

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

Φωτοσύνθεση κινδύνου: Αξιοποίηση των αποθεμάτων άνθρακα  
των λιθοκόμετων για φωτοσυνθετική αφομοίωση σε συνθήκες  
καταπόνησης

ΧΡΥΣΑΥΓΗ ΡΕΠΠΑ

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

ΑΘΗΝΑ 2012



Το θέμα και η Τριμελής Συμβουλευτική-Εξεταστική Επιτροπή της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης εγκρίθηκε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύνθεσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (ΓΣΕΣ 16/19-5-2010).

#### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Γ. Καραμπουρνιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής (επιβλέπων)

Π. Κατινάκης, Καθηγητής (μέλος)

Γ. Λιακόπουλος, Λέκτορας (μέλος)



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	9
I.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
1. Φωτοσύνθεση.....	13
1.1. Τα ανατομικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των φύλλων.....	14
1.1.1. Οι χλωροπλάστες.....	15
1.2. Φωτεινές αντιδράσεις.....	16
1.3. Σκοτεινές αντιδράσεις.....	18
1.4. Η απορρόφηση φωτονίων με κατάλληλο μήκος κύματος και η διέγερση της χλωροφύλλης.....	23
1.5. Φθορισμός Χλωροφύλλης.....	25
1.6. Παράγοντες του περιβάλλοντος που επηρεάζουν την φωτοσύνθεση.....	26
1.6.1. Φωτεινή ακτινοβολία.....	26
1.6.2. Θερμοκρασία.....	27
1.6.3. Ανεπάρκεια νερού.....	27
1.6.4. Διοξείδιο του άνθρακα.....	27
2. Κυτταρικά έγκλειστα.....	28
2.1. Η ανατομία των λιθοκύστεων.....	32
2.2. Πιθανή φυσιολογική σημασία των κυτταρικών εγκλειστών.....	34
2.3. Χαρακτηριστικά των λιθοκύστεων των φύλλων του φυτού <i>Parietaria             judaica</i> .....	37
3. Τα σταθερά ισότοπα άνθρακα και η συμβολή τους στη μελέτη της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας των φυτών.....	38
II. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	43
III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	45
3.1. Το φυτικό υλικό.....	45
3.2. Η μέτρηση διαστάσεων των κυστόλιθων.....	45
3.3. Απομόνωση κρυστάλλων.....	46
3.4. Ανάλυση φθορισμού χλωροφύλλης.....	46
3.5. Πείραμα υδατικής καταπόνησης.....	49
3.6. Επίδραση του ABA σε δίσκους φύλλων <i>Parietaria judaica</i> .....	50
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	51
4.1. Μετρήσεις των διαστάσεων των κρυστάλλων.....	51
4.2. Μετρήσεις με Isotope Ratio Mass Spectrometer (IRMS).....	52
4.3. Ανάλυση φθορισμού χλωροφύλλης.....	53
V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	57
VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	63



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε να δοθεί απάντηση στην υπόθεση εργασίας σύμφωνα με την οποία οι κυστόλιθοι αποτελούν δυναμικά συστήματα που εξυπηρετούν κατά προτεραιότητα τη διαχείριση των αποθεμάτων ανόργανου άνθρακα, και όχι ασβεστίου. Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκαν δεδομένα τα οποία σχετίζονται με τη δομή, τη θέση και τη συμπεριφορά των κυστόλιθων / λιθοκύστεων ως δυναμικού συστήματος διαχείρισης.

Η έρευνα διεξήχθη εξ ολοκλήρου στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Φυτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Γ. Καραμπουρνιώτη, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όχι μόνο για την βοήθεια, την παρότρυνση και πολύτιμη καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της έρευνας, την παροχή επιστημονικής βιβλιογραφίας και την επιμέλεια και διόρθωση του κειμένου, αλλά και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, αναθέτοντάς μου τη μελέτη αυτή.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον δρ. Δ. Νικολόπουλο, μέλος Ε.Ε.Δ.Ι.Π., ο οποίος με τις πολύτιμες γνώσεις και τη βοήθειά του συνέβαλλε καθοριστικά στην εκπόνηση της μελέτης αυτής, όπως και τον λέκτορα κ. Γ. Λιακόπουλο, για τη βοήθειά του κυρίως σε τεχνικά θέματα.

Ευχαριστώ θερμά τον Α. Γιαννόπουλο, υποψήφιο διδάκτορα, για τη βοήθειά του και τις ιδιαίτερα χρήσιμες υποδείξεις του, οι οποίες συνέβαλαν στην ολοκλήρωση του συγγράμματος αυτού.





## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε να δοθεί απάντηση στην υπόθεση εργασίας σύμφωνα με την οποία οι κυστόλιθοι, και πιθανόν και άλλες συναφείς δομές όπως οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου, αποτελούν δυναμικά συστήματα που εξυπηρετούν κατά προτεραιότητα τη διαχείριση των αποθεμάτων ανόργανου άνθρακα, και όχι του ασβεστίου. Οι λιθοκύστες, λόγω θέσης, θα μπορούσαν κάλλιστα να επιτελέσουν το ρόλο των εναλλακτικών πηγών ανόργανου άνθρακα για τη φωτοσυνθετική λειτουργία, δεδομένου ότι εντοπίζονται μεταξύ των φωτοσυνθετικών κυττάρων του πασσαλώδους ή και σπογγώδους παρεγχύματος, ανάλογα με το φυτικό είδος. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, τα αποθέματα ανόργανου άνθρακα των κυστόλιθων μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για τη φωτοσυνθετική αφομοίωση άνθρακα. Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκαν δεδομένα τα οποία σχετίζονται με τη συμπεριφορά των κυστόλιθων / λιθοκύστεων ως δυναμικού συστήματος διαχείρισης.

Μελετήθηκε η συμπεριφορά των λιθοκύστεων σε συνθήκες κάτω από τις οποίες τα στομάτια παραμένουν κλειστά. Παρουσία ABA, μιας φυτορμόνης η οποία προκαλεί το κλείσιμο των στοματιών, το μέγεθος των κυστόλιθων μειώνεται ταχέως μέσα σε λίγες μόνο ώρες. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι οι κυστόλιθοι δεν αποτελούν μια στατική δεξαμενή αποθήκευσης ιόντων ασβεστίου, αλλά ένα δυναμικό σύστημα, το οποίο έχει τη δυνατότητα να αποδώσει εκ νέου τον αποθηκευμένο άνθρακα στο κυτταρικό περιβάλλον, όταν αυτό το επιβάλλουν οι συνθήκες. Έδειξαν επίσης ότι η λειτουργία των λιθοκύστεων συνδέεται κυρίως με την αντιμετώπιση αντίξοων συνθηκών.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης του φθορισμού της χλωροφύλλης έδειξαν ότι η φωτοχημική ικανότητα του PS II (Yield), η οποία αποτελεί ένα μέτρο της ικανότητας του PS II να απορροφά την ενέργεια της ακτινοβολίας και να προωθεί με αυτή τη φωτοχημική ροή ηλεκτρονίων, αλλά και ο συντελεστής φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού (qP), ο οποίος αντιστοιχεί στο ποσοστό των ανοικτών φωτοχημικών κέντρων PS II, μειώνεται στα φύλλα-μάρτυρες (Control) όταν

διακόπτεται η διοχέτευση  $\text{CO}_2$ , ενώ η μη-φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού, (παράμετροι NPQ και qN) αυξάνεται. Αντίθετα, στα φύλλα στα οποία έχει προηγηθεί χειρισμός με ABA οι συντελεστές αυτοί παραμένουν σχετικά αμετάβλητοι. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι τα φύλλα στα οποία είχε προηγηθεί χειρισμός με ABA και τα στομάτιά τους ήταν κλειστά, μπόρεσαν να αντιμετωπίσουν καλύτερα την έλλειψη του ατμοσφαιρικού  $\text{CO}_2$  σε σχέση με τα φύλλα-μάρτυρες. Το γεγονός αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι τα φυτά σε συνθήκες καταπόνησης, οι οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα το κλείσιμο των στοματιών τους, μπορούν να διατηρούν μια στοιχειώδη φωτοσυνθετική δραστηριότητα αξιοποιώντας τον C που προέρχεται από την αποδόμηση των κρυστάλλων.

In the present study it has been attempted to enhance the hypothesis that cystoliths, as well as similar structures, such as calcium oxalate crystals, consist dynamic systems, the primal role of which is to facilitate the effective use of the carbon rather than the calcium deposits of the plant. Due to their location, lithocysts could serve as alternative sources of inorganic carbon used in photosynthesis, since they are located among photosynthetic cells of the palisade or spongy parenchyma, depending on the species. According to the hypothesis, the inorganic carbon deposits of the cystoliths can serve as a substrate for photosynthetic carbon fixation.

We studied the behavior of lithocysts under specific conditions, in which stomata remained closed. In the presence of abscisic acid (ABA), a plant hormone which induces stomatal closure, the size of cystoliths decreased rapidly, within only a few hours. The results of the study indicated that cystoliths are not merely a static depository of surplus calcium ions, but they comprise a dynamic system which can under specific conditions deliver their inorganic carbon deposits to the cellular environment. They have also shown that the function of lithocysts is inexplicably interwoven with plant response to adverse environmental conditions.

Chlorophyll fluorescence analysis showed that the PS II operating efficiency parameter (Yield), which estimates the efficiency at which light absorbed by the PS II is used for  $Q_A$  reduction, as well as the PS II efficiency factor ( $qP$ ), which estimates the percentage of open PS II photochemical centers, was decreased when  $CO_2$  provision in the environment of leaves with open stomata (Control) is being blocked, while nonphotochemical quenching (NPQ και  $qN$ ) was increased. All the above mentioned parameters remained constant in the case of leaves that have been treated with ABA prior to fluorescence analysis. These results indicate that leaves which have been treated with ABA and thus kept their stomata closed, could be acclimated to the absence of  $CO_2$  better than untreated control leaves. These facts enhance the hypothesis that closure of the stomata enables leaves to maintain their photosynthetic activity, although at lower rates, by using the cystolithic carbon reserves.

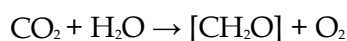


## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. Φωτοσύνθεση.

Η διατήρηση της ζωής στη Γη προϋποθέτει την αέναη ανακύκλωση ανόργανων συστατικών μέσω των βιογεωχημικών κύκλων και την αδιάκοπη ροή ενέργειας μέσω των τροφικών αλυσίδων. Ο ρόλος των αυτότροφων οργανισμών στην διατήρηση της ζωής είναι βασικός, καθώς αποτελούν τις πύλες εισόδου της απαραίτητης για όλα τα τροφικά επίπεδα ενέργειας ενός οικοσυστήματος. Η ενέργεια αυτή παρέχεται από τον ήλιο και αφομοιώνεται με την διαδικασία της φωτοσύνθεσης.

Φωτοσύνθεση είναι η βιοχημική διεργασία μέσω της οποίας οι φωτοαυτότροφοι οργανισμοί συνθέτουν οργανικές ενώσεις από πρόδρομα ανόργανα συστατικά (Γαλάτης, κ.ά., 2003, Αϊβαλάκης, κ.ά., 2005). Για τη σύνθεση των οργανικών ουσιών (μακρομορίων) απαιτείται εισροή ενέργειας, η οποία δίδεται με τη μορφή φωτεινής ακτινοβολίας, δηλαδή φωτονίων τα οποία απορροφώνται από τη χλωροφύλλη. Η αποθηκευμένη στα μακρομόρια αυτά ενέργεια αξιοποιείται από τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς για την κάλυψη των ενεργειακών τους αναγκών, αποτελεί δε πηγή ενέργειας και όλες τις υπόλοιπες μορφές ζωής (Taiz and Zeiger, 1998). Η διαδικασία της φωτοσύνθεσης μπορεί να περιγραφεί από μια απλουστευμένη αντίδραση:



Το  $[\text{CH}_2\text{O}]$  στην παραπάνω εξίσωση αντιπροσωπεύει μια «υδατανθρακική μονάδα». Ένα μόριο εξόζης προκύπτει με συνένωση έξι υδατανθρακικών μονάδων. Για κάθε μόριο εξόζης που παράγεται απαιτούνται 2840 KJ ενέργειας. Πρόκειται δηλαδή για μια ισχυρά ενδεργονική αντίδραση. Το μοριακό οξυγόνο που ελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα ως παραπροϊόν της αντίδρασης αυτής είναι απαραίτητο για την αναπνοή των αερόβιων οργανισμών, οι δε παραγόμενοι υδατάνθρακες αποτελούν βασική πηγή ενέργειας σε πλανητικό επίπεδο, είτε αυτοί παράγονται στο παρόν (βιομάζα) είτε σχηματίστηκαν στο παρελθόν (ορυκτά καύσιμα) (Taiz and Zeiger, 1998).

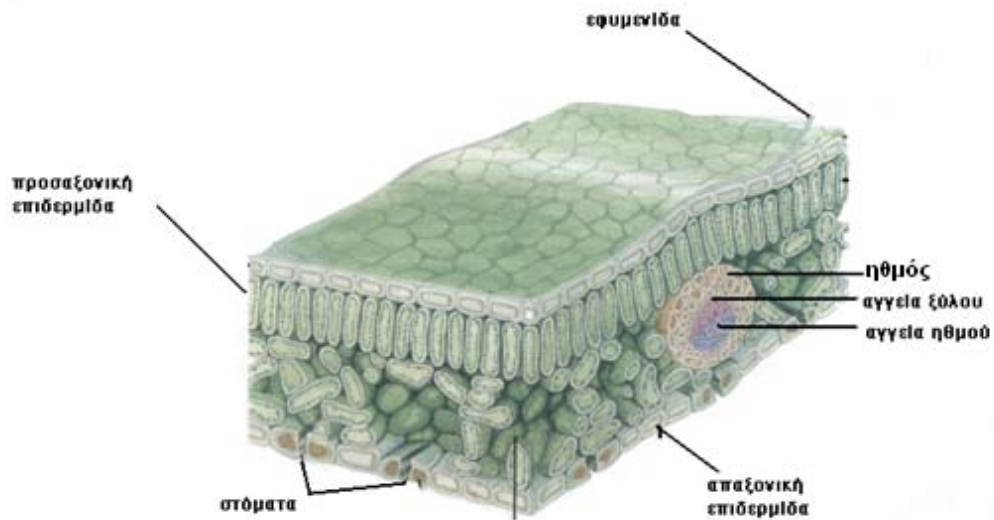
Η φωτοσύνθεση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία και περιλαμβάνει πολυάριθμες επιμέρους αντιδράσεις και μηχανισμούς, μπορεί δε να διακριθεί σε δύο επιμέρους φάσεις. Η πρώτη φάση περιλαμβάνει τις *φωτεινές αντιδράσεις* και είναι απαραίτητη η παρουσία φωτός. Η φωτεινή ενέργεια μετατρέπεται σε χημική με τη μορφή σταθερών χημικών ενώσεων υψηλού ενεργειακού περιεχομένου, του NADPH και του ATP. Στη φάση αυτή μόρια νερού φωτολύονται παράγοντας ηλεκτρόνια και πρωτόνια καθώς και μοριακό οξυγόνο ως παραπροϊόν. Στη δεύτερη φάση, τη βιοσυνθετική, η ενέργεια που έχει μετατραπεί σε NADPH και ATP χρησιμοποιείται για την αφομοίωση του CO<sub>2</sub> και την βιοσύνθεση οργανικών ενώσεων. Η φάση αυτή αναφέρεται και ως σκοτεινή φάση ή *σκοτεινές αντιδράσεις* αφού δεν είναι απαραίτητη η παρουσία φωτός (Lawlor, D.W. 2001).

### 1.1. Τα ανατομικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των φύλλων.

Τα φύλλα αποτελούν τα εξειδικευμένα όργανα στα οποία επιτελείται η φωτοσύνθεση (Αϊβαλάκης, κ.ά., 2005). Η δομή τους αλλά και η διάταξή τους στο χώρο στοχεύει στην όσο το δυνατό αποτελεσματικότερη απορρόφηση της φωτεινής ακτινοβολίας και στην ευχερέστερη διάχυση του CO<sub>2</sub>. Στο χώρο η κατανομή των φύλλων είναι τέτοια, ώστε μεγιστοποιείται η εκτεθειμένη στις ηλιακές ακτίνες επιφάνεια, η δε κατασκευή τους στοχεύει αφενός μεν στην αποτελεσματικότερη απορρόφηση της ηλιακής ακτινοβολίας, αφετέρου δε στην ευχερέστερη διάχυση του CO<sub>2</sub> προς τα φωτοσυνθετικά κύτταρα.

Τα φύλλα καλύπτονται εξωτερικά από την εφυμενίδα και την επιδερμίδα. Η περιοχή μεταξύ της προσαξονικής και απαξονικής επιδερμίδας (περιοχή μεσόφυλλου) περιέχει φωτοσυνθετικά κύτταρα και ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Η εφυμενίδα και η επιδερμίδα απαρτίζουν ένα περίβλημα αδιαπέραστο στους υδρατμούς και το CO<sub>2</sub>. Η ανταλλαγή αερίων μεταξύ φύλλων και ατμόσφαιρας πραγματοποιείται μέσω πόρων, οι οποίοι σχηματίζονται μεταξύ εξειδικευμένων κυττάρων της επιδερμίδας, των καταφρακτικών κυττάρων. Ο πόρος μαζί με τα καταφρακτικά κύτταρα συνιστούν ένα στομάτιο. Η φυσιολογική σημασία των στοματίων είναι μεγάλη, καθώς με το άνοιγμα και το κλείσιμο των στοματίων ελέγχεται η ανταλλαγή αερίων (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> και υδρατμών) και έτσι παρέχονται στο φυτό

τα αναγκαία υποστρώματα για τις λειτουργίες της φωτοσύνθεσης και της αναπνοής (Δροσόπουλος, 1998).

