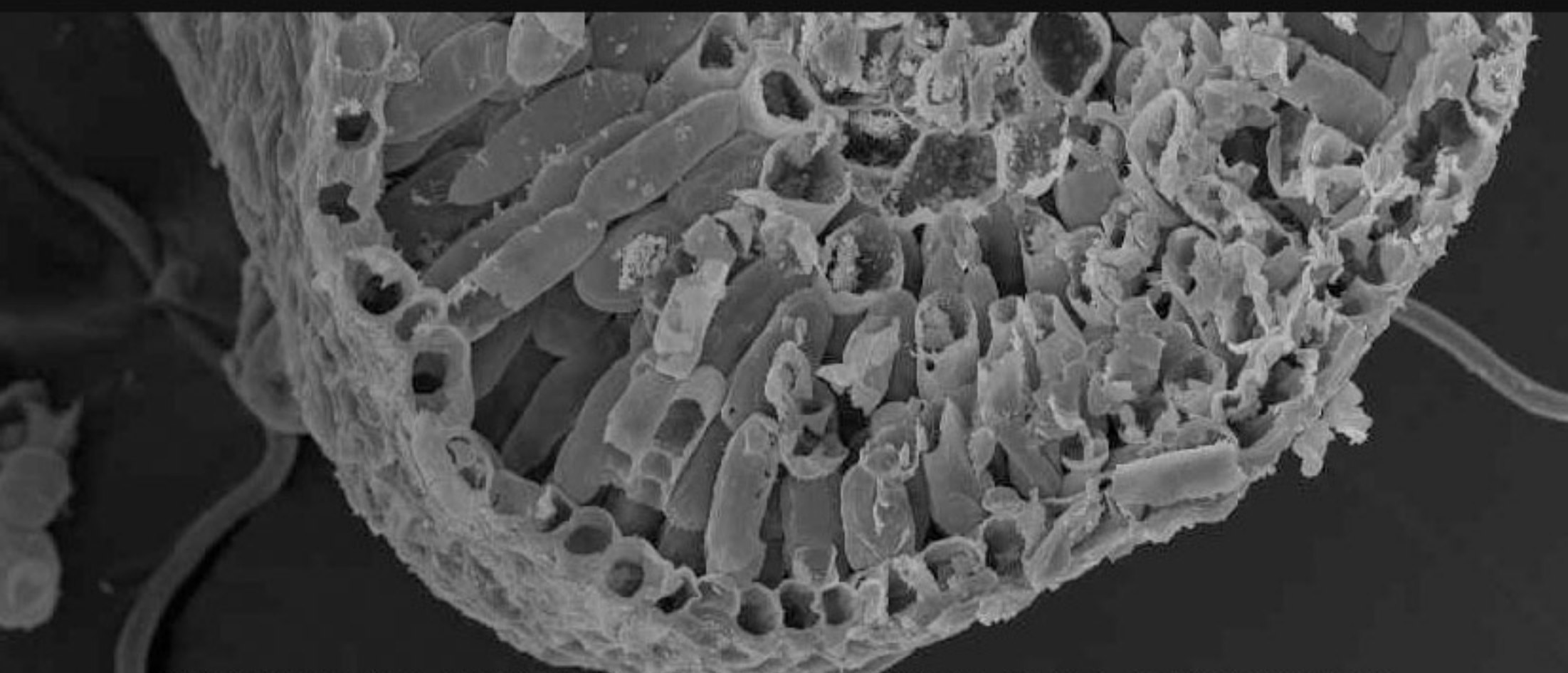


ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΒΑΣΙΛΙΚΗΣ ΡΕΓΚΛΗ

«Ανατομική και ιστοχημική μελέτη των φύλλων  
του φυτού *Achillea millefolium* L.»



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ  
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ - ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ  
ΑΘΗΝΑ 2013

Η ανάθεση της παρούσας μελέτης έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύνοψης του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας , κατά τη οποία εγκρίθηκαν το θέμα (συνεδρία) και η Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή (συνεδρία).

*ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ*

- **Κ. Φασσέας** , Καθηγητής (Επιβλέπων)
- **Γ. Καραμπουρνιώτης** , Καθηγητής (Μέλος)
- **Γ. Αϊβαλάκις**, Αν. Καθηγητής (Μέλος)

**Στην οικογένειά μου**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία δεν θα είχε τη σημερινή μορφή χωρίς την ουσιαστική συνεισφορά κάποιων ανθρώπων, τους οποίους και θέλω να ευχαριστήσω θερμά:

Τον κ Φασσέα Κ., Καθηγητή και διευθυντή του εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, επιβλέποντα της παρούσας εργασίας, για την επιλογή του θέματος, την καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Χωρίς την υποστήριξή του δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω για την συνεργασία τους ως μέλη της επιτροπής αξιολόγησης της Μεταπτυχιακής αυτής εργασίας τον κ Γ. Καραμπουρνιώτη, Καθηγητή και τον κ Γ. Αιβαλάκι, Αν. Καθηγητή.

Επιπλέον δεν θα ήθελα να παραλείψω τον κ Ψαροκοστώπουλο Ι. για την βοήθειά του και τις υποδείξεις του στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας για την περάτωση της εργασίας αυτής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω, την οικογένεια μου και το σύζυγό μου, οι οποίοι με υποστηρίζουν σε κάθε μου βήμα, δίνοντας μου δύναμη να στοχεύω μπροστά.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### Περίληψη

<b>I. Βιβλιογραφική ανασκόπηση</b>	<b>1</b>
1.1 Βοτανική ταξινόμηση	1
1.1.1 Συστηματική κατάταξη	1
1.2. Γενικά για την Αχίλλειο- <i>Achillea millefolium</i>	1
1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά της οικογένειας Asteraceae	1
1.2.2 Γενικά χαρακτηριστικά του <i>Achillea millefolium</i>	5
1.2.2α Γεωγραφική κατανομή	8
1.2.β Ενδιαίτημα-Οικότοπος του <i>Achillea millefolium</i>	9
1.2β <sub>1</sub> . Κλίμα	9
1.2β <sub>2</sub> Φυτοκοινότητες	10
1.2.β <sub>3</sub> Εδαφικές απαιτήσεις	10
1.2.γ Μορφολογία φύλλων	11
1.2.3 Λαογραφικά και ιστορικά στοιχεία του <i>Achillea millefolium</i>	13
1.2.4. Χημικές και φυσικές ιδιότητες του <i>Achillea millefolium</i>	16
1.2.4α Γενικά	16
1.24.β Αιθέρια έλαια	17
1.2.5 Χρήσεις του <i>Achillea millefolium</i>	20
1.2.5α Μη θεραπευτικές	20
1.2.5β Θεραπευτικές	21
1.2.6 Τα τριχώματα των φυτών	26
1.2.6α Μη αδενώδη τριχώματα	26
1.2.6.β Αδενώδη τριχώματα	27
1.2.7 Σκοπός της εργασίας	34
<b>II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>35</b>
2.1 Συλλογή του φυτικού υλικού	35
2.2 Προετοιμασία παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το οπτικό μικροσκόπιο (Ο.Μ.)	35

2.3 Τμήση τομών και χρώση μονιμοποιημένων παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το οπτικό μικροσκόπιο (Ο.Μ.)	36
2.4 Προετοιμασία παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Η.Μ.Σ.)	37
2.5 Σύσταση διαλυμάτων	39
2.6 Προετοιμασία νωπών παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το Οπτικό Μικροσκόπιο (Ο.Μ.)	40
2.6.1 Αυτοφθορισμός	40
2.7 Ιστοχημεία	41
2.8 Μικροσκοπία τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τις μορφολογικές, ανατομικές και ιστοχημικές παρατηρήσεις	43
2.9 Φωτογράφιση	45
<b>III. Αποτελέσματα</b>	46
<b>3.1 Μακροσκοπικές παρατηρήσεις</b>	46
<b>3.2 Ιστοχημικές παρατηρήσεις</b>	47
3.2.1 Τριχλωριούχο Αργίλιο ( $\text{AlCl}_3$ )	47
3.2.2 Θεικός σίδηρος ( $\text{FeSO}_4$ )	49
3.2.3 Αντιδραστήριο Nadi	51
3.2.4 Sudan IV	53
3.2.5 Dragendorff	54
<b>3.3 Ανατομικές παρατηρήσεις με το Οπτικό Μικροσκόπιο</b>	55
<b>4. Συζήτηση</b>	62
4.1 Ιστοχημεία	62
4.1.1 Τριχλωριούχο Αργίλιο ( $\text{AlCl}_3$ )	62
4.1.2 Θεικός σίδηρος ( $\text{FeSO}_4$ )	64
4.1.3 Αντιδραστήριο Nadi	65
4.1.4 Sudan IV	66
4.1.5 Dragendorff	67
4.2 Ανατομία φύλλου	68
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	71

