiled leaf extract on intestinal motility and blood pressure. *Journal of Ethnopharmacology* **22**: 111-116.
- Terashima I, Araya T, Miyazawa S-I, Sone K, Yano S. (2005). Construction and maintenance of the optimal photosynthetic systems of the leaf, herbaceous plant and tree: an eco-developmental treatise. *Annals of Botany* **95**: 507-519.
- Terashima, I., Hanba, Y.T., Tazoe, Y., Vyas, P., Yano, S. (2006). Irradiance and phenotype: comparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO₂ diffusion. *Journal of Experimental Botany*, Vol. **57**, no.2, pp. 343-354.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2002). Plant Physiology (3rd ed.). Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- Tardio, J., Pardo-De-Santayana, M. & Morales, R., (2006). Ethnobotanical review of wild edible plants in Spain. *Botanical Journal of the Linnean Society* **152**: 27-71.
- Tariq, M., Ageel, A.M., Al-Yahya, M.A., Mossa, J.S, Al-Said, M.S. (1989) Anti-inflammatory activity of *Teucrium polium*. *Int J Tiss React.* **11**:185-8.
- Turner, G. W., Gershenzon, J. and Croteau, R. B. (2000a). Distribution of Peltate Glandular Trichomes on Developing Leaves of Peppermint. *Plant Physiology* **124**: 655-663.
- Turner, G. W., Gershenzon, J. and Croteau, R. B. (2000b). Development of Peltate Glandular Trichomes of Peppermint. *Plant Physiology* **124**: 665-679.
- Verykokidou-Vitsaropoulou, E., and Vajias, C. (1986). Methylated flavones from *Teucrium polium*. *Planta Medica* **5**: 401-402.
- Vessal, M., Hemmati, M., Vasei, M. (2003) Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **135**: 357-364
- Vokou, D., & Bessiere, J. M. (1984). Volatile constituents of *Teucrium polium*. *Journal of Natural Products*, vol. **48**, No.3.
- Vokou, D., Margaritis, N., S. (1982). Volatile oils as allelopathic agents, in Aromatic Plants: Basic and Applied Aspects, (eds N.S. Margaritis. A. Koedam and D. Vokou) Martinus Nijhoff, The Hague, pp. 59-72.
- Vokou, D. (1992) The allelopathic potential of aromatic shrubs in phryganean East Mediterranean ecosystems: In Rizvi, S.J.H. and Rizvi, V. (Eds) *Allelopathy: Basic and applied aspects*. London, Chapman & Hall, pp. 303-320.
- Wagner, G. J. (1991). Secreting Glandular Trichomes: More than Just Hairs. *Plant Physiology* **96**: 675-679.
- Wang, G., Tang, W., & Bidigare, R., R. (2005) Terpenoids As Therapeutic Drugs and Pharmaceutical Agents. Humana Press Inc, 197-227.
- Weaver, L. M. and Herrmann, K. M. (1997). Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends in Plant Science* **2**(9): 346-351.
- Werker, E., Ravid, U. and Putievsky, E. (1985). Structure of glandular hairs and identification of the main components of their secreted material in some species of the Labiatae. *Israel Journal of Botany* **34**: 31-45.
- Werker, E. (1993). Function of Essential Oil - Secreting Glandular Hairs in Aromatic Plants of the Lamiaceae-A Review. *Flavour and Fragrance Journal* **8**: 249-255.
- Werker, E. (2000). Trichome Diversity and Development. *Advances in Botanical Research* **31**: 1-35.
- Wittstock, U., Gershenzon J. (2002) constitutive plant toxins and their role in defence against herbivores and pathogens. *Current opinion in biology* **5**:1369-5266/02
- Zal, F., Vasei, M., Rasti, M., & Vessal, M. (2001). Hepatotoxicity associated with hypoglycemic effects of *Teucrium polium* in diabetic rats. *Art Irr Med*. **4** (4): 188-192.

Ελληνική Βιβλιογραφία:

- Αϊβαλάκης, Γ., Καραμπουρνιώτης, Γ., Φασσέας, Κ. (2005). Γενική Βοτανική. Εκδόσεις Έμβρυο.
- Βάθης, Ε. (2002). Τα φυτά του πάρκου της αρχαίας αγοράς. Εκδόσεις Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, 2002.
- Βαρδαβάκης, Μ. (1993). Συστηματική Βοτανική - Τόμος Ι Έκδοση 4η . Εκδόσεις Σαλονικίδης. Θεσσαλονίκη.
- Διοσκουρίδης. (77 μ.Χ.) Περί ύλης ιατρικής. Εκδόσεις Μίλητος, (2001) Αθήνα
- Ζερλέντης, Κ. (1981). Συστηματική Βοτανική. Εκδόσεις Ανωτάτης Γεωπονικής Αθηνών.
- Καραμπουρνιώτης, Γ. Α. (2003). Φυσιολογία Καταπονήσεων των Φυτών. Οι λειτουργίες των φυτών κάτω από αντίξοες συνθήκες. Εκδόσεις Έμβρυο.
- Καραμπουρνιώτης, Γ., Α., Λιακόπουλος, Γ. (2009). Οικοφυσιολογία Μεσογειακών Φυτικών Ειδών.
- Κυπαρίσσης, Α. (1995) *Phlomis fruticosa* L. : Το πρότυπο του εποχιακού διμορφισμού των φύλλων και το προσαρμοστικό δυναμικό τους στις ιδιαίτερες συνθήκες του μεσογειακού κλίματος. Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Πατρών
- Μπαμπαλώνας, Δ. και Κοκκίνη, Σ. (2004). Συστηματική Βοτανική. Φυλογενετική – Φαινετική Προσέγγιση της Ταξινόμησης των Φυτικών Οργανισμών. Εκδόσεις Αϊβάζη, Θεσσαλονίκη.
- Μπαμπινιώτης, Γ. (2005). Λεξικό της Νέας Ελληνικής Γλώσσας. Εκδόσεις Κέντρο Λεξικολογίας ΕΠΕ.
- Μποζαμπαλίδης, Α. (2008). Οι αδένες των φυτών. Θεσσαλονίκη.
- Σαρλής, Γ., Π. (1999). Συστηματική Βοτανική_Εφαρμογές Κορμοφύτων. Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα.
- Ταραντίλης, Π. Α. και Πολυσίου, Μ. (2005). Τεχνικές Ανάλυσης Βιομορίων. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Γενικό Τμήμα, Εργαστήριο Χημείας.
- Τσέκος, Ι. (2003). Φυσιολογία Φυτών, τόμοι 1,2. Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη α.ε.
- Σίμσον Α. (1999). Βότανα, δέντρα και παραδόσεις της Κεφαλονιάς. Εκδόσεις Εταιρία Φίλων Αρχαίας Σοφίας (ΕΠΤΑ)
- Φασσέας, Κ. (1999). Λεπτή Δομή Κυττάρου. Μικροσκοπία Εφαρμοσμένη στη Γεωπονία. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας. Αθήνα.
- Baumann, H. (1999). Η ελληνική χλωρίδα στον μύθο, στην τέχνη και στη λογοτεχνία. Εκδόσεις της Ελληνικής Εταιρίας Προστασίας της Φύσεως.
- Samuelsson, G. (2004). Φαρμακευτικά προϊόντα φυσικής προελεύσεως. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

Πληροφορίες από τον ιστό

USDA, ARS, National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources Information Network* - (GRIN) [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. URL: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?405294> (23 March 2011)

URL: http://zipcodezoo.com/Plants/T/Teucrium_polium_capitatum/ (23/03/2011)