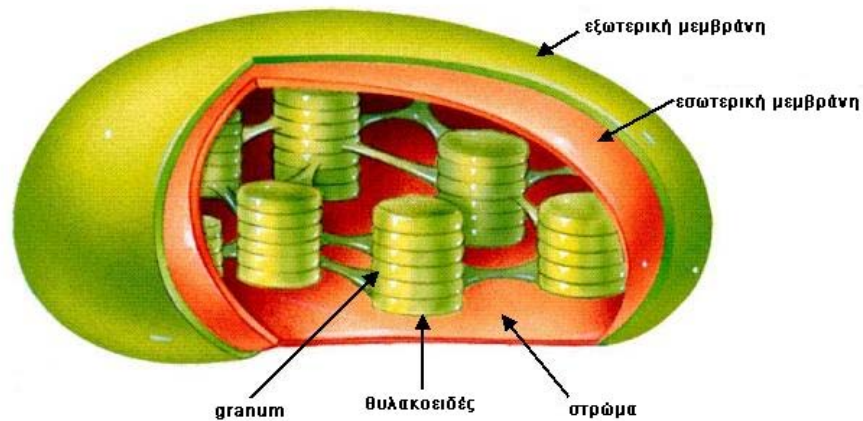


**Εικόνα 1.** Τρισδιάστατη απεικόνιση ενός τυπικού ετερόπλευρου φύλλου. Η προσαξονική δεν είναι αυτή που δείχνει

### 1.1.1.Οι χλωροπλάστες.

Τα κύτταρα του φωτοσυνθετικού παρεγχύματος είναι πλούσια σε χλωροπλάστες. Πρόκειται για εξειδικευμένα υποκυτταρικά οργανίδια δισκοειδούς συνήθως μορφής. Κάθε τυπικό φωτοσυνθετικό κύτταρο του μεσόφυλλου περιέχει 20-60 χλωροπλάστες. Ο χλωροπλάστης περιβάλλεται από μια διπλή μεμβράνη, τον φάκελο, ο οποίος αποτελείται από δύο διλιπιδιακές μεμβράνες από φωσφολιπίδια, οι οποίες περιέχουν καροτενοειδή, αλλά όχι χλωροφύλλη (Lawlor, 2001, Δροσόπουλος, 1998). Ο φάκελος περικλείει στο εσωτερικό του ένα άμορφο ζελατινώδες υλικό το οποίο ονομάζεται στρώμα και περιέχει υδατοδιαλυτά ένζυμα που καταλύουν τις σκοτεινές αντιδράσεις. Μέσα στο στρώμα αναπτύσσεται ένα δίκτυο μεμβρανών, τα θυλακοειδή, τα οποία σε ορισμένες περιοχές οργανώνονται σε στιβάδες οι οποίες καλούνται grana (Ridge, I. 2002). Στα θυλακοειδή πραγματοποιούνται οι φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης καθώς σε αυτά εντοπίζονται όλα τα μόρια της χλωροφύλλης και των άλλων φωτοσυνθετικών χρωστικών. Τα λιπόφιλα μόρια των χρωστικών σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες, βυθισμένα στη διπλοστοιβάδα των λιπιδίων των θυλακοειδών. Τα σύμπλοκα αυτά οργανώνονται σε δύο φωτοσυστήματα (PS I, PS II). Τέλος, στις μεμβράνες των θυλακοειδών εντοπίζεται και

το σύμπλοκο του κυτοχρώματος  $b_6/f$ , ο σημαντικότερος ενδιάμεσος φορέας για τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το PS II στο PS I.



**Εικόνα 2.** Τρισδιάστατη απεικόνιση χλωροπλάστη.

## 1.2. Φωτεινές αντιδράσεις.

Οι φωτεινές αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα στα θυλακοειδή, όπου εντοπίζονται οι φωτοσυνθετικές χρωστικές. Για την πραγματοποίηση των φωτεινών αντιδράσεων λειτουργούν και συνεργάζονται μεταξύ τους δύο φωτοσυστήματα το Φωτοσύστημα I (PS I) και το Φωτοσύστημα II (PS II). Πρόκειται για μεγαλομοριακά σύμπλοκα πρωτεϊνών-χρωστικών τα οποία εντοπίζονται στις μεμβράνες των θυλακοειδών. Κάθε φωτοσύστημα διαθέτει ένα φωτοχημικό κέντρο στο οποίο συμβαίνει ο διαχωρισμός φορτίου και περιλαμβάνει χλωροφύλλη  $a$  (Chl $a$ ) ειδικής μορφής. Το PS I διεγείρεται από φως μήκους κύματος άνω των 700nm ενώ το PS II διεγείρεται από φως μήκους κύματος 680nm. Τα κέντρα αντίδρασης των Φωτοσυστημάτων I και II ονομάζονται P700 και P680 αντίστοιχα, από τα μέγιστα απορρόφησης τα οποία παρουσιάζουν. Οι διαφορές στις ιδιότητες της Chl $a$  οφείλονται στις διαφορετικές

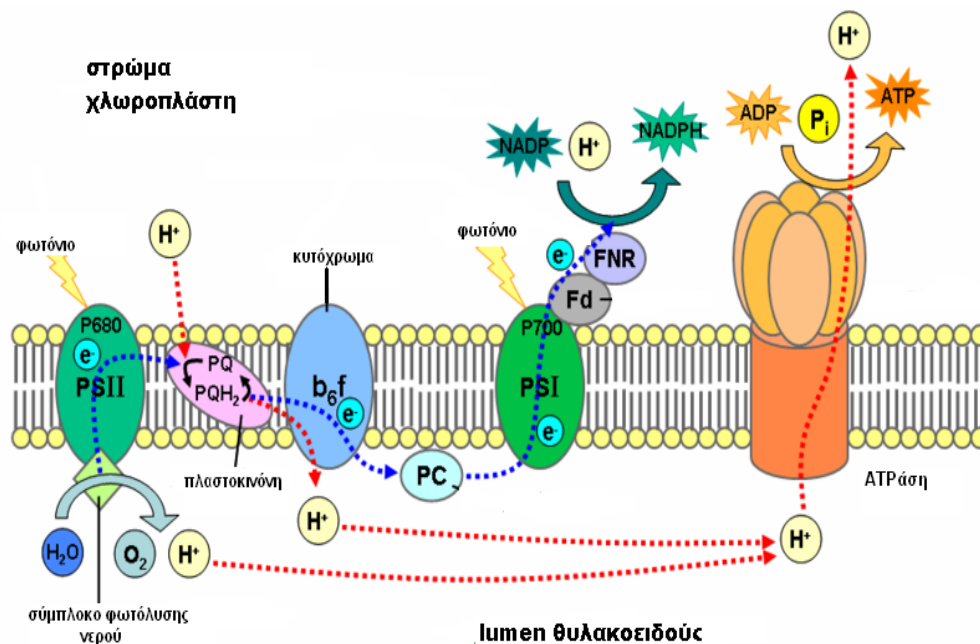


μορφές των πρωτεϊνών από τις οποίες αποτελούνται τα σύμπλοκα. Κάθε κέντρο αντίδρασης διαθέτει αντίστοιχο φωτοσυνθετικό μηχανισμό ή αντένα φωτοσύνθεσης, ο οποίος απαρτίζεται από σύμπλοκα πρωτεϊνών-χρωστικών (LHC) όπως Chla, Chlb και καροτενοειδή (Αϊβαλάκης, κ.ά., 2005). Οι χρωστικές στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό είναι κατάλληλα διευθετημένες, ώστε η απορρόφηση ενός φωτονίου από ένα μόριο χρωστικής να μεταφέρει τη διέγερση αναγκαστικά προς το κέντρο αντίδρασης (Lawlor, D.W. 2001).

Όταν ένα φωτόνιο απορροφάται από το φωτοσυνθετικό μηχανισμό του PS II, ένα μόριο Chla του ενεργού κέντρου διεγείρεται με αποτέλεσμα ένα ηλεκτρόνιο να μεταφέρεται σε έναν αποδέκτη ηλεκτρονίων. Το PS II στην οξειδωμένη του μορφή είναι ισχυρά αναγωγικό και προκαλεί οξείδωση του νερού παράγοντας πρωτόνια ( $H^+$ ), ηλεκτρόνια ( $e^-$ ) και οξυγόνο (Αϊβαλάκης, κ.ά., 2005). Η διάσπαση των μορίων του νερού ονομάζεται φωτόλυση του νερού και καταλύεται από το σύμπλοκο φωτόλυσης του νερού, ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο ισχυρά συνδεδεμένο με το PS II. Τα  $e^-$  που προκύπτουν από τη φωτόλυση του νερού επαναφέρουν το PS II στην αρχική του κατάσταση, ενώ  $e^-$  που προέρχονται από την οξείδωση του PS II μεταφέρονται στο PS I, διαμέσου μιας αλυσίδας μεταφοράς  $e^-$  με σημαντικότερο φορέα το σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων bf (Stryer, L. 1994). Ταυτόχρονα η απορρόφηση ενός φωτονίου από τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό του PS I προκαλεί διέγερση σε ένα μόριο Chla του ενεργού του κέντρου. Μέρος από τα  $e^-$  από το οξειδωμένο PS I μεταφέρονται μέσω ενός δέκτη  $e^-$  στην φερεδοξίνη, η οποία ανάγεται. Στην συνέχεια η ανηγμένη φερεδοξίνη οξειδώνεται με τη βοήθεια της ρεδοκτάσης του  $NADP^+$  και ανάγει το  $NADP^+$  σε  $NADPH + H^+$ . Τα υπόλοιπα  $e^-$  μεταφέρονται μέσω φορέων και πάλι στο PS I το οποίο προσλαμβάνοντας και τα  $e^-$  που προέρχονται από το PS II επανέρχεται στην αρχική κατάσταση. Η ροή ηλεκτρονίων μεταξύ των δύο φωτοσυστημάτων έχει ως τελικό αποτέλεσμα τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το νερό στο  $NADP^+$  παράγοντας ταυτόχρονα μια διαβάθμιση ηλεκτροχημικού δυναμικού και pH μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης των θυλακοειδών. Η διαβάθμιση αυτή αποτελεί την κινητήρια δύναμη για τη σύνθεση ATP (Stryer, L. 1994, Δροσόπουλος, I. 1998). Η σύνθεση του ATP πραγματοποιείται μέσω του διαμεμβρανικού συμπλόκου της συνθετάσης του ATP, που εντοπίζεται στην μεμβράνη των θυλακοειδών. Η αντίστροφη αυτή αυθόρμητη ροή  $H^+$  από το lumen προς το στρώμα διαμέσου του συμπλόκου τείνει να εξισορροπήσει τη διαφορά pH,

ενώ παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για την φωσφορυλίωση του ADP σε ATP. Κατά συνέπεια η ροή  $e^-$  από τα φωτοσυστήματα δημιουργεί τις προϋποθέσεις και για την σύνθεση ATP. Η μετατροπή αυτή της φωτεινής ενέργειας σε χημική ονομάζεται φωτοφωσφορυλίωση. Η γραμμική ροή  $e^-$  από το PS II προς το PS I ονομάζεται μη κυκλική μεταφορά  $e^-$  ή μη κυκλική φωτοφωσφορυλίωση και έχει ως τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή  $NADPH + H^+$  και ATP ενώ η κυκλική μεταφορά των  $e^-$  από το PS I στο οξειδωμένο PS I ονομάζεται κυκλική φωτοφωσφορυλίωση και έχει ως αποτέλεσμα μόνο την παραγωγή ATP. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι προκειμένου να παραχθεί ένα μόριο  $NADPH + H^+$  απαιτείται η απορρόφηση 4 φωτονίων (δύο από κάθε φωτοσύστημα) (Γανωτάκης, κ.ά., 2003).

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



Εικόνα 3. Φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης.

### 1.3.Σκοτεινές αντιδράσεις.

Ένα μεγάλο μέρος της ενέργειας που παράγεται κατά τη διάρκεια των φωτεινών αντιδράσεων καταναλώνεται για τη δέσμευση του  $CO_2$  από την ατμόσφαιρα και την αναγωγή του μέχρι το επίπεδο των υδατανθράκων

(φωτοσυνθετική αφομοίωση του CO<sub>2</sub>) στις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης. Η ενέργεια επομένως που παράγεται στις φωτεινές αντιδράσεις καταναλώνεται για τη δημιουργία του ανθρακικού σκελετού των φυτικών οργανισμών και επομένως την παραγωγή βιομάζας (Αϊβαλάκης, κ.ά., 2005).

Μέχρι σήμερα είναι γνωστές τρεις κύριες βιοχημικές παραλλαγές του φωτοσυνθετικού μεταβολισμού του άνθρακα (Αϊβαλάκης, κ.ά., 2005 Taiz and Zeiger, 1998):

- 1) Η C<sub>3</sub> φωτοσύνθεση με πρώτο ενδιάμεσο μεταβολίτη το 3-φωσφογλυκερινικό οξύ (ένωση με τρία άτομα άνθρακα).
- 2) Η C<sub>4</sub> φωτοσύνθεση ή κύκλος των Hatch και Slack με πρώτο ενδιάμεσο μεταβολίτη το οξαλοξικό οξύ (ένωση με τέσσερα άτομα C).
- 3) Ο μεταβολισμός οξέων τύπου Crassulaceae (CAM).

Στη C<sub>3</sub> φωτοσυνθετική οδό το CO<sub>2</sub> δεσμεύεται και στη συνέχεια ανάγεται έως το επίπεδο του υδατάνθρακα μέσω μιας κυκλικής διαδικασίας η οποία ονομάζεται αναγωγικός κύκλος των φωσφοπεντοζών (RPPC) ή κύκλος του Calvin. Το CO<sub>2</sub> μετατρέπεται σε φωσφορυλιωμένα σάκχαρα ενώ ταυτόχρονα αναγεννάται ο δέκτης του CO<sub>2</sub> (η 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη- RuDP). Τα φυτά που χρησιμοποιούν αυτόν τον τύπο φωτοσύνθεσης ονομάζονται C<sub>3</sub> και σ' αυτά ανήκουν τα περισσότερα φυτικά είδη της παγκόσμιας χλωρίδας.

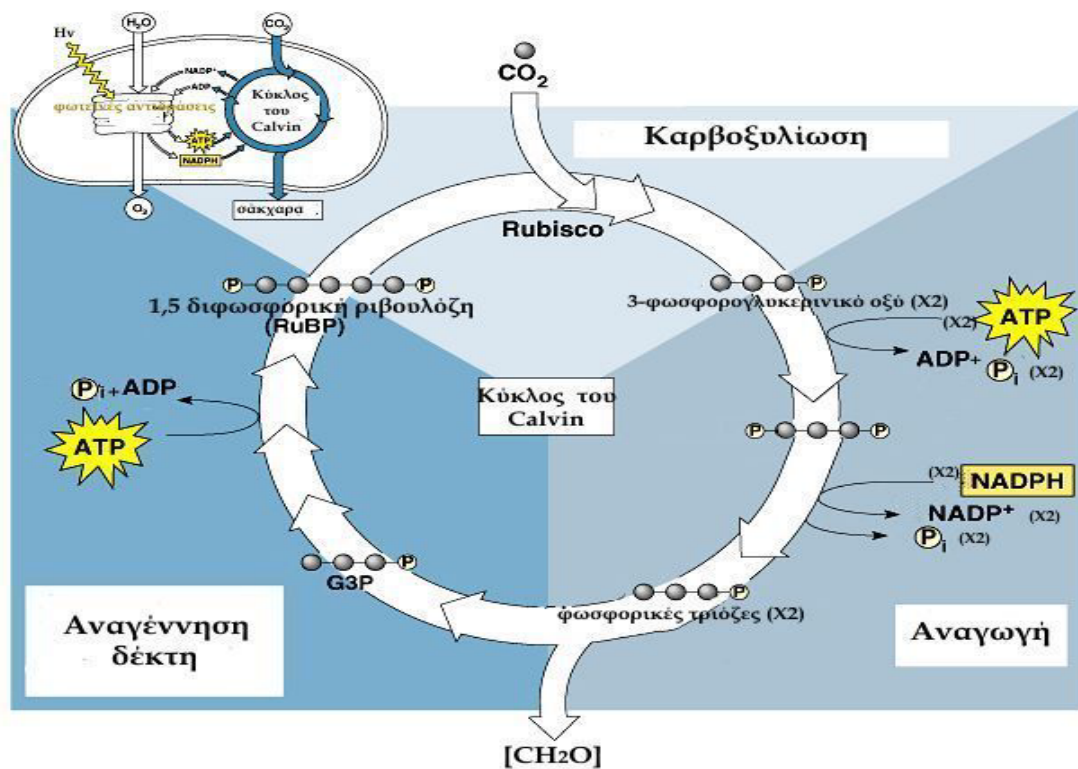
Ο κύκλος περιλαμβάνει τρία επιμέρους στάδια:

**α)** Στο πρώτο στάδιο του κύκλου, την καρβοξυλίωση, το CO<sub>2</sub> ενσωματώνεται με τη μορφή μιας καρβοξυλομάδας στο μόριο-δέκτη, την 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη και παράγονται δύο μόρια 3-φωσφογλυκερινικού οξέος (3-PGA). Την αντίδραση καταλύει το ένζυμο καρβοξυλάση-οξυγενάση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης (RubisCO) (Ridge, I. 2002).

**β)** Στο δεύτερο στάδιο, την αναγωγή, το 3-PGA ανάγεται προς φωσφορικές τριόζες (3-φωσφορική γλυκεριναλδεύδη ή φωσφορική διϋδρόξυακετόνη) με ταυτόχρονη κατανάλωση ATP και NADPH. Κατά το στάδιο αυτό το CO<sub>2</sub> έχει πλέον αναχθεί στο επίπεδο του υδατάνθρακα με κέρδος μία υδατανθρακική

μονάδα, ενώ για κάθε τρεις περιστροφές του κύκλου το καθαρό προϊόν είναι ένα μόριο τριόζης.

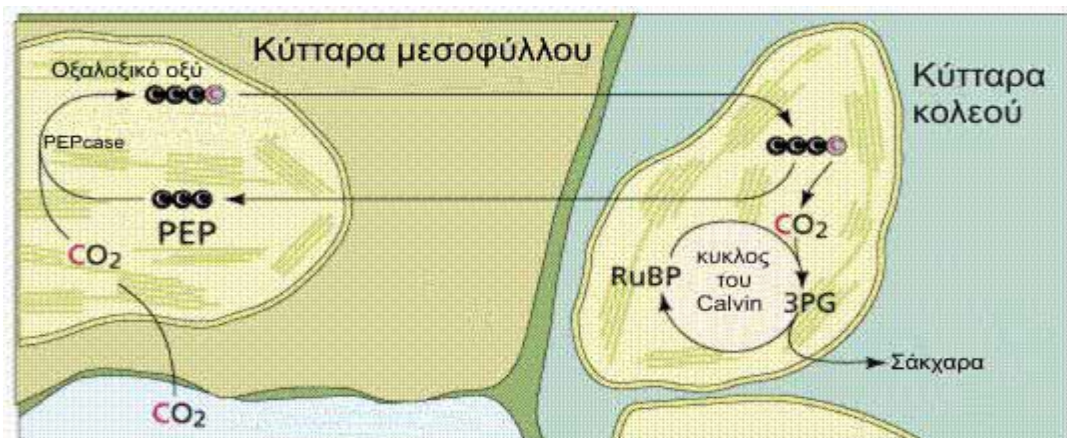
γ) Στο τρίτο στάδιο, την αναγέννηση του δέκτη, επιτελούνται μια σειρά από ενεργοβόρες αντιδράσεις (κατανάλωση ATP) ώστε η 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη να είναι διαθέσιμη εκ νέου για καρβοξυλίωση (Αϊβαλάκης, κ.ά., 2005 Taiz and Zeiger, 1998). Οι επιμέρους αντιδράσεις του κύκλου καταλύονται από υδατοδιαλυτά ένζυμα που είναι εντοπισμένα στο στρώμα του χλωροπλάστη. Η λειτουργία του κύκλου του Calvin εξαρτάται άμεσα από τον εφοδιασμό σε ATP και NADPH (επομένως εξαρτάται έμμεσα από την ύπαρξη φωτισμού) καθώς και σε CO<sub>2</sub> (Ridge, I. 2002).