<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>73</b>
Ελληνική Βιβλιογραφία	73
Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία	73
Ισότοποι	81

## Περίληψη

Τα ανατομικά χαρακτηριστικά των φύλλων της Αχίλλειους σε συνδυασμό με την ιστοχημική σύσταση των διαφόρων φυτικών οργάνων των φύλλων της αποτελέσαν τους κύριους σκοπούς της παρούσας διατριβής. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν Ο.Μ. και Η.Μ.Σ., ενώ παράλληλα έγινε χρήση διαφόρων χρωστικών ουσιών για την ιστοχημική ανάλυση.

Το φυτό *Achillea millefolium* είναι ένας ποώδης πολυετής θάμνος, με σύνθετα φυλλάρια και ταξιανθία σκιάδιο. Χαρακτηρίζεται ως ενδημικό φυτό της ελληνικής χλωρίδας και μνημονεύεται τόσο για τις πολλαπλές θεραπευτικές του ιδιότητες όσο και για την ευρεία προσαρμοστικότητα του στις εδαφοκλιματικές απαιτήσεις.

Από την ανατομική μελέτη των φύλλων της Αχίλλειους, διαπιστώνεται το πυκνό δίκτυο των μη αδενώδων τριχωμάτων στη μέση πλευρά, όπου υπάρχει αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των φυλλαρίων. Τα κυρία χαρακτηριστικά των μη αδενωδών τριχών, είναι το μεγάλο μήκος τους, η διακλάδωσή τους και ο μικρός τους αριθμός. Τα αδενώδη τριχώματα είναι πολυάριθμα στην προσαξονική επιφάνεια των φύλλων, ενώ εμφανή είναι και στην αποαξονική. Στην προσαξονική επιφάνεια ο κύριος ρόλος τους είναι η έκκριση αιθέριων ελαίων, ενώ στη κάτω επιφάνεια του φύλλου κυρίως η προστατευτική δράση έναντι αντίξοων εξωτερικών παραγόντων.

Τα στόματα εμφανίζονται και στις δυο επιφάνειες των φύλλων, ειδικότερα από την άνω πλευρά μέχρι την άκρια ενώ από την κάτω μέχρι το σημείο που υπάρχει αλληλοεπικάλυψη. Είναι ανισοκυτικού τύπου και παρουσιάζονται κυρίως ελαφρώς υπερυψωμένα σε σχέση με τα επιδερμικά κύτταρα, ενώ υπάρχουν και στόματα των οποίων τα καταφρακτικά κύτταρα βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο με τα επιδερμικά κύτταρα. Τέλος, η διάταξη των στομάτων στα φύλλα της Αχίλλειους είναι παρόμοια με την αντίστοιχη στα φύλλα του *Juniperus phoenicea* L, το οποίο χαρακτηρίζεται εξίσου από λεπιοειδή φύλλα.

Βάση των ιστοχημικών αναλύσεων, έντονη χαρακτηρίζεται η παρουσία των φλαβονοειδών και των τερπενοειδών στους φυτικούς ιστούς των φύλλων της Αχίλλειους, ενώ παρατηρήθηκε απουσία αλκαλοειδών. Η ταυτοποίηση των



ταννινών, είναι εξίσου αξιοσημείωτη εξαιτίας των μικρών συγκεντρώσεων τους στο υπό μελέτη φυτό. Η παρουσία των λιπιδίων δεν είναι ευδιάκριτα εμφανής, αφού παρατηρείται ασθενής ερυθρός χρωματισμός της εφυμενίδας, των ελαιοσταγονιδίων, της κεφαλής του αδενώδους τριχώματος καθώς και της βάσης του μη αδενώδους τριχώματος. Με το  $\text{FeSO}_4$  και το Sudan IV το ανιχνεύθηκαν τα εκκρίματα των μη αδενωδών τριχωμάτων, ενώ στα αδενώδη τριχώματα εντοπίστηκαν τερπενοειδή καθώς και λιπίδια στα κύτταρα της κεφαλής τους.