Εικόνα 3. Η πορεία των βιοχημικών αντιδράσεων του κύκλου του Calvin.

Η C<sub>4</sub> οδός λειτουργεί ως ένα πολύπλοκο βιοχημικό και φυσιολογικό προσάρτημα του κύκλου του Calvin το οποίο εξυπηρετεί στη δέσμευση, μεταφορά και συγκέντρωση ατμοσφαιρικού CO<sub>2</sub> στις περιοχές όπου λειτουργεί ο κύκλος του Calvin (Αϊβαλάκης κ.α. 2005). Ενώσεις με τέσσερα άτομα άνθρακα (C<sub>4</sub>) μεταφέρουν CO<sub>2</sub> από τα κύτταρα του μεσοφύλλου, στα οποία συμβαίνει η αρχική

ενσωμάτωση του  $\text{CO}_2$ , στα κύτταρα του δεσμικού κολεού στα οποία λειτουργεί ο κύκλος του Calvin (Stryer, 1994). Στο βιοχημικό επίπεδο η  $\text{C}_4$  φωτοσυνθετική οδός περιλαμβάνει τέσσερα στάδια: α) την καρβοξυλίωση β) τη μεταφορά μεταβολιτών γ) την αποκαρβοξυλίωση και επαναδέσμευση του  $\text{CO}_2$  στον κύκλο του Calvin και δ) την αναγέννηση του δέκτη (Αϊβαλάκης κ.α. 2005). Το πρώτο προϊόν της δέσμευσης του  $\text{CO}_2$  είναι το οξαλοξικό οξύ (OOA), μια ένωση με τέσσερα άτομα άνθρακα. Η λειτουργία της  $\text{C}_4$  οδού, παρόλο ότι παρουσιάζει αυξημένο ενεργειακό κόστος έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό απωλειών άνθρακα μέσω της φωτοαναπνοής και εξαναγκάζει την RubisCO να λειτουργεί ουσιαστικά μόνο ως καρβοξυλάση και όχι ως οξυγονάση. Με το μηχανισμό αυτό επιτυγχάνονται πολύ υψηλότερες τοπικές συγκεντρώσεις  $\text{CO}_2$  και κατά συνέπεια αποτελεσματικότερη δέσμευσή του από τη RubisCO (Sage, R.F. and Monson, R.K. 1999). Το γεγονός αυτό αποκτά ιδιαίτερη σημασία όταν επικρατούν στο περιβάλλον υψηλές θερμοκρασίες. Τα φυτά  $\text{C}_4$  αποκτούν προσαρμοστικά πλεονεκτήματα σε ένα περιβάλλον με υψηλές θερμοκρασίες και υψηλή ένταση φωτισμού, κάτι που εξηγεί την επικράτησή τους στην τροπική-υποτροπική ζώνη. Αντίθετα στα  $\text{C}_3$  φυτά (όπως π.χ. η *Parietaria judaica*, το πειραματόφυτο της παρούσας μελέτης) λόγω της λειτουργίας της φωτοαναπνοής είναι πιο αποτελεσματικά σε θερμοκρασίες κάτω των  $28^\circ\text{C}$  για αυτό και επικρατούν στις εύκρατες ζώνες (Stryer, 1994).



Εικόνα 4. Τα στάδια της αφομοίωσης του  $\text{CO}_2$  διαμέσου της  $\text{C}_4$  φωτοσυνθετικής οδού.

Στο μεταβολισμό οξέων τύπου Crassulaceae (CAM) τα φυτά δεσμεύουν το CO<sub>2</sub> κατά τη διάρκεια της νύχτας, στη διάρκεια της οποίας τα στομάτια παραμένουν ανοικτά. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την καρβοξυλάση του PEP και ακολουθεί αναγωγή του σχηματιζόμενου οξαλοξικού οξέως σε μηλικό. Το μηλικό οξύ αποθηκεύεται στα χυμοτόπια και αποκαρβοξυλιώνεται στη διάρκεια της ημέρας, όταν τα στομάτια παραμένουν κλειστά. Με το μηχανισμό αυτό εξασφαλίζεται τεράστια οικονομία νερού.

Πρέπει να σημειωθεί ότι το ένζυμο καρβοξυλάση-οξυγενάση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης (RubisCO) έχει θεμελιώδη σημασία όχι μόνο γιατί παίζει τον σημαντικότερο ρόλο στην ενσωμάτωση του CO<sub>2</sub> αλλά και γιατί είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη σε επίπεδο βιόσφαιρας. Η συγκέντρωσή της στα φύλλα κυμαίνεται μεταξύ 30 και 50% της ολικής πρωτεΐνης, συνεπώς συμβάλλει σημαντικά στην διατροφή των ετερότροφων οργανισμών (Αϊβαλάκης, κ.ά., 2005). Όπως υποδηλώνει και η ονομασία της, η RubisCO εκτός από την δράση της ως καρβοξυλάσης μπορεί να λειτουργήσει και ως οξυγενάση. Το CO<sub>2</sub> και το O<sub>2</sub> δρουν ανταγωνιστικά ως προς το υπόστρωμα, την 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη. Όπως αναφέρθηκε, κατά την καρβοξυλίωση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης παράγονται δύο μόρια 3-PGA, ενώ αντίθετα κατά την δράση της RubisCO ως οξυγενάσης παράγεται ένα μόριο 3-PGA και ένα μόριο φωσφογλυκολικού οξέως το οποίο παρεκκλίνει της πορείας του προς τον κύκλο του Calvin και αφού περάσει διαμέσου μίας σειράς από διαφορετικές αντιδράσεις σε διαφορετικά οργανίδια επανεισάγεται στον κύκλο του Calvin ως 3-PGA. Η βιοχημική αυτή οδός ονομάζεται φωτοαναπνοή διότι ενώ παρουσιάζει κοινά χαρακτηριστικά με την αναπνοή (κατανάλωση O<sub>2</sub> και παραγωγή CO<sub>2</sub>) απαιτείται φωτεινή ακτινοβολία για να λειτουργήσει. Για κάθε δύο μόρια φωσφογλυκολικού οξέως (δηλ. 4 άτομα άνθρακα), τα τρία άτομα άνθρακα επιστρέφουν στον κύκλο του Calvin ενώ το ένα αποβάλλεται στην ατμόσφαιρα ως CO<sub>2</sub>. Συνεπώς η δραστηριότητα αυτή της RubisCO ως οξυγενάσης έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ενός ατόμου άνθρακα. Η ένταση της φωτοαναπνοής εξαρτάται από ορισμένους παράγοντες όπως το είδος του φυτού, την ένταση του φωτός, τη θερμοκρασία αλλά κυρίως την αναλογία των μερικών πιέσεων CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> στο περιβάλλον της RubisCO. Σε συνθήκες υψηλής μερικής πίεσης CO<sub>2</sub> η RubisCO λειτουργεί μόνο ως καρβοξυλάση χωρίς να επιτελείται ταυτόχρονα η λειτουργία της φωτοαναπνοής. Στις φυσιολογικές συγκεντρώσεις CO<sub>2</sub> και O<sub>2</sub> η δραστηριότητα της

RubisCO ως οξυγενάσης φτάνει το 30% της δραστηριότητάς της ως καρβοξυλάσης. Οι απώλειες αυτές γίνονται μεγαλύτερες όταν οι χλωροπλάστες δεν τροφοδοτούνται με επαρκείς ποσότητες CO<sub>2</sub> στην περίπτωση που τα στομάτια λόγω υψηλής θερμοκρασίας παραμένουν κλειστά ή μισόκλειστα. Θεωρείται πιθανό η φωτοαναπνοή να αποτελεί εξελικτικό υπόλειμμα, που αντικατοπτρίζει την εξέλιξη της RubisCO από ένα αναερόβιο περιβάλλον (υψηλή συγκέντρωση CO<sub>2</sub> και χαμηλή συγκέντρωση O<sub>2</sub>) σε ένα αερόβιο περιβάλλον οπότε και εκδηλώθηκε ο διττός χαρακτήρας του ενζύμου. Ωστόσο τα φυτά μέσω της εξέλιξης αξιοποίησαν την βιοχημική αυτή αδυναμία και την μετέτρεψαν σε χρήσιμη μεταβολική διεργασία, αφού υπάρχουν ενδείξεις ότι η φωτοαναπνοή παρέχει προστασία στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Αυτό συμβαίνει είτε σε αντίξοες συνθήκες είτε σε περίπτωση περίσσειας ενέργειας στη φωτοσυνθετική συσκευή, ειδικότερα σε συνθήκες έλλειψης CO<sub>2</sub> (Αϊβαλάκης, κ.ά., 2005).

#### 1.4. Η απορρόφηση φωτονίων με κατάλληλο μήκος κύματος και η διέγερση της χλωροφύλλης.

Όταν ένα φωτόνιο προσκρούει σε ένα υλικό μπορούν να συμβούν χημικές μεταβολές, το είδος των οποίων εξαρτάται από την ενέργεια (μήκος κύματος) του φωτονίου και το είδος του υλικού. Η ενέργεια των φωτονίων της ορατής περιοχής του φάσματος μπορεί να προκαλέσει ήπιες χημικές αλλαγές με τελικό αποτέλεσμα την μεταφορά ενέργειας από τη δέσμη ακτινοβολίας στην ύλη (απορρόφηση), η οποία μπορεί να αξιοποιηθεί από τους οργανισμούς-δέκτες της ακτινοβολίας. Στις ήπιες αυτές χημικές αλλαγές περιλαμβάνονται μεταπτώσεις ηλεκτρονίων σε στιβάδες με υψηλότερο ενεργειακό περιεχόμενο σε ορισμένα μόρια (διέγερση μορίων). Τα διεγερμένα αυτά μόρια αντιδρούν με τη σειρά τους με άλλα μόρια με αποτέλεσμα μια σταθερή χημική αλλαγή.

Η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη είναι αντιστρεπτό φαινόμενο (Αϊβαλάκης, κ.ά., 2005). Τα διεγερμένα μόρια είναι ασταθή και τείνουν να επανέλθουν στην αρχική τους κατάσταση, αποδίδοντας την επιπλέον ενέργεια (αποδιέγερση). Η απόδοση της ενέργειας αυτής μπορεί να συμβεί με τους εξής τρόπους:

- α. Με τη μορφή θερμότητας. Η ενέργεια διέγερσης μετατρέπεται βαθμιαία σε θερμική μέσω αλλαγών δόνησης και περιστροφής του μορίου.
- β. Με τη μορφή ακτινοβολίας. Στην περίπτωση αυτή το μόριο της χρωστικής επιστρέφει στην αρχική του κατάσταση με ταυτόχρονη εκπομπή ενός φωτονίου (φθορισμός).
- γ. Με μεταφορά της διέγερσης στα γειτονικά μόρια. Εάν η αποδιέγερση συμβεί με τους δύο προηγούμενους τρόπους, δεν είναι δυνατό να παραχθεί φωτοχημικό έργο και η ενέργεια που απορροφήθηκε «χάνεται» με τη μορφή ακτινοβολίας ή και θερμότητας.

Η ενέργεια διέγερσης μπορεί να μεταφερθεί σε ένα γειτονικό μόριο, με αποτέλεσμα την αποδιέγερση του πρώτου και τη διέγερση του δεύτερου μορίου. Για να συμβεί μια τέτοια μεταφορά διέγερσης θα πρέπει τα μόρια να βρίσκονται σε κατάλληλη απόσταση μεταξύ τους και το ποσό ενέργειας που μπορεί να δεχθεί το μόριο-δέκτης να αντιστοιχεί στην ενέργεια του μορίου-πομπού.

Αποδιέγερση μπορεί να συμβεί επίσης με την απόδοση του διεγερμένου ηλεκτρονίου σε ένα κατάλληλο γειτονικό μόριο-δέκτη. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα διαχωρισμό φορτίου, κατά τον οποίο το αρχικό μόριο οξειδώνεται και το μόριο-δέκτης ανάγεται. Το φορτισμένο πλέον μόριο της χρωστικής επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση με απόσπαση ενός ηλεκτρονίου από ένα τρίτο γειτονικό μόριο.

Στη φωτοσύνθεση, μια ειδικής μορφής χλωροφύλλη (Chl a) προκαλεί διαχωρισμό φορτίου, με αποτέλεσμα να αποσπώνται ηλεκτρόνια από το νερό και να μεταφέρονται στο NADP<sup>+</sup>, το οποίο ανάγεται προς NADPH. Η μεταφορά των ηλεκτρονίων πραγματοποιείται μέσω διαδοχικών οξειδώσεων και αναγωγών ενδιάμεσων φορέων (φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων). Οι φορείς αυτοί είναι οργανωμένοι σε τρία κύρια σύμπλοκα (Φωτοσύνστημα I, Φωτοσύνστημα II, σύμπλοκο κυτοχρωμάτων), τα οποία είναι τοποθετημένα στη μεμβράνη των θυλακοειδών.

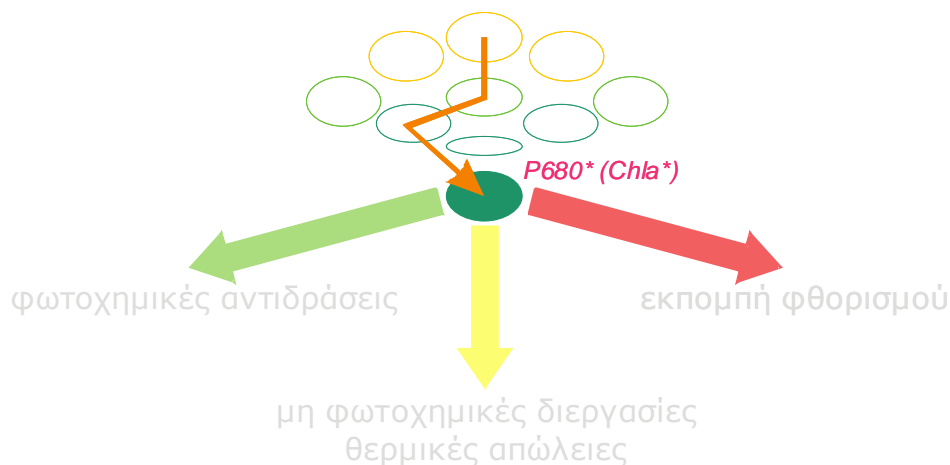


### 1.5. Φθορισμός Χλωροφύλλης.

Στην προηγούμενη παράγραφο αναφέρθηκε ότι η απορρόφηση ακτινοβολίας κατάλληλου ενεργειακού περιεχομένου από τα μόρια προκαλεί μεταπτώσεις ηλεκτρονίων σε στιβάδες με υψηλότερο ενεργειακό περιεχόμενο. Ένας από τους τρόπους αποδιέγερσης της ενέργειας είναι η επανεκπομπή της μέσω ακτινοβολίας, χαμηλότερου όμως ενεργειακού περιεχομένου (δηλαδή μεγαλύτερου μήκους κύματος) σε σύγκριση με την ακτινοβολία διέγερσης λόγω παράλληλων αναπόφευκτων θερμικών απωλειών.

Κατά την φωτοσύνθεση πραγματοποιείται μεταφορά ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα να αποσπώνται ηλεκτρόνια από το νερό και να μεταφέρονται στο NADP<sup>+</sup>, το οποίο ανάγεται προς NADPH. Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων μπορεί να κορεστεί (δηλαδή ο ρυθμός απορρόφησης της ενέργειας της φωτεινής ακτινοβολίας να είναι υψηλότερος από τον ρυθμό ροής των ηλεκτρονίων κατά μήκος της φωτοχημικής αλυσίδας). Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η χλωροφύλλη του κέντρου αντίδρασης του φωτοσυστήματος II μπορεί να διεγερθεί πριν καταστεί δυνατή η μεταφορά του διεγερμένου ηλεκτρονίου προς τον πρωταρχικό αποδέκτη (κιννόνη A) απλά επειδή τη δεδομένη χρονική στιγμή η κιννόνη είναι ανηγμένη. Στην κατάσταση αυτή, το Φωτοσύστημα II δεν μπορεί να μεταφέρει το ηλεκτρόνιο της διεγερμένης χλωροφύλλης του κέντρου αντίδρασης προς την φωτοχημική αλυσίδα πριν προωθηθεί το αμέσως προηγούμενο ακόμα μακρύτερα προς το φωτοσύστημα I. Στο σημείο αυτό λειτουργούν εναλλακτικές διαδρομές διοχέτευσης της ενέργειας διέγερσης προς μη φωτοχημικούς αποδέκτες οι οποίοι αποσβένουν την ενέργεια ως θερμότητα. Ο κύκλος των ξανθοφυλλών και ο μηχανισμός της 'triplet' χλωροφύλλης - της χλωροφύλλης στη διεγερμένη κατάσταση τριπλότητας είναι δύο τέτοιοι μηχανισμοί. Τόσο οι φωτοχημικές αντιδράσεις όσο και οι υπόλοιποι μηχανισμοί διοχέτευσης της ενέργειας δρουν ανταγωνιστικά μεταξύ τους και ακόμα ανταγωνιστικά με την απόδοση του φθορισμού. Έτσι, η φωτοχημική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων αναφέρεται υπό όρους φθορισμού χλωροφύλλης ως φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού (Photochemical Quenching, qP). Όλες οι άλλες μη φωτοχημικές οδοί διοχέτευσης της ενέργειας οι οποίες επίσης αποσβένουν τα επίπεδα του φθορισμού αναφέρονται αθροιστικά ως μη φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού (Non-photochemical Quenching, qN).

Η διέγερση της χλωροφύλλης του ενεργού κέντρου μπορεί επομένως να προκαλέσει φωτοχημικές αντιδράσεις (η συνεισφορά τους εκφράζεται με τον συντελεστή φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού,  $qP$ ), να τροφοδοτήσει με ενέργεια μη-φωτοχημικές διεργασίες (η συνεισφορά τους εκφράζεται με τους συντελεστές μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού,  $qN$  και NPQ) ή να αυξήσει την ένταση του φθορισμού. Συνεπώς, αλλαγές στον τρόπο διοχέτευσης της ενέργειας έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στα επίπεδα εκπομπής του φθορισμού. Ερμηνεύοντας τις αλλαγές αυτές μπορούμε να υπολογίσουμε την φωτοχημική και την μη φωτοχημική συνιστώσα της απόσβεσης της ενέργειας του φωτοσυστήματος II. Έτσι, ο φθορισμός της χλωροφύλλης αναφέρεται ως η φωτοσυνθετική υπογραφή των φύλλων, καθώς, υπό ορισμένες συνθήκες τα επίπεδα του φθορισμού σχετίζονται με την φωτοσυνθετική λειτουργία (Kautsky and Hirsch, 1931).



Εικόνα 5. Συνιστώσες της απόσβεσης της ενέργειας του Φωτοσυστήματος II.

## 1.6. Παράγοντες του περιβάλλοντος που επηρεάζουν την φωτοσύνθεση.

### 1.6.1. Φωτεινή ακτινοβολία.

Τόσο η ποσότητα, όσο και η ποιότητα της φωτεινής ακτινοβολίας επηρεάζουν την φωτοσυνθετική δραστηριότητα. Η ποιότητα καθορίζεται από τη φασματική κατανομή της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και από την θέση των φύλλων (φύλλα σκιάς-φύλλα φωτός). Η ποσότητα (ένταση) της ακτινοβολίας μεταβάλλεται ανάλογα με την εποχή, το γεωγραφικό πλάτος, τις καιρικές συνθήκες (π.χ. συννεφιά), τη θέση των φύλλων στην κόμη ενός δέντρου και την ύπαρξη υπερκείμενων φυτών. Αυξανόμενη της έντασης της φωτεινής ακτινοβολίας η φωτοσυνθετική

δραστηριότητα αυξάνει γραμμικά μέχρι μια ορισμένη τιμή, πέραν της οποίας κάμπτεται τείνοντας σε μία μέγιστη τιμή. Ο περιοριστικός παράγοντας για περαιτέρω αύξηση δεν είναι η ένταση της ακτινοβολίας αλλά η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> αφού επέρχεται κορεσμός στην ταχύτητα καρβοξυλίωσης της RubisCO και αυξάνεται η φωτοαναπνοή. Στα C<sub>4</sub> φυτά η φωτοσυνθετική ταχύτητα αυξάνεται ακόμη και σε υψηλές εντάσεις φωτισμού λόγω της απουσίας φωτοαναπνευστικής δραστηριότητας και του αποτελεσματικού μηχανισμού δέσμευσης του CO<sub>2</sub> από την ατμόσφαιρα.

### **1.6.2. Θερμοκρασία.**

Η φωτοσυνθετική δραστηριότητα ως βιοχημική διαδικασία, αυξάνεται αυξανόμενης της θερμοκρασίας έως μία βέλτιστη περιοχή θερμοκρασιών η οποία για τα περισσότερα είδη των εὐκρατών κλιμάτων κυμαίνεται μεταξύ 25–35 °C. Αύξηση της θερμοκρασίας πέραν των ορίων αυτών έχει ως αποτέλεσμα την πτώση της φωτοσυνθετικής ταχύτητας λόγω της αύξησης της αναπνοής και της φωτοαναπνοής, του κλεισίματος των στοματιών και της δυσλειτουργίας που παρατηρείται στα φωτοσυστήματα των θυλακοειδών των χλωροπλαστών.

### **1.6.3. Ανεπάρκεια νερού.**

Η ανεπάρκεια νερού επηρεάζει την φωτοσύνθεση αφού στις συνθήκες αυτές τα στομάτια κλείνουν παρεμποδίζοντας έτσι την ανταλλαγή αερίων και την δέσμευση CO<sub>2</sub> από τα φωτοσυνθετικά κύτταρα. Παράλληλα η επικράτηση χαμηλού δυναμικού του νερού στον πρωτοπλάστη επηρεάζει την λειτουργική ακεραιότητα της φωτοσυνθετικής συσκευής.

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

Όπως είναι γνωστό η περιεκτικότητα του ατμοσφαιρικού αέρα σε CO<sub>2</sub> ανέρχεται σε 0,0036 % (360 ppm). Το CO<sub>2</sub> αποτελεί το υπόστρωμα για τις βιοχημικές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης και η συγκέντρωση του στο περιβάλλον των φυτών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Έχει βρεθεί ότι όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα του αέρα σε CO<sub>2</sub>, τόσο πιο έντονη είναι η φωτοσυνθετική δραστηριότητα για μια συγκεκριμένη ένταση φωτισμού. Δεδομένης της χαμηλής συγκέντρωσης του CO<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα, σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού, το CO<sub>2</sub> αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα για τη φωτοσύνθεση, κυρίως των C<sub>3</sub>

φυτών. Σε υψηλές εντάσεις φωτισμού (στην περιοχή κορεσμού) η φωτοσυνθετική ταχύτητα αυξάνεται αυξανομένης της συγκέντρωσης του CO<sub>2</sub> στο περιβάλλον του φύλλου έως ένα όριο στο οποίο επέρχεται κορεσμός. Στα περισσότερα C<sub>3</sub> φυτά ο κορεσμός της φωτοσυνθετικής συσκευής επέρχεται σε συγκεντρώσεις κατά πολύ υψηλότερες της ατμοσφαιρικής και εξαρτάται από την ένταση της φωτοαναπνοής. Από την άλλη πλευρά όταν η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> πάρει χαμηλές τιμές, τότε το καθαρό ισοζύγιο στις ανταλλαγές O<sub>2</sub> ή CO<sub>2</sub> μηδενίζεται, δηλ. η φωτοσυνθετική δραστηριότητα αντισταθμίζεται από την αναπνευστική δραστηριότητα και τη δραστηριότητα της φωτοαναπνοής. Στην κατάσταση αυτή έχει επιτευχθεί το σημείο αντιστάθμισης CO<sub>2</sub>. Το σημείο αντιστάθμισης CO<sub>2</sub> για τα περισσότερα C<sub>3</sub> φυτά κυμαίνεται μεταξύ 25 και 100 ppm CO<sub>2</sub>.

## 2. Κυτταρικά έγκλειστα.

Τα κυτταρικά έγκλειστα αποτελούν συσσωρεύσεις οργανικών ή ανόργανων συστατικών είτε με τη μορφή άμορφης μάζας είτε με κρυσταλλική μορφή. Τα συστατικά αυτά συσσωρεύονται συνήθως στα χυμοτόπια των κυττάρων και σε ορισμένες περιπτώσεις σε εξειδικευμένα κύτταρα. Ο λόγος συσσωρεύσεώς τους δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένος (Αϊβαλάκης, κ.ά., 2005). Τα συστατικά αυτά ταξινομούνται σε δύο κύριες κατηγορίες: α) πρωτεϊνόκοκκοι και β) κρύσταλλοι.

Σε πολλές περιπτώσεις αποθηκεύονται σε φυτικά κύτταρα πρωτεΐνες σε κρυσταλλική μορφή. Ενδεχομένως αποτελούν αποθήκες πρωτεϊνών, οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν όταν υπάρξει ανάγκη. Πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι παρατηρούνται στα χυμοτόπια, μέσα σε πυρήνες, σε ηθμοσωλήνες, σε πλαστίδια και σε υπεροξυσώματα.

Με τον όρο «κρύσταλλοι» περιγράφονται εναποθέσεις κυρίως οργανικών και ανόργανων αλάτων του Ca. Οι ανόργανες και οργανικές εναποθέσεις αλάτων στα φυτά αυτά ταξινομούνται σε τρεις κύριες κατηγορίες (Arnott, H.J. and Pautard, F.G.E. 1970, Fahh, A. 1990, Metcalfe, C.R. 1985):

- α) Κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου.
- β) Άμορφο ανθρακικό ασβέστιο (κυστόλιθοι).
- γ) Άμορφες εναποθέσεις πυριτίου (φυτόλιθοι).

Οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου ( $\text{CaOx}$ ) είναι κυτταρικά έγκλειστα ευρύτατα διαδεδομένα στα φυτά. Παρατηρούνται σε πολυάριθμα μέλη των πέντε βασιλείων από τα φύκη έως τα γυμνόσπερμα και τα αγγειόσπερμα (Freisleben, R. 1933). Αποτελούνται από μονοϋδρικό ( $\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4)\cdot\text{H}_2\text{O}$ ) ή διυδρικό ( $\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4)\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) οξαλικό ασβέστιο και θεωρούνται ως τελικά προϊόντα του μεταβολισμού. Σχηματίζονται στα χυμοτόπια αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις αναφέρεται η κρυστάλλωσή τους και στο κυτόπλασμα (Γαλάτης, Κατσαρός και Αποστολάκος, 1998).

Οι κρύσταλλοι του μονοϋδρικού οξαλικού ασβεστίου εμφανίζονται είτε μεμονωμένοι είτε κατά ομάδες (π.χ.ως ραφίδες, κρυσταλλική άμμος ή σφαιρίτες). Οι τελευταίοι αποτελούνται από βελονοειδείς κρυστάλλους ακτινωτά διατεταγμένους. Οι τετραγωνικοί κρύσταλλοι του διυδρικού οξαλικού ασβεστίου απαντώνται συνήθως ως μεμονωμένοι. Έχουν πρισματική μορφή και είναι απλοί ή σύνθετοι (όπως στα επιδερμικά κύτταρα του *Allium*) ή οκτάεδρα ή συσσωματώματα οκταέδρων (όπως σε ορισμένους κρυσταλλώδεις αδένες). Σπανιότερα σχηματίζονται κρύσταλλοι διοξειδίου του πυριτίου ( $\text{SiO}_2$ ) στο τοίχωμα των επιδερμικών κυττάρων, ή πυριτικά σωματίδια, άμορφες υαλώδεις μάζες μέσα στον πρωτοπλάστη. Έχει αναφερθεί ακόμη και η ύπαρξη κρυστάλλων θειϊκού ασβεστίου ( $\text{CaSO}_4$ ) (Γαλάτης, Κατσαρός και Αποστολάκος, 1998).

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

Τα κύτταρα τα οποία φέρουν κρυστάλλους μπορεί να είναι μορφολογικά όμοια με τα γειτονικά τους τα οποία δε φέρουν κρυστάλλους ή να διαθέτουν χαρακτηριστική μορφή. Τα κύτταρα που φέρουν κρυστάλλους είτε μεμονωμένα είτε κατά ομάδες και διακρίνονται εμφανώς από τα γειτονικά τους χαρακτηρίζονται ως ιδιοβλάστες. Οι ιδιοβλάστες αυτοί εντοπίζονται συνήθως στην περιοχή του

μεσόφυλλου ή σε σκληρεγχυματικούς κολεούς. Στα φύλλα η παρουσία τους είναι συχνότερη στην περιοχή των δεσμικών κολεών ή των προεκτάσεων τους στην περιοχή της ηθμαγγειώδους δεσμίδας.

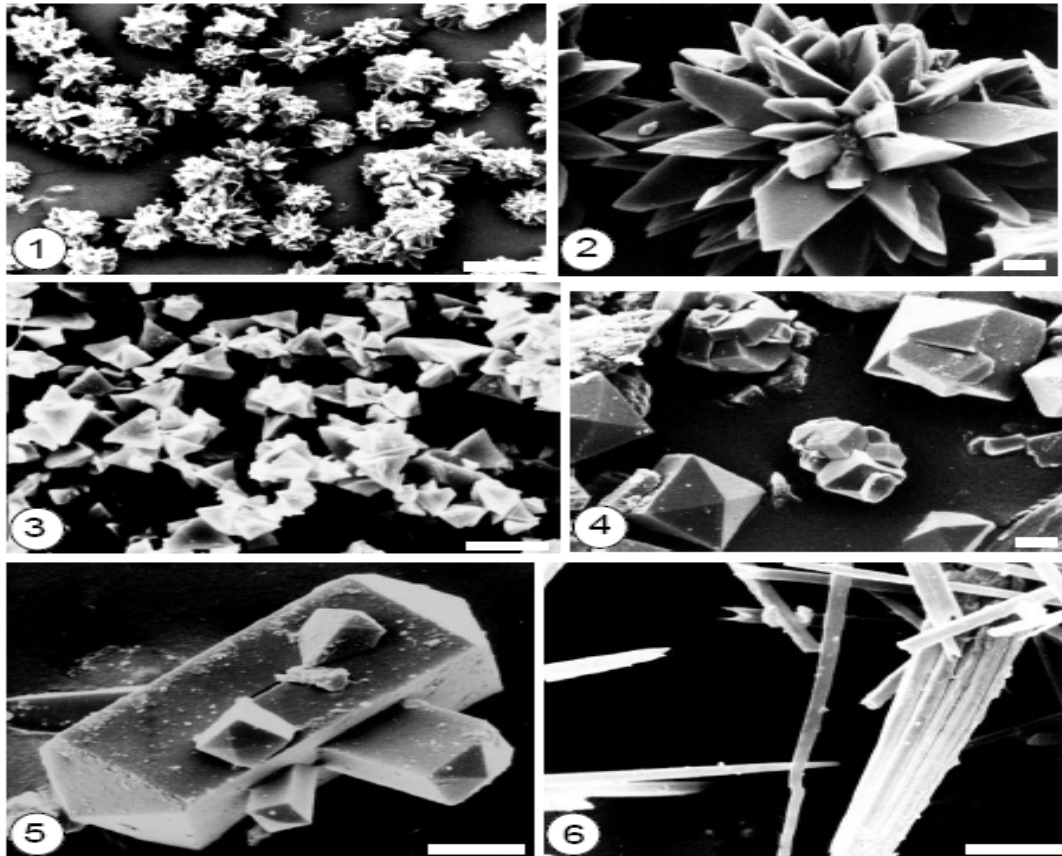
Ο διαφορετικός τρόπος κρυστάλλωσης και οι πιθανές διαφορές στη σύσταση των κρυστάλλων δημιουργούν μια μεγάλη ποικιλία μορφών. Μάλιστα ο τύπος των κρυστάλλων σχετίζεται και με την οικογένεια, γένος ή ακόμη και το είδος στο οποίο σχηματίζεται και για το λόγο αυτό έχει καθιερωθεί ειδική ονοματολογία η οποία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

- α. *Ραφίδες*: επιμήκεις, λεπτοί, βελονοειδείς, μονοϋδρικοί συνήθως κρύσταλλοι με αιχμηρές απολήξεις που συνήθως αθροίζονται σε δέσμες. Οι μεμονωμένοι κρύσταλλοι περιβάλλονται από μία μεμβράνη και ολόκληρη η δέσμη συνήθως καλύπτεται από μία μάζα βλενωδούς υφής. Οι ραφίδες συνήθως σχηματίζονται μέσα σε ογκώδη ιδιοβλαστικά κύτταρα, γνωστά ως «σάκοι ραφίδων», τα οποία λόγω του μεγέθους τους διακρίνονται από τα γειτονικά κύτταρα. Οι ραφίδες είναι άφθονες σε οικογένειες δικότυλων όπως Balsaminaceae, Rubiaceae και Dilleniaceae αλλά και σε ορισμένες οικογένειες μονοκότυλων. Ασυνήθιστες ραφίδες με ακίδες και αυλακώσεις έχουν αναφερθεί στο είδος *Xanthosoma sagittifolium* της οικογένειας Araceae.
- β. *Βελονοειδείς κρύσταλλοι*: βελονοειδείς σχηματισμοί μικρότερου μεγέθους από τις ραφίδες που δεν απαντώνται σε δέσμες. Ο τύπος αυτός των κρυστάλλων απαντάται στις οικογένειες Acanthaceae, Lauraceae και Myristicaceae.
- γ. *Βοτρύομορφοι κρύσταλλοι (druses)*: κρύσταλλοι που είναι χαλαρά ενωμένοι σε μία αιχμηρή σφαιρική μάζα στην οποία τα περισσότερα συστατικά των κρυστάλλων προεξέχουν από την επιφάνεια και παράγουν μια δομή αστεροειδούς σχήματος. Ο τύπος αυτός κρυστάλλων παρουσιάζεται συχνά σε ορισμένες οικογένειες όπως Leguminosae, Juglandaceae, Polygonaceae και Tiliaceae.
- δ. *Πρισματικοί κρύσταλλοι*: ρομβοεδρικοί ή οκταεδρικοί μεταβλητού μεγέθους ευρέως διαδεδομένοι. Απαντώνται συνήθως σε παρεγχυματικά κύτταρα της δευτερογενούς ανατομικής διάπλασης των ηθμαγγειωδών δεσμίδων.
- ε. *Κρυσταλλική άμμος*: κοκκώδης μάζα από λεπτούς, ιδιαίτερα συμπαγείς μικροκρυστάλλους οι οποίοι διασπείρονται σε όλο το κύτταρο στο οποίο προσδίδουν μια αμμώδη υφή. Απαντάται συνήθως στα γένη *Acuba* (Cornaceae), *Amaranthus* (Amaranthaceae) και *Sambucus* (Caprifoliaceae).

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

Οι κρύσταλλοι στα αγγειόσπερμα συνήθως αποτελούνται από οξαλικό ασβέστιο. Οι Al-Rais, Myers και Watson (1971) έδειξαν ότι όταν το ασβέστιο δεν είναι διαθέσιμο σε επαρκείς ποσότητες στο φυτό για το σχηματισμό των κρυστάλλων, μπορεί να αντικατασταθεί από στρόντιο, μαγνήσιο ή βάριο. Επίσης το οξαλικό ασβέστιο από το οποίο αποτελούνται οι κρύσταλλοι μπορεί να περιέχει και ποσότητες άλλων συστατικών ή οι κρύσταλλοι μπορεί να αποτελούνται ολοκληρωτικά από άλλα άλατα ασβεστίου. Αν και λιγότερο σύνηθες από το οξαλικό ασβέστιο, το ανθρακικό ασβέστιο εντοπίζεται με τη μορφή εναποθέσεων σε κύτταρα ορισμένων φυτικών ειδών. Στις περιπτώσεις αυτές το ανθρακικό ασβέστιο εναποτίθεται είτε στα κυτταρικά τοιχώματα, είτε συγκροτεί ογκώδεις δομές, τους κυστόλιθους. Η παρουσία, αλλά και η μορφή των κρυστάλλων αποτελούν εξαιρετικά σημαντικά χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στη μελέτη των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των φυτικών ειδών. Ένα ακόμη σημαντικό χαρακτηριστικό αποτελεί ο τρόπος εξάπλωσης των κρυστάλλων στα επί μέρους όργανα. Τα κύτταρα-ιδιοβλάστες δεν κατανέμονται τυχαία στο φυτικό σώμα, αλλά πάντα σε ειδικές περιοχές όπως η υποδερμίδα και οι προεκτάσεις των δεσμικών κολεών.





**Εικόνα 5.** Μικροφωτογραφίες απομονωμένων κρυστάλλων από TEM. 1.,2. Βοτρώμορφοι κρύσταλλοι από το βλαστό του *Opuntia ficus-indica* 3. Κρυσταλλική άμμος από το βλαστό του *Amaranthus spinosus* 4.,5. Πρισματικοί κρύσταλλοι από *Begonia* sp. 6. Ραφίδες από *Cissus* sp..

### 2.1. Η ανατομία των λιθοκύστεων.

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

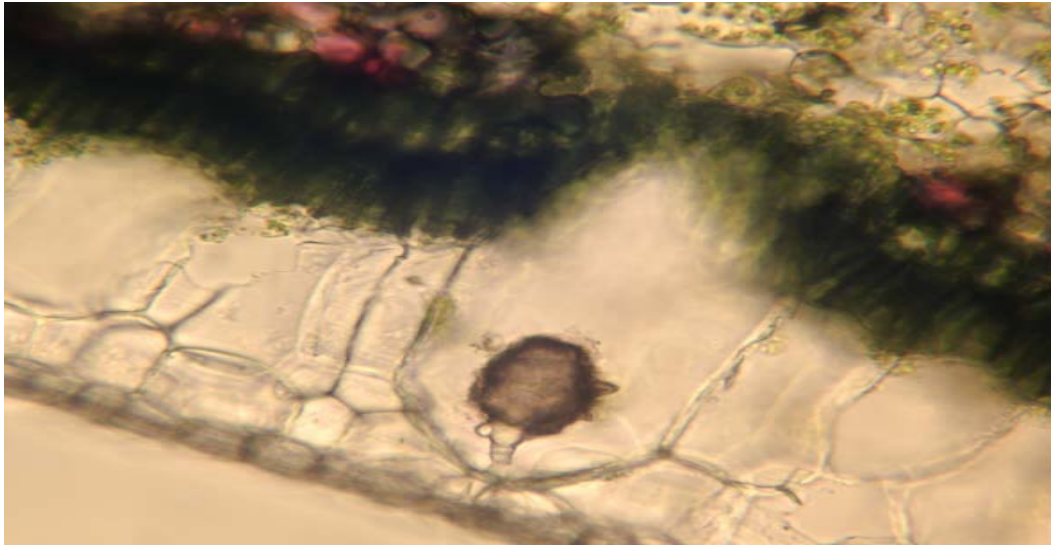


αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ο πυρήνας παραμένει σε λειτουργική κατάσταση μέσα στις ώριμες λιθοκύστες. Εκτός αυτού, ο ογκώδης κυστόλιθος περιβάλλεται και από κυτόπλασμα (Sugimura et al,1999). Οι λιθοκύστες προκύπτουν από τη διαφοροποίηση επιδερμικών κυττάρων κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης των οργάνων. Συνήθως νεκρώνονται μετά τον πλήρη σχηματισμό του κρυστάλλου, είναι όμως δυνατόν να παραμένουν ζωντανά εφόσον ο κρύσταλλος παραμένει καλά διαχωρισμένος από το πρωτόπλασμα του κυττάρου (Δροσόπουλος, 1992).

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

Ιστοχημικές αναλύσεις έδειξαν ότι ένας κυστόλιθος καταλαμβάνει την κοιλότητα της λιθοκύστης σε ώριμα φύλλα ενώ τα νεαρά φύλλα διαθέτουν πολυάριθμες λιθοκύστες χωρίς εμφανείς κυστόλιθους (Sugimura et al,1999). Η αύξηση του ποσοστού Ca των φύλλων είναι ευθέως ανάλογη με την αύξηση της ηλικίας του φύλλου και φαίνεται ότι σχετίζεται στενά με την σταδιακή εναπόθεση Ca στους αναπτυσσόμενους κυστόλιθους. Η μέγιστη ποσότητα Ca φθάνει περίπου τα 40 ng για κάθε λιθοκύστη όταν οι μουριές αναπτύσσονται υδροπονικά με πλεόνασμα Ca (Sugimura et al,1999).

Σε ώριμα φύλλα φυτών των γενών *Boehmeria* και *Ficus* η παραγωγή των κυστόλιθων εξαρτάται από την περιεκτικότητα ασβεστίου στο έδαφος. Σύμφωνα με τους Metcalfe and Chalk (1985), οι κυστόλιθοι δημιουργούνται ακόμη και σε συνθήκες πλήρους έλλειψης ασβεστίου, ωστόσο το μέγεθος του εγκλειστού καθορίζεται από τη συγκέντρωση ασβεστίου στο μέσο της καλλιέργειας. Η παρατεταμένη σκίαση εμποδίζει επίσης την ανάπτυξη των κυστόλιθων σε νεαρά φυτά. Εάν η συγκέντρωση του ατμοσφαιρικού διοξειδίου του άνθρακα αυξηθεί δέκα φορές, οι μεμονωμένοι κυστόλιθοι αυξάνουν το μεγέθος τους, αλλά ο αριθμός τους δεν αυξάνεται. Από την άλλη πλευρά, αν η ατμόσφαιρα στερείται διοξειδίου του άνθρακα μόνο στοιχειώδεις κυστόλιθοι παράγονται (Freisleben, 1933).



Εικόνα 5. *Ficus sp.*..Κυστόλιθος μέσα σε λιθοκόστη.

## 2.2. Πιθανή φυσιολογική σημασία των κυτταρικών εγκλείστων.

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

- α) Οι ιδιοβλάστες που περιέχουν κρυστάλλους ασβεστίου θα πρέπει να παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της συγκέντρωσης των κατιόντων ασβεστίου στους φυτικούς ιστούς (Dickison 2000; Franceschi and Horner, 1980; Franceschi and Nakata, 2005; Macnish *et al* 2003; Nakata, 2003). Επίσης η διαπίστωση ότι σε μια σειρά ιστούς διαφορετικών ειδών παρατηρείται αποδόμηση των κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου (και επομένως το μέγεθος του κρυστάλλου επιδέχεται

- ρύθμιση) σχετίστηκε με τη διαχείριση των αποθεμάτων ασβεστίου, χωρίς ωστόσο να δοθεί ικανοποιητική ερμηνεία για τη μεταβολική τύχη του άνθρακα του οξαλικού (Parslan *et al*, 2001). Οι Arnott and Pautard (1970) πρότειναν ότι το οξαλικό ασβέστιο (που σχηματίζεται στους ιδιοβλάστες) μπορεί να παρέχει ένα πρόσκαιρο απόθεμα Ca και επομένως η ανταλλαγή μεταξύ διαλυτών και αδιάλυτων δεξαμενών Ca ρυθμίζεται ανάλογα με τις ανάγκες των φυτικών ιστών. Πράγματι, τα επίπεδα οξαλικού Ca στους ιδιοβλάστες μπορεί να αυξηθούν ή να μειωθούν ανάλογα με τα επίπεδα του ασβεστίου στο μέσο ανάπτυξης (Franceschi, 1989; Volk *et al*, 2002).
- β)** Οι κρύσταλλοι παίζουν ρόλο στην άμυνα έναντι φυτοφάγων ή/και παθογόνων καθώς και στη μηχανική στήριξη των ιστών σε περίπτωση αφυδάτωσής τους. (Franceschi and Horner, 1980; Metcalfe, 1985; Lucas *et al* 2000; Nakata, 2003). Η συσσώρευση σχετικών με παθογένεση πρωτεϊνών μέσα σε ιδιοβλάστες που περιέχουν κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου ενισχύει την υπόθεση αυτή (Dixon, Cutt and Klessig, 1991).
- γ)** Οι κρύσταλλοι αποτελούν μία μορφή αποθήκευσης οξαλικού οξέος το οποίο επανεισάγεται στον μεταβολικό κύκλο όταν το απαιτούν οι συνθήκες. Η αδρανοποίηση του οξαλικού οξέος επιβάλλεται ώστε να μη δημιουργούνται παρενέργειες στους ιστούς λόγω του ισχυρά όξινου χαρακτήρα του (Franceschi and Horner 1980).
- δ)** Η αποθήκευση ιόντων ασβεστίου και οξαλικού οξέος με τη μορφή οξαλικού ασβεστίου σχετίζεται πιθανόν με μηχανισμούς οσμωρύθμισης (Raven and Smith, 1976). Τα ιόντα ασβεστίου και οξαλικού που παίρνουν μέρος στη δημιουργία των κρυστάλλων ουσιαστικά «αποσύρονται από την κυκλοφορία» και δεν είναι πλέον οσμωτικά ενεργά. Το αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση αποδόμησης των κρυστάλλων.
- ε)** Στο παρελθόν έχουν επίσης διατυπωθεί υποθέσεις για πιθανή σχέση κρυστάλλων που εντοπίζονται σε φωτοσυνθετικά κύτταρα με τη φωτοσυνθετική λειτουργία

(Franceschi and Horner, 1980), χωρίς ωστόσο να συνοδεύονται από πειραματικά δεδομένα.

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

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

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



**Εικόνα 5.** Ιδιοβλάστες από φύλλα του φυτού *Cercidium* sp.

### 2.3. Χαρακτηριστικά των λιθοκύστεων των φύλλων του φυτού *Parietaria judaica*.

Το φυτό *P.judaica*, εμφανίζει τις λιθοκύστες μόνο στην προσαξονική επιφάνεια των φύλλων του. Η διάμετρός τους κυμαίνεται μεταξύ 40-50μm και η μορφή τους εμφανίζεται ως εξαγωνική. Η συχνότητα των λιθοκύστεων είναι  $52\pm 3/\text{mm}^2$  (Γκιάφη, 2003). Σε εγκάρσιες τομές φύλλων του φυτού με το οπτικό μικροσκόπιο παρατηρείται ο μίσχος και το κυτταρικό περίβλημα του κυστόλιθου ενώ το δρυφρακτοειδές και το σπογγώδες παρέγχυμα παρουσιάζονται ιδιαίτερα αραιά. Η λιθοκύστη δεν φαίνεται να διαθέτει χυμοτόπιο, και το ρόλο του φαίνεται να παίζει ο ίδιος ο κυστόλιθος, ενώ το υπόλοιπο του πρωτοπλάστη καταλαμβάνεται από το κυτόπλασμα, το οποίο περιέχει μιτοχόνδρια, πλαστίδια κ.α. Στο εξωτερικό περίβλημα των κυστόλιθων εντοπίζεται λιγνίνη. Σε απομονωμένους κυστόλιθους είναι ιδιαίτερα εμφανή τα επάρματα στην επιφάνεια τους.

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

Στο φυτό *P.judaica* η λιθοκύστη διαφέρει από αυτή άλλων φυτών ως προς την παρουσία εφουμενίδας στο εξωτερικό κυτταρικό τοίχωμα και την απουσία θηλής από αυτό.

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

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

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

όπου  $({}^{13}\text{C} / {}^{12}\text{C})_{\text{PDB}} = 0.0112371$  (Craig, H. 1957).

και PDB = Pee Dee Belemnite (*Belemnitella americana*).

(Brugnoli, E. and Farquhar, G.D. 2000, Livingston, N.J., Spittlehouse, D.L. 1996)

Πρόκειται για δείγμα αναφοράς που προέρχεται από ιζηματογενή σχηματισμό στη Νότια Καρολίνα των Η.Π.Α. Η αναλογία  $({}^{13}\text{C} / {}^{12}\text{C})_{\text{PDB}}$  χρησιμοποιείται ως σταθερά, βάση της οποίας υπολογίζεται η σύσταση οποιουδήποτε εξεταζόμενου δείγματος στο σταθερό ισότοπο  $^{13}\text{C}$ . Η αναλογία  $^{13}\text{C} / {}^{12}\text{C}$  του δείγματος μετριέται με τη βοήθεια φασματομέτρου μάζας αναλογίας ισotόπων (Isotope Ratio Mass Spectrometer, IRMS) (Fotelli, M.N., Rennenberg, H., Holst, T., Mayer, H., and Geßler, A. 2003, O'Realy, M.H. 1981).

Σύμφωνα με τις παραπάνω προδιαγραφές, το  $\delta^{13}\text{C}$  του ατμοσφαιρικού  $\text{CO}_2$  υπολογίζεται σε -8 ‰. Ακόμη, η σύσταση των  $\text{C}_3$  φυτών σε  $^{13}\text{C}$  κυμαίνεται μεταξύ - (25-30) ‰, των  $\text{C}_4$  φυτών μεταξύ -(12-15) ‰ και των CAM φυτών μεταξύ -(12-28) ‰ (Brugnoli, E. and Farquhar, G.D. 2000, Farquhar, G.D., Farquhar, G.D., Ehleringer, J.R. and Hubick, K.T. 1989, Lawlor, D.W. 2001). Το αρνητικό πρόσημο των παραπάνω

τιμών υποδηλώνει ότι τόσο το CO<sub>2</sub> του ατμοσφαιρικού αέρα όσο και οι φυτικοί ιστοί είναι ελλειμματικοί σε <sup>13</sup>C εν συγκρίσει με το δείγμα αναφοράς PDB (Lawlor, D.W. 2001, O'Realy, M.H. 1981).

Η διαφορά στο δ<sup>13</sup>C μεταξύ της ατμόσφαιρας και της φυτικής βιομάζας οφείλεται στο γεγονός ότι το <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>, λόγω του βαρύτερου ισότοπου άνθρακα το οποίο φέρει, διαθέτει διαφορετικές θερμοδυναμικές και κινητικές ιδιότητες έναντι του <sup>12</sup>CO<sub>2</sub> (Fotelli, M.N., Evans, J.R. and Loreto, F. 2000, Ghashghaie, et al., 2001). Κατά συνέπεια η διάχυσή του <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> στους μεσοκυττάριους χώρους είναι δυσχερέστερη σε σχέση με το <sup>12</sup>CO<sub>2</sub>. Επίσης, η παραπάνω διαφορά σχετίζεται με τη διάκριση εις βάρος του <sup>13</sup>C (Δ<sup>13</sup>C, Discrimination) που παρατηρείται στη φάση της καρβοξυλίωσης, κατά τη φωτοσύνθεση από τα ένζυμα RubisCO και PEPCase στα C<sub>3</sub> και C<sub>4</sub> φυτά. Τόσο η RubisCO, όσο και η PEPCase παρουσιάζουν υψηλότερη συγγένεια προς το <sup>12</sup>C ισότοπο, συνεπώς αφομοιώνουν ευχερέστερα το <sup>12</sup>CO<sub>2</sub> έναντι του <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> (Fotelli, M.N., Farquhar, G.D., Ehleringer, J.R. and Hubick, K.T. 1989).

Ως αποτέλεσμα, οι φυτικοί ιστοί στους οποίους ενσωματώνονται τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης είναι εμπλουτισμένοι σε <sup>12</sup>C, σε σύγκριση με τον ατμοσφαιρικό αέρα (Farquhar, G.D., Farquhar, G.D., Ehleringer, J.R. and Hubick, K.T. 1989, Lawlor, D.W. 2001).

Η διάκριση αυτή παρουσιάζεται πολύ εντονότερη στα C<sub>3</sub> από ότι στα C<sub>4</sub> φυτά, λόγω της υψηλότερης Δ<sup>13</sup>C από την οποία χαρακτηρίζεται η RubisCO (29 ‰) σε σύγκριση με την PEPCase (5,7 ‰). Επίσης, η συσσώρευση CO<sub>2</sub> στα κύτταρα του μεσοφύλλου ευνοεί την αφομοίωση του <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> στα C<sub>4</sub> φυτά (Farquhar, G.D., Farquhar, G.D., Ehleringer, J.R. and Hubick, K.T. 1989, Lawlor, D.W. 2001).

Τα παραπάνω εξηγούν και τις μικρότερες (περισσότερο αρνητικές) τιμές δ<sup>13</sup>C των C<sub>3</sub> φυτών σε σχέση με αυτές των C<sub>4</sub> φυτών.

Λόγω της διαφορετικής συμπεριφοράς των δύο σταθερών ισότοπων του C κατά τη φωτοσύνθεση, η σύσταση φυτικών ιστών στο <sup>13</sup>C ισότοπο (δ<sup>13</sup>C) αποτελεί δείκτη που παρέχει πολυποίκιλες πληροφορίες σχετικά με τη φυσιολογία και οικοφυσιολογία των φυτών, από επίπεδο κυττάρου έως και ολόκληρου οικοσυστήματος. Μέσω μαθηματικών τύπων στους οποίους εμπλέκεται και η τιμή δ<sup>13</sup>C μπορούν να εξαχθούν σημαντικές πληροφορίες για την φυσιολογική κατάσταση ιστών και οργάνων. Μέσω μαθηματικών τύπων στους οποίους εμπλέκεται και η τιμή

$\delta^{13}\text{C}$  μπορούν να εξαχθούν σημαντικές πληροφορίες για την φυσιολογική κατάσταση ιστών και οργάνων. Ένα τέτοιος τύπος έχει περιγραφεί από τους Farquhar et al (1989):

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

όπου

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

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

*C<sub>i</sub>*: η συγκέντρωση του  $\text{CO}_2$  στους εσωκυττάριους χώρους

*C<sub>a</sub>*: η συγκέντρωση του ατμοσφαιρικού  $\text{CO}_2$

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

Σε πολλές περιπτώσεις οι μεταβολές του  $\delta^{13}\text{C}$  φυτικών ιστών σχετίζονται με ορισμένες περιβαλλοντικές παραμέτρους, όπως η ηλιακή ακτινοβολία, η επάρκεια σε θρεπτικά συστατικά, το υψόμετρο, καθώς με τα ιδιαίτερα ανατομικά χαρακτηριστικά των φυτών. Εκτός αυτού, έχουν αναφερθεί διαφορές στη φυσική σύσταση  $\delta^{13}\text{C}$  μεταξύ μεταβολιτών, όπως επίσης και μεταξύ οργάνων του ίδιου φυτού. Οι διαφορές  $\delta^{13}\text{C}$  μεταξύ φυτικών οργάνων φαίνεται ότι οφείλονται σε παράγοντες όπως η μεταφορά μεταβολιτών μέσω του ηθμού και πιθανώς η διάκριση  $\Delta^{13}\text{C}$  κατά την αναπνοή, η οποία ενδέχεται να ποικίλει μεταξύ των επιμέρους οργάνων. Σε αντιδιαστολή με την παλαιότερη πεποίθηση ότι δεν παρατηρείται διάκριση  $\Delta^{13}\text{C}$



κατά τη νυχτερινή αναπνοή και τη φωτοαναπνοή και επομένως το  $\delta^{13}\text{C}$  του  $\text{CO}_2$  που αποβάλλεται από το φυτό είναι παρόμοιο σε ισοτοπική σύσταση με αυτό της βιομάζας, νεότερες μελέτες υποστηρίζουν το αντίθετο. Παρά τις διαφορές, ανάλογα με τον μεταβολίτη που χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την αναπνοή, το  $\text{CO}_2$  που αποβάλλεται κατά την αναπνοή είναι εμπλουτισμένο κατά κανόνα σε  $^{13}\text{C}$ , εν συγκρίσει με το υπόστρωμα της αναπνοής ή την βιομάζα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του  $\delta^{13}\text{C}$  των φύλλων προς περισσότερο αρνητικές τιμές.



## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Λαμβάνοντας υπόψη ότι **α.** μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν επαρκή πειραματικά δεδομένα ώστε να δοθεί ικανοποιητική ερμηνεία για τη φυσιολογική σημασία των κυστολίθων που εντοπίζονται σε κότταρα ανώτερων φυτών και **β.** το ρόλο τον οποίο επιτελούν ανάλογες δομές σε φωτοσυνθετικούς πλαγκτονικούς μικροοργανισμούς, θα μπορούσε να διατυπωθεί υπόθεση εργασίας, σύμφωνα με την οποία οι κυστόλιθοι *διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαχείριση του ανόργανου άνθρακα των φωτοσυνθετικών ιστών.* Το άμορφο ανθρακικό ασβέστιο που εναποτίθεται στις δομές αυτές θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει μια δεξαμενή ανθρακικών ιόντων τα οποία κάτω από κατάλληλες συνθήκες προκύπτουν από τη διάσπαση του  $\text{CaCO}_3$  και είναι διαθέσιμα προς αφομοίωση από την καρβοξυλάση-οξυγενάση της διφωσφοροριβουλόζης (Rubisco). Σε συνθήκες “πενίας” άνθρακα, όταν π.χ. τα στομάτια παραμένουν κλειστά στη διάρκεια της ημέρας λόγω αντίξοων συνθηκών (επικράτηση ισχυρών ανέμων για μεγάλα χρονικά διαστήματα ή υδατική καταπόνηση) η διάσπαση του ανθρακικού ασβεστίου των κυστολίθων θα μπορούσε να προμηθεύσει το αναγκαίο  $\text{CO}_2$  για την απρόσκοπτη λειτουργία του κύκλου του Calvin, χωρίς να παραστεί ανάγκη να ανοίξουν τα στομάτια και να λάβει χώρα απώλεια νερού. Το έναυσμα για τη διάσπαση των κυστολίθων θα μπορούσε ενδεχομένως να δίδεται από το αμπισικό οξύ (ABA), το ορμονικό σήμα που, ως γνωστόν, προκαλεί κλείσιμο των στοματιών. Εάν αρθούν οι δυσμενείς συνθήκες, ή κατά τη διάρκεια της νύκτας όπου πλέον η φωτοσύνθεση δεν λειτουργεί, ξεκινά και η διαδικασία επαναδημιουργίας του κυστολίθου. *Προτείνεται λοιπόν ότι οι κυστόλιθοι αποτελούν ένα δυναμικό σύστημα αποθήκευσης και διαχείρισης κυρίως ανόργανου άνθρακα παρά ασβεστίου.*

Η παρούσα εργασία κλήθηκε να απαντήσει στα ακόλουθα ερωτήματα:

1. Ποιά είναι η καταλληλότερη μέθοδος απομόνωσης και μέτρησης των διαστάσεων των κυστολίθων;
2. Κάτω από ποιές συνθήκες αποδομούνται οι κυστόλιθοι;
3. Από ποιους παράγοντες επηρεάζεται το μέγεθος των κρυστάλλων και υπό ποιες συνθήκες αποδομούνται;

4. Ποια η προέλευση του άνθρακα που χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση του οξαλικού των κρυστάλλων;
5. Ποια η σύσταση των κρυστάλλων και των φυτικών ιστών σε  $^{13}\text{C}$ ;

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.1. Το φυτικό υλικό.

Ως πειραματόφυτα χρησιμοποιήθηκαν φυτά του είδους *Parietaria judaica*. Για τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις και για τα πειράματα με τους δίσκους φύλλων συλλέχτηκαν φύλλα από τις εγκαταστάσεις του Γ.Π.Α., όπως και φύλλα από φυτά που αναπτύχθηκαν σε γλάστρες. Τα φυτά αναπτύχθηκαν από μοσχεύματα που πάρθηκαν από φυτά ανεπτυγμένα ως ζιζάνια στον αγρό του Γ.Π.Α. και ποτίστηκαν με διάλυμα Hoagland-Arnon ημίσις συγκέντρωσης μέχρι να αναπτυχθούν επαρκώς. Για τα πειράματα υδατικής καταπόνησης στον θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών χρησιμοποιήθηκαν νεαρά φυτά ανεπτυγμένα σε γλάστρες σε υπόστρωμα το οποίο αποτελείται κατά 1/3 από μαρμαρόσκονη και 2/3 από χώμα. Για την επιτυχή ριζοβολή των μοσχευμάτων οι αποκομμένοι βλαστοί εμβαιπίστηκαν σε ορμόνη ριζοβολίας.

### 3.2. Μέτρηση των διαστάσεων των κυστόλιθων.

Για την μέτρηση των διαστάσεων των κυστόλιθων χρησιμοποιήθηκαν νωπά δείγματα από τα οποία ελήφθησαν δίσκοι γνωστής διαμέτρου. Οι δίσκοι τοποθετήθηκαν σε υδατικό διάλυμα χλωρίνης (1:1) προς αποχρωματισμό και πάρθηκαν μικροφωτογραφίες σε οπτικό μικροσκόπιο Zeiss AxioLab (Carl Zeiss, Jena, Germany) με τη χρήση ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής SONY DSC75-S (SONY Corp., Tokyo, Japan). Η μέτρηση των διαστάσεων των κυστόλιθων έγινε με χρήση του προγράμματος επεξεργασίας εικόνας Image Pro, Version S.1.0.200 (Media Cybernetics). Η μέτρηση γίνεται αυτόματα σε pixel με χρήση φίλτρων και απλών κριτηρίων (στρογγυλότητα, μέγιστη διάμετρος, κ.λ.π.) και επεξεργασία εικόνας ώστε να διαχωρίζονται οι κυστόλιθοι από τυχόν θόρυβο που παρουσιάζει η μικροφωτογραφία.

### 3.3. Απομόνωση κρυστάλλων.

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

### 3.4. Ανάλυση φθορισμού χλωροφύλλης.

Τμήματα φύλλων του είδους *P. Judaica* τοποθετημένα σε αυτοσχέδιες κυβέτες τοποθετούνται σε μικροσκόπιο φθορισμού: Zeiss Axiostar plus ( φακός Zeiss 20x Fluor), φωτεινή πηγή LED IMAG-L450 (Walz), κάμερα IMAG-MAX/K4 (Walz) φθορισμόμετρο Imaging PAM M-Series, πρόγραμμα ImagingWin v2.40b. Στην κυβέτα διοχετεύονται μίγματα αερίων διαφορετικών συγκεντρώσεων, τα οποία παρέχονται από ένα σύστημα μίξης αερίων (Qubit Systems Inc.) με πέντε διαφορετικά ροόμετρα:

1. Αζώτου (1ml/min)
2. Οξυγόνου (200ml/min)
3. Οξυγόνου (20ml/min)
4. Διοξειδίου του άνθρακα (200ml/min)
5. Διοξειδίου του άνθρακα (2ml/min)

Η μίξη των αερίων πραγματοποιείται με χρήση του προγράμματος G400 Gas Mixing System.

Με χρήση των ροομέτρων πραγματοποιήθηκαν οι επιθυμητές αλλαγές στην σύσταση των αερίων που διοχετεύονταν στην κυβέτα. Αρχικά μειώθηκε η

συγκέντρωση του οξυγόνου στο 1%, ώστε να καταστέλλεται η φωτοαναπνοή και να διασφαλίζεται ότι δεν υπάρχει κατανάλωση ενέργειας για αναγωγή του οξυγόνου. Όταν επέλθει σταθεροποίηση της λειτουργίας του φωτοσυστήματος II, μηδενίζεται η συγκέντρωση CO<sub>2</sub> ώστε να παρατηρηθούν ενδεχόμενες διαφορές μεταξύ μαρτύρων και δειγμάτων στα οποία έχει γίνει επέμβαση με ABA. Σύμφωνα με την υπόθεση, ο χειρισμός με ABA προκαλεί κλείσιμο των στοματιών και επάγει την αποδόμηση των κυστόλιθων, άρα η διαδικασία της φωτοσύνθεσης θα πρέπει να συνεχίζεται κανονικά. Αναμένεται λοιπόν η φωτοσυνθετική ικανότητα να παραμένει υψηλότερη σε περιοχές κοντά στον κυστόλιθο σε σχέση με πιο απομακρυσμένες θέσεις στο δείγμα. Στους μάρτυρες δεν αναμένεται να υπάρχει αυτή η διαφορά στη χρονική διάρκεια της μέτρησης καθώς δεν προϋπήρχε επίδραση ABA και τα στομάτια παραμένουν ανοιχτά, ενώ δεν έχει δοθεί σήμα για αποδόμηση των κρυστάλλων.

Στη συνέχεια τα δείγματα φωτίζονται σε επιφάνεια πολύ μεγαλύτερη από την επιφάνεια μέτρησης ώστε να καταναλωθεί το CO<sub>2</sub> των μεσοκυττάρων χώρων και να αποφευχθεί η πλάγια διάχυση CO<sub>2</sub> προς την περιοχή μέτρησης από γειτονικές περιοχές.

Κατόπιν απομακρύνεται η φωτεινή πηγή και ως μόνη πηγή διέγερσης των φωτοσυστημάτων λειτουργεί το ακτινικό φως.

Σύμφωνα με την υπόθεση θα πρέπει στα δείγματα στα οποία έχει προηγηθεί χειρισμός με ABA να υπάρχει κινητοποίηση των αποθεμάτων CO<sub>2</sub> και κατά συνέπεια η φωτοχημική απόδοση του PS II και οι παράμετροι μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού της χλωροφύλλης στα φύλλα στα οποία έχει προηγηθεί χειρισμός με ABA να μη παρουσιάζουν σημαντική απόκλιση σε σχέση με αυτές των φύλλων υπό κανονικές ατμοσφαιρικές συνθήκες.

Εάν υπάρχει κινητοποίηση του CO<sub>2</sub> από τον κυστόλιθο αναμένεται διαβάθμιση αυτών των παραμέτρων κατά μήκος της απόστασης από τον κρύσταλλο και προς τα απομακρυσμένα κύτταρα του μεσόφυλλου.

Τέλος επαναφέρουμε τις συγκεντρώσεις O<sub>2</sub> και CO<sub>2</sub> στις αρχικές τους τιμές ώστε να δειχθεί ότι η παρατηρούμενη κινητική στις παραμέτρους οφείλεται σε αλλαγές της σύστασης του αέρα και όχι σε μόνιμη παρεμπόδιση της φωτοσυνθετικής συσκευής.

Ανεξαρτήτως του χειρισμού με διαφορετικό μίγμα αερίων, τα δείγματα παραμένουν για χρονικό διάστημα 15 λεπτών στο σκοτάδι, έτσι ώστε η κιννόνη A να είναι πλήρως οξειδωμένη και τα ενεργά κέντρα των φωτοσυστημάτων II «ανοιχτά».

Η φωτοχημική οδός είναι «εν δυνάμει» μέγιστη ενώ οι μη-φωτοχημικές διεργασίες είναι ανεργές. Στη συνέχεια διοχετεύεται μη-ακτινικό φως, διαφορετικής έντασης από το ακτινικό φως, ώστε η κιννόνη A να παραμένει οξειδωμένη. Αυτή η ακτινοβολία μέτρησης (Measuring light, ML) όπως ονομάζεται, έχει μήκος κύματος 650nm περίπου. Εάν σε ένα δείγμα εφαρμόσουμε το φως μέτρησης θα καταγράψουμε τον «φθορισμό βάσης» ( $F_0$ ). Ακολουθεί μια πολύ υψηλής έντασης ακτινοβολία κορεσμού (Saturation Pulse SP), η οποία εφαρμόζεται για πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (μικρότερο του 1s), με σκοπό την πλήρη αναγωγή (κλείσιμο) των φωτοσυστημάτων II. (Φασματική περιοχή 380 - 750nm). Η εφαρμογή ενός παλμού κορεσμού αρχίζει να κλείνει τα φωτοσυστήματα, με αποτέλεσμα την άνοδο του επιπέδου φθορισμού έως ένα πλατώ, το οποίο διατηρείται για όσο συνεχίζεται η αναγωγή των φωτοσυστημάτων και των πρωταρχικών δεκτών ηλεκτρονίων. Παρατηρείται απότομη άνοδος του φθορισμού στην ανώτατη δυνατή τιμή, η οποία αναφέρεται ως μέγιστος φθορισμός ( $F_m$ ). Η πύση του παλμού κορεσμού έχει ως συνέπεια την πτώση του φθορισμού λόγω φωτοχημικής απόσβεσης, καθώς η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων αρχίζει να λειτουργεί αποσβεστικά. Η εκπομπή φθορισμού επανέρχεται στα επίπεδα του  $F_0$  καθώς όλα τα φωτοσυστήματα έχουν οξειδωθεί ξανά. Η θεμελιώδης ή δυνητική φωτοχημική ικανότητα του PS II ( $\Phi_{PSII} = (F_m - F_0) / F_m$ ) αποτελεί ένα μέτρο της ικανότητας του PS II να απορροφά την ενέργεια της ακτινοβολίας και να προωθεί με αυτή τη φωτοχημική ροή ηλεκτρονίων. Τέλος, τα δείγματα δέχονται ακτινικό φως, το οποίο έχει φωτοχημικό αποτέλεσμα, καθώς πρόκειται για δραστική ακτινοβολία, η οποία μπορεί να ενεργοποιήσει την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Το μήκος κύματος ποικίλει.

Οι βασικές παράμετροι που χρησιμοποιούνται κατά την ανάλυση του φθορισμού της χλωροφύλλης είναι οι εξής:

**$F_0$ , Βασικός φθορισμός.** Αντιστοιχεί στην ικανότητα ροής ενέργειας από την φωτοσυλλεκτική αντέννα προς το κέντρο αντίδρασης του PS II.

**$F_m$ , Μέγιστος φθορισμός.** Είναι ένα μέτρο της συνολικής ροής ενέργειας διαμέσου του PS II.

**$F_v$ , Μεταβλητός φθορισμός ( $F_m - F_0$ ).** Αντιστοιχεί στην ροή ενέργειας από το κέντρο αντίδρασης του PS II προς την φωτοχημική αλυσίδα.



$F_v/F_m=(F_m-F_o)/F_m=\Phi_{PSII}$ , **Δυναμική φωτοχημική ικανότητα του PSII**. Αντιστοιχεί στο μέγιστο δυνατό ποσοστό της ενέργειας το οποίο μπορεί να οδεύσει προς την φωτοχημική αλυσίδα ως προς το συνολικό ποσό ενέργειας που απορροφά το PS II.

$qP=(F'_m-F_s)/(F'_m-F'_o)$ , **Συντελεστής φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού**. Αντιστοιχεί στο ποσοστό των ανοικτών φωτοχημικών κέντρων PS II. Το συμπληρωματικό μέτρο  $1-qP$  αντιστοιχεί στο ποσοστό των φωτοχημικών κέντρων τα οποία είναι κλειστά και αναφέρεται επίσης ως ενεργειακή πίεση ή πίεση διέγερσης επί του PS II.

$qN=(F_m-F'_m)/(F_m-F'_o)$ , **Συντελεστής μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού**. Αντιστοιχεί στο ποσοστό της ενέργειας το οποίο οδεύει προς διεργασίες μη-φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας που απορροφά το PS II για δεδομένη ένταση φωτός.

$NPQ=(F_m-F'_m)/F'_m$ , **Παράμετρος μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού**. Αποτελεί εναλλακτική έκφραση του ποσοστού της ενέργειας το οποίο αποσβένεται μη-φωτοχημικά.

### 3.5. Πείραμα υδατικής καταπόνησης.

Νεαρά φυτά *P. judaica* ανεπτυγμένα σε γλάστρες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών (φωτοπερίοδος 14/10 h, θερμοκρασία 25/20°C, ένταση φωτισμού 300  $\mu\text{mole}/\text{m}^2\text{ s}$ ). Μετά τον εγκλιματισμό τους στις νέες συνθήκες (μετά από δέκα ημέρες) τα φυτά χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Η μία ομάδα περιελάμβανε τα φυτά μάρτυρες τα οποία ποτίζονταν κάθε 48 ώρες, ενώ η δεύτερη ομάδα περιελάμβανε φυτά τα οποία αφέθηκαν απότιστα. Στο διάστημα αυτό λαμβάνονταν μετρήσεις στις διαστάσεις των κυστόλιθων. Παράλληλα καταγραφόταν στα αντίστοιχα δείγματα η αγωγιμότητα των στοματίων με πορόμετρο τύπου PMR-5 Steady State Porometer (PP- Systems, Amesbury, MA, U.S.A.). Μετρήθηκε η σύσταση φυτικών ιστών και από τις δύο ομάδες (ποτισμένα/ απότιστα) στο  $^{13}\text{C}$  ισότοπο ( $\delta^{13}\text{C}$ ). Οι τιμές του  $\delta^{13}\text{C}$  προσδιορίστηκαν από την ακόλουθη σχέση (O'Realy, M.H. 1981, Winter, K., *et al*, 2005):

$$\delta^{13}\text{C} \% = [({}^{13}\text{C} / {}^{12}\text{C})_{\text{δείγμ.}} / ({}^{13}\text{C} / {}^{12}\text{C})_{\text{PDB}} - 1] * 1000$$

### 3.6. Επίδραση του ABA σε δίσκους φύλλων *Parietaria judaica*.

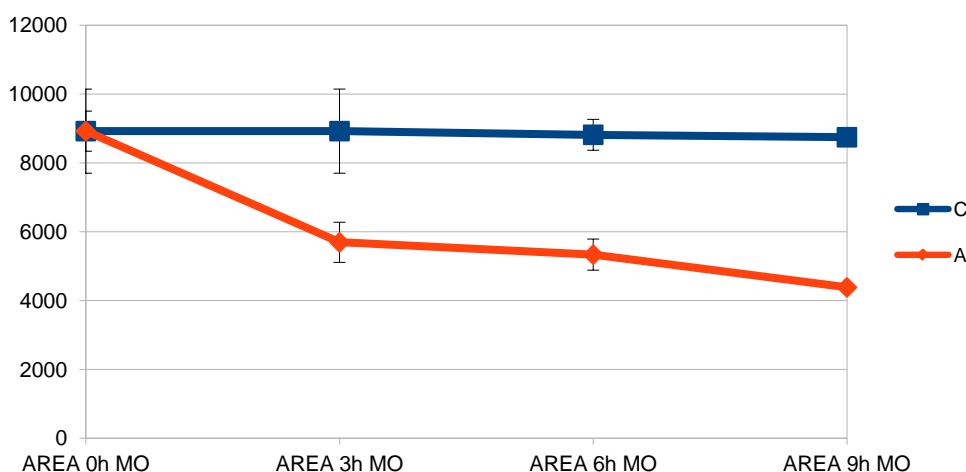
Φύλλα του είδους *P. Judaica* τοποθετήθηκαν σε τρυβλία (4 ανά τρυβλίο). Τα μισά τρυβλία περιείχαν διάλυμα SAP (μάρτυρας) και τα υπόλοιπα διάλυμα ABA 250μM). Οι δίσκοι επέπλεαν στο αντίστοιχο διάλυμα. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε ένταση φωτισμού 50  $\mu\text{mole/ m}^2 \text{ s}$ . Ανά τακτά χρονικά διαστήματα καταγραφόταν η αγωγιμότητα των στοματίων με πορόμετρο τύπου PMR-5 Steady State Porometer (PP- Systems, Amesbury, MA,U.S.A.) και λαμβάνονταν φύλλα, προς έλεγχο της φωτοσυνθετικής τους απόδοσης με τη μέθοδο του φθορισμού. Παράλληλα λαμβάνονταν δίσκοι, οι οποίοι αποχρωματιζόνταν σε διάλυμα χλωρίνης. Στη συνέχεια στους δίσκους αυτούς μετρήθηκε το μέγεθος των κυστόλιθων με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1. Μέτρηση των διαστάσεων των κρυστάλλων.

Θεωρήσαμε πιθανό ότι η αποδόμηση των κυστόλιθων εντείνεται σε περιόδους κατά τις οποίες τα στομάτια παραμένουν κλειστά και επομένως δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί ανταλλαγή αερίων. Προκειμένου να διαπιστώσουμε το αληθές της υπόθεσης αυτής εφαρμόσαμε σε φύλλα του πειραματόφυτου διάλυμα αμπισοικού οξέος (ABA) 250  $\mu\text{M}$ . Ως γνωστόν το ABA είναι φυτορμόνη η οποία επάγει το κλείσιμο των στοματίων. Ανά τρεις ώρες και κατόπιν καταγραφής της αγωγιμότητας των φύλλων με πορόμετρο, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν τα στομάτια ήταν ανοιχτά ή κλειστά, λαμβάνονταν δίσκοι. Ακολουθούσε αποχρωματισμός με διάλυμα χλωρίνης, λήψη μικροφωτογραφιών και επεξεργασία εικόνας Image Pro, Version S.1.0.200 (βλ. Υλικά και Μέθοδοι).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ABA προκάλεσε μερική αποδόμηση των κυστόλιθων, γεγονός που καταγράφηκε ως μείωση της επιφάνειάς τους, ενώ οι κυστόλιθοι στους δίσκους από φύλλα-μάρτυρες τα οποία επέπλεαν σε διάλυμα SAP διατήρησαν τις αρχικές διαστάσεις τους καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (εικόνα 6).



**Εικόνα 6.** Συγκριτική απεικόνιση της επιφάνειας των κυστόλιθων σε pixels από φύλλα σε SAP (C) και ABA (A) αντίστοιχα τρεις, έξι και εννέα ώρες μετά την τοποθέτηση σε τρυβλία.

#### 4.2. Μετρήσεις με Isotope Ratio Mass Spectrometer (IRMS).

Τα αποτελέσματα προηγούμενων πειραμάτων της ερευνητικής ομάδας είχαν δώσει ισχυρές ενδείξεις ότι ο άνθρακας των εγκλείστων οξαλικού ασβεστίου δεν είχε ατμοσφαιρική προέλευση. Θελήσαμε λοιπόν να διελευκάνουμε και τη προέλευση του άνθρακα που ενσωματώνεται στους κυστόλιθους του *P. judaica*. Επίσης διερευνήσαμε εάν η υδατική καταπόνηση προκαλεί μεταβολές στην ισοτοπική σύσταση των κυστόλιθων. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων από στοιχειακό αναλυτή σε ιστούς φυτών και σε κρυστάλλους των πειραματικών χειρισμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Δείγματα		Χειρισμός	$\delta^{13}\text{C}$
Κρυστάλλοι	Χρόνος 0	Φυτά τα οποία ποτίζονται	-11,13
		Φυτά τα οποία παραμένουν απότιστα	-11,57
	Μετά από 6 ημέρες υδατικής καταπόνησης	Φυτά τα οποία ποτίζονται	-8,97
		Φυτά τα οποία θα παραμένουν απότιστα	-10,71
Βιομάζα	Χρόνος 0	Φυτά τα οποία ποτίζονται	-28,26
		Φυτά τα οποία θα παραμένουν απότιστα	-26,79
	Μετά από 6 ημέρες υδατικής καταπόνησης	Φυτά τα οποία ποτίζονται	-30,31
		Φυτά τα οποία θα παραμείνουν απότιστα	-30,51

**Πίνακας 1.** Μετρήσεις της σύστασης φυτικών ιστών στο  $\delta^{13}\text{C}$  ισότοπο ( $\delta^{13}\text{C}$ ) με Isotope Ratio Mass Spectrometer.

Παρατηρούμε ότι οι τιμές του  $\delta^{13}\text{C}$  μεταξύ των πειραματικών χειρισμών δεν διαφέρουν σημαντικά. Ωστόσο παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ των

τιμών του  $\delta^{13}\text{C}$  της βιομάζας και των κρυστάλλων. Οι κρύσταλλοι έχουν λιγότερο αρνητικές τιμές γεγονός που υποδηλώνει την διαφορετική προέλευση του άνθρακα των κρυστάλλων.

#### 4.3. Ανάλυση φθορισμού χλωροφύλλης.

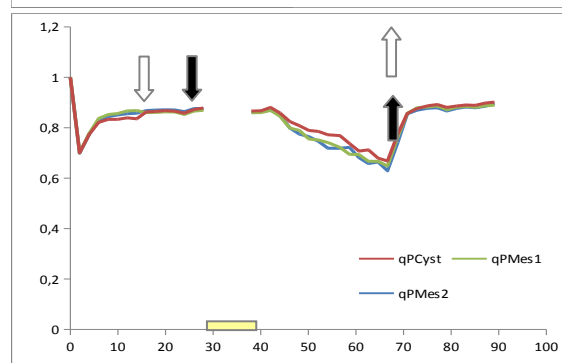
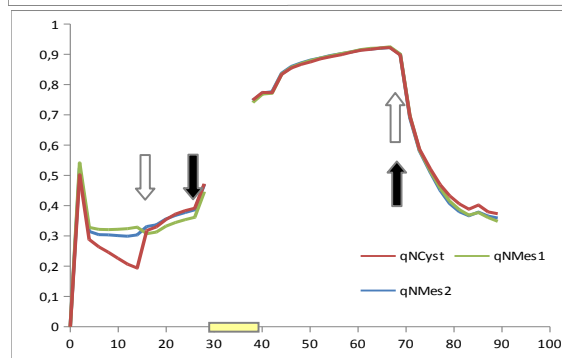
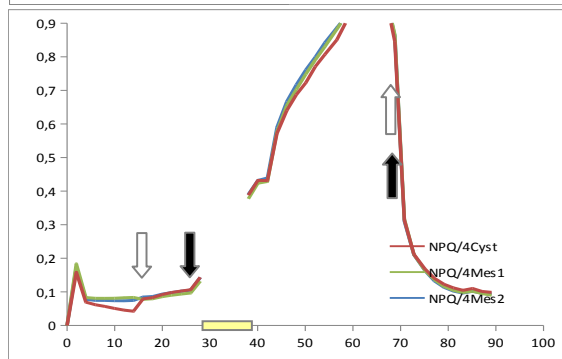
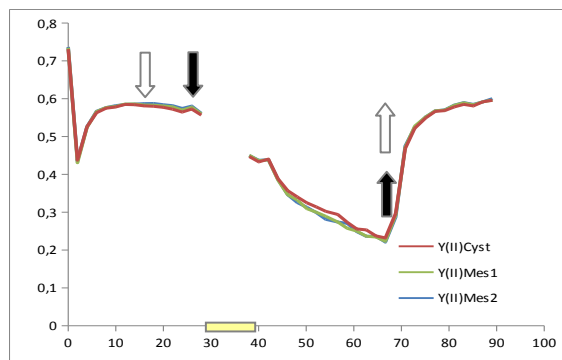
Προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν σε συνθήκες κατά τις οποίες τα στομάτια παραμένουν κλειστά ο άνθρακας που απελευθερώνεται από τους κυστόλιθους υποστηρίζει μια στοιχειώδη φωτοσυνθετική δραστηριότητα, δίσκοι φύλλων-μαρτύρων και φύλλων τα οποία είχαν απορροφήσει ABA εξετάστηκαν σε μικροσκόπιο εφοδιασμένο με φθορισμόμετρο χλωροφύλλης σε διαφορετικές συνθήκες σύστασης της περιβάλλουσας ατμόσφαιρας.

Στα διαγράμματα που ακολουθούν φαίνονται οι αλλαγές στην δυνητική φωτοχημική ικανότητα του PSII (Yield), την παράμετρο μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού (NPQ), στον συντελεστή μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού (qN), τον συντελεστή φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού (qP) κατά δύο πειραματικές διαδικασίες μελέτης της επίδρασης ABA σε φύλλα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 3.7.

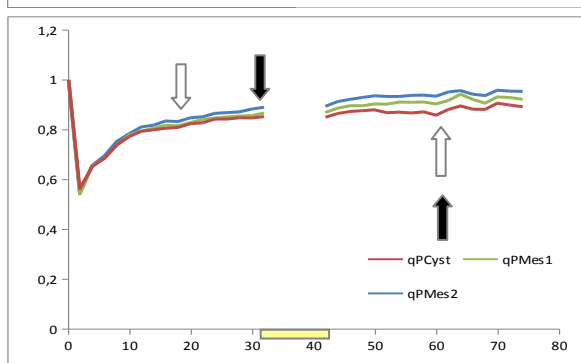
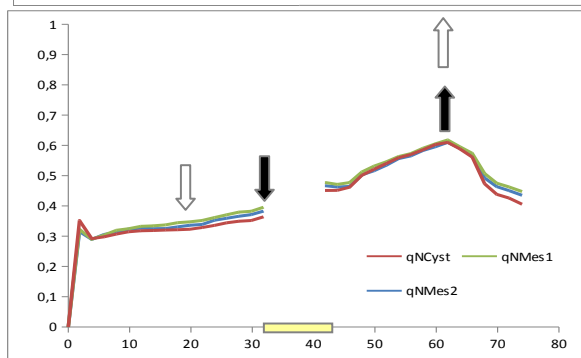
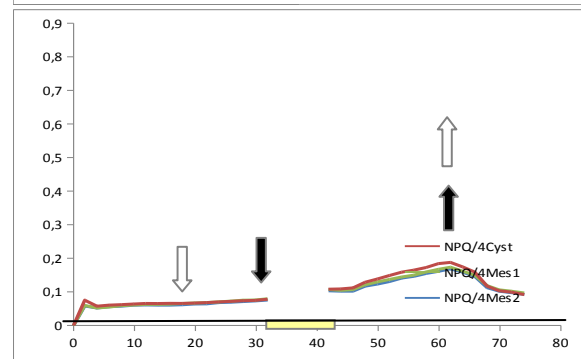
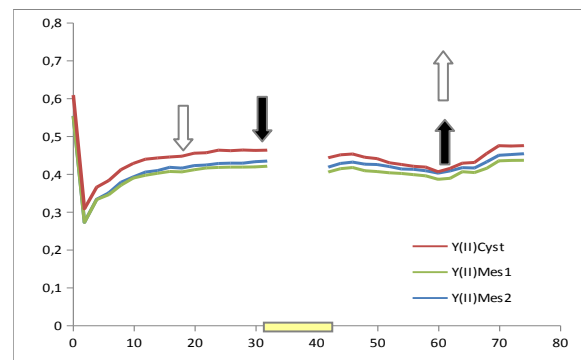
Τα κενά που παρουσιάζονται στις καμπύλες οφείλονται στο γεγονός ότι δεν πάρθηκε μέτρηση κατά τη δεδομένη χρονική στιγμή διότι άλλαξε το είδος του ακτινικού φωτός.

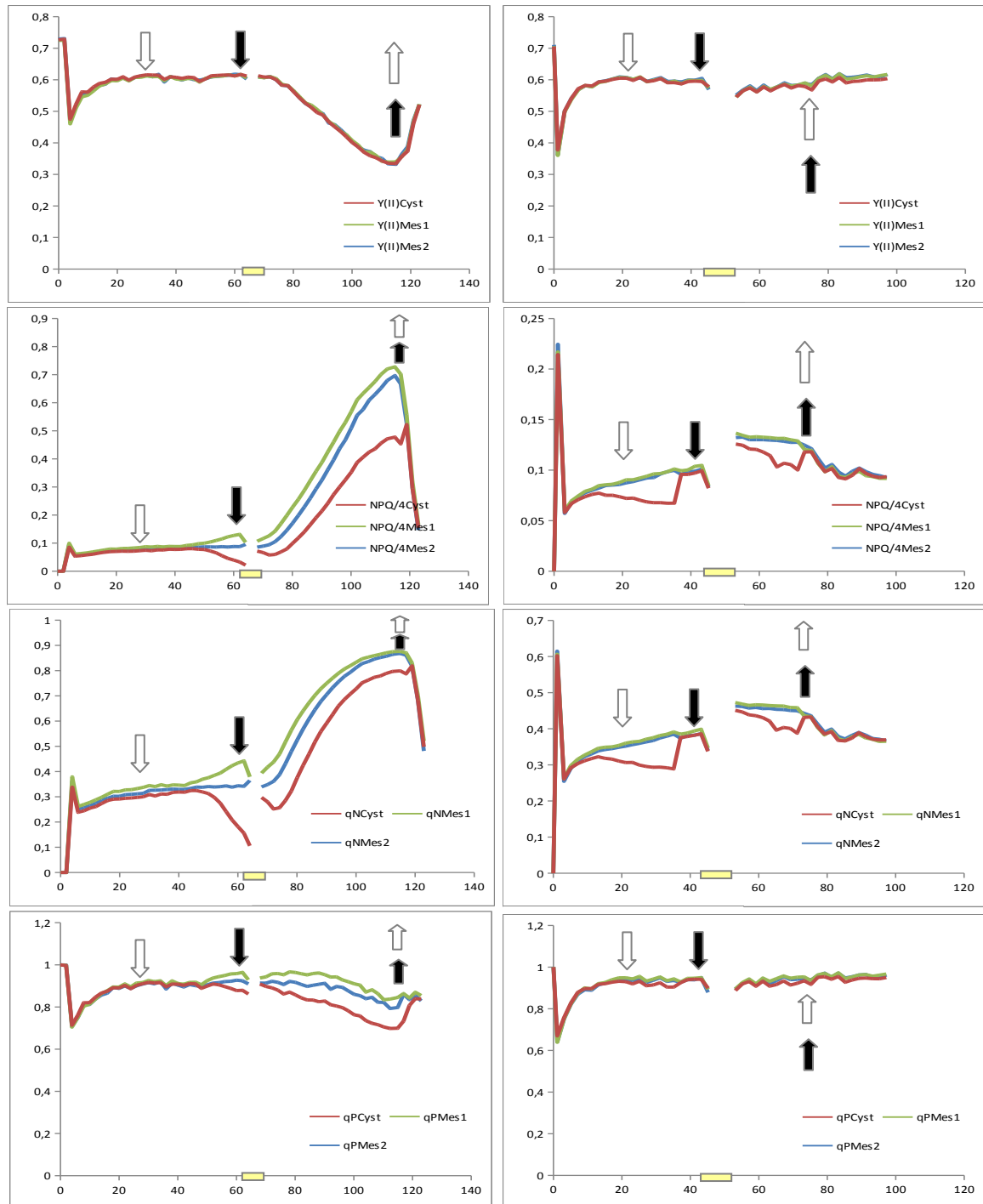
Τα άσπρα βέλη επισημαίνουν τη χρονική στιγμή μείωσης και επαναφοράς (προς τα κάτω και πάνω αντίστοιχα) της συγκέντρωσης του  $\text{O}_2$ , τα δε μαύρα αυτής του  $\text{CO}_2$ . Το κίτρινο ορθογώνιο πλαίσιο υποδηλώνει την ύπαρξη φωτισμού κατά τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα.

## CONTROL



## ABA





**Εικόνα 7.** Οι αλλαγές στην φωτοχημική ικανότητα του PSII (Yield), την παράμετρο μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού (NPQ), στον συντελεστή μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού (qN), τον συντελεστή φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού (qP) σε δύο πειραματικές διαδικασίες μελέτης της επίδρασης ABA σε φύλλα. Τα διαφορετικά χρώματα των καμπυλών υποδηλώνουν μετρήσεις σε σημεία που βρίσκονται σε διαφορετική απόσταση από τον κυστόλιθο (Cyst, μέτρηση πάνω στον κυστόλιθο, Mes1 και Mes2, σε απόσταση ενός και τριών κυττάρων από τον κυστόλιθο αντίστοιχα).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης του φθορισμού της χλωροφύλλης έδειξαν ότι η φωτοχημική ικανότητα του PS II (Yield), η οποία αποτελεί ένα μέτρο της ικανότητας του PS II να απορροφά την ενέργεια της ακτινοβολίας και να προωθεί με αυτή τη φωτοχημική ροή ηλεκτρονίων, αλλά και ο συντελεστής φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού (qP), ο οποίος αντιστοιχεί στο ποσοστό των ανοικτών φωτοχημικών κέντρων PS II, μειώνεται στα φύλλα-μάρτυρες (Control) όταν διακόπτεται η διοχέτευση CO<sub>2</sub>, ενώ η μη-φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού, (παράμετροι NPQ και qN) αυξάνεται. Αντίθετα, στα φύλλα στα οποία έχει προηγηθεί χειρισμός με ABA οι συντελεστές αυτοί παραμένουν σχετικά αμετάβλητοι.



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε να δοθεί απάντηση στην υπόθεση εργασίας σύμφωνα με την οποία οι κυστόλιθοι, και πιθανόν και άλλες συναφείς δομές όπως οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου, αποτελούν δυναμικά συστήματα που εξυπηρετούν κατά προτεραιότητα τη διαχείριση των αποθεμάτων ανόργανου άνθρακα, και όχι του ασβεστίου. Η δομή των κυστόλιθων είναι αυτή του άμορφου χυμοτοπιακού εγκλειστου. Οι λιθοκύστες, λόγω θέσης, θα μπορούσαν κάλλιστα να επιτελέσουν το ρόλο των εναλλακτικών πηγών ανόργανου άνθρακα για τη φωτοσυνθετική λειτουργία, δεδομένου ότι εντοπίζονται μεταξύ των φωτοσυνθετικών κυττάρων του πασσαλώδους ή και σπογγώδους παρεγχύματος, ανάλογα με το φυτικό είδος. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, τα αποθέματα ανόργανου άνθρακα των κυστόλιθων μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για τη φωτοσυνθετική αφομοίωση άνθρακα. Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκαν δεδομένα τα οποία σχετίζονται με τη συμπεριφορά των κυστόλιθων / λιθοκύστεων ως δυναμικού συστήματος διαχείρισης.

Επιχειρήθηκε να απαντηθεί η υπόθεση σύμφωνα με την οποία η απόδοση των αποθεμάτων άνθρακα των κυστόλιθων πραγματοποιείται υπό συνθήκες αδυναμίας τροφοδοσίας με CO<sub>2</sub> από το εξωτερικό εναέριο περιβάλλον. Προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας έδειξαν ότι σε συνθήκη μηδενικής τροφοδοσίας με CO<sub>2</sub>, το μέγεθος των εγκλειστων μειώνεται σημαντικά (). Από φυσιολογική άποψη οι συνθήκες αυτές επικρατούν όταν τα στομάτια είναι κλειστά. Στη παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν πειράματα τα οποία είχαν ως στόχο να αποκλειστεί η τροφοδοσία άνθρακα προς τα φωτοσυνθετικά κύτταρα, με χρήση αμπισοϊκού οξέος (ABA), ώστε να στομάτια να παραμένουν κλειστά και να παρεμποδίζεται η ανταλλαγή αερίων με την ατμόσφαιρα. Παρατηρήθηκε ελάττωση του μεγέθους των κυστόλιθων, μέσα σε λίγες ώρες από την εφαρμογή του πειραματικού χειρισμού. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι κυστόλιθοι δεν αποτελούν μια στατική δεξαμενή αποθήκευσης ιόντων ασβεστίου τα οποία βρίσκονται σε περίσσεια, αλλά ένα δυναμικό σύστημα, το οποίο έχει τη δυνατότητα να αποδώσει εκ νέου τον αποθηκευμένο άνθρακα στο κυτταρικό περιβάλλον, όταν αυτό το επιβάλλουν οι συνθήκες (ουσιαστικά όταν επικρατεί πενία άνθρακα). Η διαπίστωση ότι οι κυστόλιθοι αποτελούν ένα δυναμικό σύστημα, ικανό να αποδώσει ανθρακικά ιόντα

(και ιόντα ασβεστίου) στα κύτταρα, έχει επιβεβαιωθεί και για ανάλογες δομές, όπως οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου. Αρκετοί ερευνητές είχαν διαπιστώσει κατά το παρελθόν ότι οι ήδη σχηματισμένοι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου μπορεί να αποδομηθούν και να μην είναι ορατοί στο μικροσκόπιο σε ορισμένα στάδια του βιολογικού κύκλου ορισμένων φυτικών ειδών (Metchalfe and Chalk, 1985; Franceschi and Horner 1980 και η συναφής βιβλιογραφία που αναφέρεται στα άρθρα αυτά).

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

1. Περιορίζονται οι απώλειες νερού, αφού μπορεί εξασφαλιστεί ως ένα βαθμό η συντήρηση τουλάχιστον του φυτού παρουσία κλειστών ή μισόκλειστων στοματίων. Εάν η υπόθεση εργασίας αληθεύει, θα δοθεί ικανοποιητική ερμηνεία όσον αφορά στην ανθεκτικότητα ορισμένων φυτικών ειδών γεωργικού ενδιαφέροντος (όπως η συκιά και η μουριά) έναντι της υδατικής καταπόνησης και των ισχυρών ανέμων, παρά το γεγονός ότι τα φύλλα τους δεν διαθέτουν τα τυπικά ξηρομορφικά χαρακτηριστικά. Είναι χαρακτηριστικό ότι η μουριά αποτελεί το επικρατέστερο φυτό για τη δημιουργία δενδροστοιχιών στις Κυκλάδες, στις οποίες ως γνωστό επικρατούν ισχυροί βόρειοι άνεμοι (μελτέμια) για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα στη διάρκεια της θερμής και ξηρής περιόδου. Η υπόθεση εργασίας μπορεί επίσης να εξηγήσει γιατί το περδικάκι, παρόλο που είναι τυπικό C<sub>3</sub> φυτό, αποτελεί ένα από τα πλέον δυσεξόντωτα ζιζάνια.

2. Αποτρέπεται η φωτοπαρεμπόδιση. Το φαινόμενο της φωτοπαρεμπόδισης μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες για τη φωτοσυνθετική συσκευή όταν σε συνθήκες άπλετου φωτισμού (δηλ. πλήρους ενεργειακής παροχής) η διαθεσιμότητα CO<sub>2</sub> είναι περιορισμένη (όταν δηλ. τα στομάτια παραμένουν κλειστά) (Καραμπουρνιώτης κ.ά. 2011).

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

4. Γίνεται πιθανή η τροφοδοσία με ανόργανο άνθρακα από το υπόγειο τμήμα του φυτού ή από το έδαφος. Με τον τρόπο αυτό δίδεται η δυνατότητα πλήρους ανεξαρτητοποίησης της φωτοσυνθετική λειτουργίας από τη παροχή CO<sub>2</sub> μέσω της ατμόσφαιρας. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι έχει αναφερθεί τουλάχιστον μία περίπτωση φυτικού είδους το οποίο δεν διαθέτει στομάτια στα υπέργεια όργανα και η τροφοδοσία με ανόργανο άνθρακα γίνεται αποκλειστικά από το έδαφος (Keeley *et al* 1984). Εκτός αυτού, πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η τροφοδοσία των φωτοσυνθετικών κυττάρων του βλαστού με ανόργανο άνθρακα επιτελείται και μέσω της ρίζας (Hibberd and Quick, 2002).

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

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η λειτουργία των λιθοκύστεων συνδέεται κυρίως με την αντιμετώπιση αντίξωων συνθηκών, κυρίως υδατικής καταπόνησης. Για το λόγο αυτό στα επόμενα πειράματα έγινε προσπάθεια να διερευνηθεί η συμπεριφορά των ιδιοβλαστών αυτών σε συνθήκες κάτω από τις οποίες τα στομάτια παραμένουν κλειστά. Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι παρουσία ABA, μιας φυτορμόνης η οποία προκαλεί το κλείσιμο των στοματίων (Taiz and Zeiger 1998; Δροσόπουλος 1991; Καραμπουρνιώτης κ.ά. 2011), το μέγεθος των κυστόλιθων μειώνεται ταχέως, μέσα σε λίγες μόνο ώρες. Σύμφωνα με αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης (Λουρίδα, 200..), το ίδιο συμβαίνει και σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης, ωστόσο φαίνεται ότι οι κυστόλιθοι ανακτούν ταχέως και πάλι το αρχικό τους μέγεθος. Μάλιστα εάν τα φυτά ποτιστούν και πάλι, το μέγεθος των κυστόλιθων των φυτών αυτών είναι μεγαλύτερο εκείνου των κυστόλιθων των φυτών-μαρτύρων. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανόν υποδηλώνει μεταφορά ανόργανων μορφών άνθρακα διαμέσου του διαπνευστικού ρεύματος.

Τα πειράματα επίσης της μεταπτυχιακής εργασίας της Γ. Τσουλάκου έδειξαν ότι το μέγεθος των κυστόλιθων παρουσιάζει ημερονύκτιες διακυμάνσεις. Οι Seal and Sen (1970) είχαν παρατηρήσει ημερονύκτιες διακυμάνσεις στο περιεχόμενο σε

οξαλικό οξύ στο φυτό *Oxalis corniculata*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, το μέγεθος των κυστολίθων ελαττώνεται κατά τη διάρκεια της ημέρας και αυξάνεται κατά τη διάρκεια της νύκτας, ενώ μπορεί να παρατηρηθεί και πρόσκαιρη αύξηση στη διάρκεια της ημέρας, όταν τα στομάτια κλείνουν. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι η ποσότητα ανθρακικού ασβεστίου που εναποτίθεται στους κυστολίθους βρίσκεται υπό συνεχή έλεγχο. Κατά τη διάρκεια της ημέρας ένα ποσοστό του ανθρακικού ασβεστίου μπορεί να διασπάται και τα ανθρακικά ιόντα να χρησιμοποιούνται στη φωτοσύνθεση, ενώ κατά τη διάρκεια της νύκτας το ποσοστό αυτό αναπληρώνεται μέσω της αναπνοής ή / και μέσω της μεταφοράς ανθρακικών ιόντων από το έδαφος.

Οι τιμές του  $\delta^{13}\text{C}$  των κρυστάλλων που μετρήθηκε σε δείγματα του φυτού *P. Judaica*, διαφοροποιούνται έντονα από εκείνες της βιομάζας (λιγότερο αρνητικές) γεγονός που υποδηλώνει διαφορετική προέλευση του άνθρακα των κρυστάλλων από αυτόν της βιομάζας. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για απομονωμένους κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου από CAM φυτά (Rivera and Smith, 1979). Οι κρύσταλλοι παρουσιάζονται περισσότερο εμπλουτισμένοι σε  $\delta^{13}\text{C}$  σε σχέση με τη βιομάζα, εύρημα που ενισχύει την υπόθεση ότι το  $\text{CO}_2$  που προέρχεται από την αναπνοή ή από το έδαφος χρησιμοποιείται για το σχηματισμό των κρυστάλλων. Σύμφωνα με νεότερες μελέτες το  $\text{CO}_2$  που αποβάλλεται διαμέσου της λειτουργίας της αναπνοής είναι περισσότερο εμπλουτισμένο σε  $\delta^{13}\text{C}$  (Ghashghaie, *et al*, 2001).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης του φθορισμού της χλωροφύλλης έδειξαν ότι η φωτοχημική ικανότητα του PS II (Yield), η οποία αποτελεί ένα μέτρο της ικανότητας του PS II να απορροφά την ενέργεια της ακτινοβολίας και να προωθεί με αυτή τη φωτοχημική ροή ηλεκτρονίων, αλλά και ο συντελεστής φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού (qP), ο οποίος αντιστοιχεί στο ποσοστό των ανοικτών φωτοχημικών κέντρων PS II, μειώνεται στα φύλλα-μάρτυρες (Control) όταν διακόπεται η διοχέτευση  $\text{CO}_2$ , ενώ η μη-φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού, (παραμέτροι NPQ και qN) αυξάνεται. Αντίθετα, στα φύλλα στα οποία έχει προηγηθεί χειρισμός με ABA οι συντελεστές αυτοί παραμένουν σχετικά αμετάβλητοι. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι τα φύλλα στα οποία είχε προηγηθεί χειρισμός με ABA και τα στομάτια τους ήταν κλειστά, μπόρεσαν να αντιμετωπίσουν καλύτερα την έλλειψη του ατμοσφαιρικού  $\text{CO}_2$  σε σχέση με τα φύλλα-μάρτυρες. Το γεγονός αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι τα φυτά σε συνθήκες καταπόνησης, οι οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα

το κλείσιμο των στοματιών τους μπορούν να διατηρούν στοιχειώδη φωτοσυνθετική δραστηριότητα, αξιοποιώντας τον C που προέρχεται από την αποδόμηση των κρυστάλλων. Όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος ξαναγίνουν ευνοϊκές, τα φυτά αυτά μπορούν να επιτύχουν μέγιστο ρυθμό φωτοσύνθεσης ταχύτερα σε σχέση με άλλα φυτά, τα οποία δεν διαθέτουν παρόμοια κυτταρικά έγκλειστα.

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



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Adams, M.A. and Grierson, P.F. 2001.** Stable isotopes at natural abundance in terrestrial plant ecology and ecophysiology: an update. *Plant Biology* 3: 299-310. 523

**Al-Rais, A.H., Myers, A. and Watson, L. 1971.** The isolation and properties of oxalate crystals from plants. *Annals of Botany* 35: 1213-1218.

**Arnott, H.J. 1982.** Three systems of biomineralization in plants with comments on the associated organic matrix. In: *Biological Mineralization and Demineralization*, GH Nancollas (ed.) Berlin: Springer Veriag, 199-218.

**Arnott, H.J. and Pautard, F.G.E. 1970.** Calcification in plants. In: *Biological Calcification: Cellular and Molecular Aspects*, ed. H Schraer, New York: Appleton-Centuty-Crofts, 375-446

**Baker, N., 2008.** Chlorophyll Fluorescence: A probe of Photosynthesis In Vivo. In: *The Annual Review of Plant Biology* Vol.59, 89-113.

**Brugnoli, E. and Farquhar, G.D. 2000.** Photosynthetic fractionation of carbon isotopes. In: *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*, Leegood RC, Sharkey TD & von Caemmerer (eds) Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, 399- 434.

**Dickison, W.C. 2000.** *Integrative Plant Anatomy*. Academic Press. San Diego.

**Dixon DC, Cut JR, Klessig DF.1991.** Differential targeting of the tobacco PR-1 pathogenesis-related proteins to the extracellular space and vacuoles of crystal idioblasts. *The EMBO Journal* 10: 1317-1324.

**Fahn A. 1990.** *Plant anatomy*. 4th Edition. Oxford: Pergamon Press.

**Farquhar, G.D., Ehleringer, J.R. and Hubick, K.T. 1989.** Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 503-537.

**Fotelli, M.N., Geßler, A., Peuke, A.D. and Rennenberg, H. 2001.** Drought affects the competitive interactions between *Fagus sylvatica* seedlings and an early successional species, *Rubus fruticosus*: responses of growth, water status and  $\delta^{13}\text{C}$  composition. *New Phytologist* 151: 427-435.

**Fotelli, M.N., Rennenberg, H., Holst, T., Mayer, H., and Geßler, A. 2003.** Carbon isotope composition of various tissues of beech (*Fagus sylvatica*) regeneration is indicative of recent environmental conditions within the forest understorey. *New Phytologist* 159: 229-244

**Franceschi V.R. and Nakata P.N. 2005.** Calcium oxalate in plants: Formation and Function. *Annual Review of Plant Biology* 56: 41-71.

**Franceschi V.R. 1989.** Calcium oxalate formation is a rapid and reversible process in *Lemna minor* L., *Protoplasma* 148 : 130-137.

**Franceschi V.R. and Horner H.T. 1980.** Calcium oxalate crystals in plants. *The Botanical Review*. 46: 360-427.

**Freisleben R. 1933.** Untersuchungen über Bildung und Auflösung von Cystolithen beider Urtales.

**Ghashghaie, J., Duranceau, M., Badeck, F., Cornic, G., Adeline, M.T. and Deleens, E. 2001.**  $\delta^{13}\text{C}$  of  $\text{CO}_2$  respired in the dark in relation to leaf metabolites: comparisons between *Nicotiana sylvestris* and *Helianthus annuus* under drought. *Plant Cell & Environment* 24: 505-515.

**Hibberd J.M., Quick W.P. 2002.** Characteristics of  $\text{C}_4$  photosynthesis in stems and petioles of  $\text{C}_3$  flowering plants. *Nature* 415: 451-453.

**Ilarslan H., Palmer R. G. and Horner H.T. 2001.** Calcium oxalate crystals in developing seeds of soybean. *Annals of Botany* 88: 243-257.



**Kostman, T.A., Francesci, V.R. and Nakata, P.A. 2003.** Endoplasmic reticulum sub-compartments are involved in calcium sequestration

within raphide crystals idioblasts of *Pistia stratiotes* L. *Plant Science* 165: 205-212

**Kostman, T.A. and Koscher, J.R. 2003.** L-galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase is present in calcium oxalate crystal idioblasts of two plant species. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 201-206

**Lawlor, D.W. 2001.** *Photosynthesis*. Oxford: BIOS Scientific Publishers.

**Levi-Kalisman, Y., Raz, S., Weiner, S., Addadi, L. and Sagi, I. 2000.** X-ray absorption spectroscopy studies on the structure of a biogenic "amorphous" calcium carbonate phase. *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions* 21: 3977-3982.

**Livingston, N.J., Spittlehouse, D.L. 1996.** Carbon isotope fractionation in tree ring early and late wood in relation to intra-growing season water balance. *Plant, Cell & Environment* 19: 768-774.

**Lucas P.W., Turner I.M., Dominy N.J. and Yamashita N. 2000.** Mechanical defences to herbivory. *Annals of Botany*. 86: 913-920.

**Macnish A.J, Irving A D.E., Joyce A.D.C, Vinthanage B Vasante, Wearing A A.H, Webb C R.I., and Frost D.R.L. 2003.** Identification of intracellular calcium oxalate crystals in *Chamaelucium uncinatum* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* 51: 565-572.

**Mauseth J.D. 1988.** *Plant Anatomy*. The Benjamin/Cummings Publ. Comp. Inc. Menlo Park, Ca.

**Metcalf C.R. and Chalk L. 1985.** *Anatomy of the Dicotyledons-Volume II Wood structure and conclusion of the general introduction*. 2nd Edition. Oxford.

**Metcalf C.R. 1985.** Calcareous deposits, calcified cell walls, cystoliths and similar structures. Pages 94-97 In C.R.Metcalf and L .Chalk (ed). *Anatomy of the*

Dicotyledons- Volume II Wood structure and conclusion of the general introduction. 2nd Edition. Oxford.

**Nakata P.A., Kostman T.A, Franceschi V.R. 2003.** Calreticulin is enriched in the crystal idioblasts of *Pistia stratiotes*. *Plant Physiology and Biochemistry* **41** : 425-430.

**Nakata P.A., Michele M.McConn. 2002.** Calcium oxalate crystal formation is not essential for growth of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**: 325-329.

**Nakata P.A. 2003.** Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science* **164**: 901-909.

**O'Realy, M.H. 1981.** Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry* 20: 553-567

**Raven J.A. and Smith F.A. 1976.** Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytologist* 76: 415-431.

**Ridge I. 2002.** Plants. Oxford University Press. Oxford, UK.

**Rivera, E.R. and Smith, B.N. 1979.** Crystal morphology and <sup>13</sup>Carbon/<sup>12</sup>Carbon composition of solid oxalate in cacti. *Plant Physiology* 64: 966-970.

**Stryer, L. 1994.** *Βιοχημεία*-Τόμος Πρώτος. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.

**Sugimura Y., Mori, T., Nitta I., Kotani E., Furusava T., Tatsumi M., Kusakari S.-I., Wada M. and Morita Y. 1999.** Calcium deposition in idioblasts of mulberry leaves. *Annals of Botany* **83**: 543-550.

**Taiz L. and Zeiger E. 1998.** Photosynthesis: Carbon metabolism. In: *Plant Physiology* 1st ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, pp. 219-248.

**Volk G.M., Goss L.J. and Franceschi V.R. 2004.** Calcium Channels are Involved in Calcium Oxalate Crystal Formation in Specialized Cells of *Pistia stratiotes* L. *Annals of Botany* 93: 741-753

**Winter, K., Aranda, J. and Holtum, J.A.M. 2005.** Carbon isotope composition and water use efficiency in plants with crassulacean acid metabolism. *Functional Plant Biology* 32: 381-388.

**Wu CC, KuoHuang LL. 1997.** Calcium crystals in the leaves of some species of Moraceae. *Botanical Bulletin of the Academy Sinica* 38 (2): 97-104.

**Αϊβαλάκις Γ., Καραμπουρνιώτης Γ. και Φασσέας Κ. 2005.** Γενική Βοτανική. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.

**Αϊβαλάκις Γ., Καραμπουρνιώτης Γ. και Φασσέας Κ. 2003.** Σημειώσεις Γενικής Βοτανικής. Αθήνα : Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Γαλάτης Β., Κατσαρός Χ. και Αποστολάκος Π, 1998.** Εισαγωγή στη Βοτανική. Εκδόσεις Α.Σταμούλης. Αθήνα.

**Γανωτάκης, Δ. και Κοτζαμπασής, Κ. 2003.** Φωτοσύνθεση Ι: μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε χημική. *Φυσιολογία φυτών*. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Κ.Α. (επ.). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 145-189.

**Γκιάφη Ζ. 2003.** “Ανατομικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των λιθοκόστεων του φυτού *Parietaria judaica*”. Πτυχιακή μελέτη. Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Δροσόπουλος Ι.1992.** *Η μορφολογία και η ανατομία των φυτών*. Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Δροσόπουλος Ι. 1998.** *Φυσιολογία φυτών*. Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Καραμπουρνιώτης Γ. 2003.** *Φυσιολογία Καταπονήσεων των φυτών*. Εκδόσεις Έμβρυο. Αθήνα.