**Λέξεις κλειδιά** : Αχίλλειος, ιστοχημεία, ανατομικά χαρακτηριστικά φύλλων

## I. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

### 1.1. Βοτανική ταξινόμηση

#### 1.1.1 Συστηματική κατάταξη

**Βασίλειο:** *Plantae*

**Υποβασίλειο :** *Tracheobionta-Αγγειόσπερμα*

**Υπεράθροισμα:** *Spermatophyte-Σπορόφυτα*

**Φύλλο:** *Magnoliophyta-Ανθόφυτα*

**Κλάση:** *Magnoliopsida-Δικοτυλήδονα*

**Υποκλάση:** *Asteridae (Sympetalae tetracycliae)*

**Τάξη:** *Asterales*

**Υπόταξη:** *Asteranae*

**Οικογένεια:** *Asteraceae*

**Υποοικογένεια:** *Asteroideae*

**Τριπτύς:** *Anthemideae*

**Υποτριπτύς:** *Achillinae*

**Γένος:** *Achillea*

**Είδος:** *millefolium*

### 1.2 Γενικά για την Αχίλλειο- *Achillea millefolium*

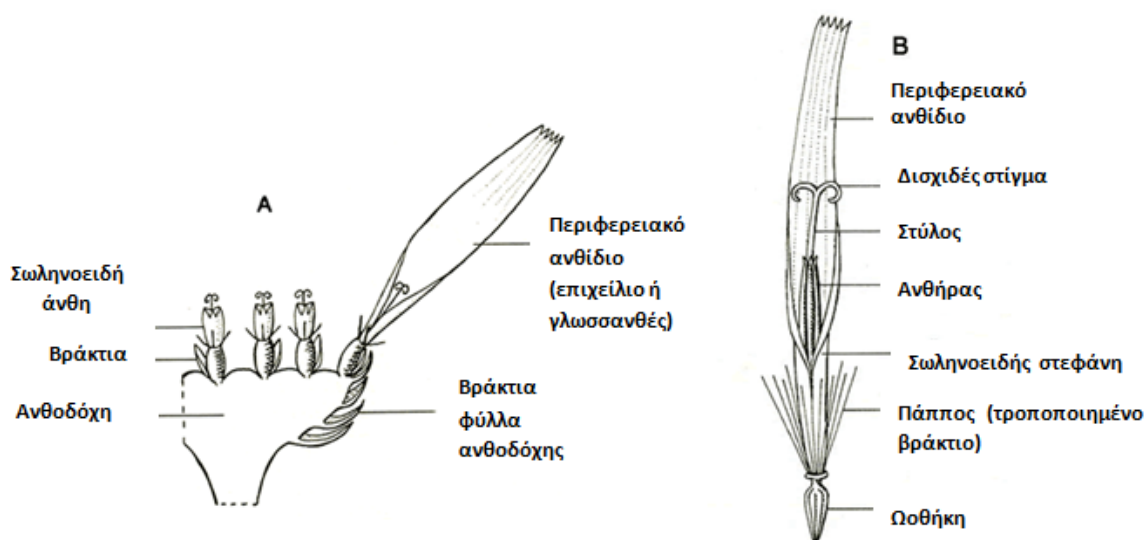
#### 1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά της οικογένειας *Asteraceae*

Η οικογένεια *Asteraceae* είναι η μεγαλύτερη οικογένεια της τάξης *Asterales* και η δεύτερη σε αριθμό ειδών οικογένεια (για ορισμένους όμως η πρώτη) μετά την οικογένεια *Orchidaceae*, όλων των σπερματοφύτων. Περιλαμβάνει 12 τριπτύες (tribes), 1.620 γένη, στα οποία ταξινομούνται 23.000 περίπου είδη (ή και περισσότερα). Τα μεγαλύτερα γένη είναι το *Senecio* (1.500), *Vernonia* (1.000), *Cousinia* (600) και *Centaurea* (600) (Κουτσός, 2012).

Τα *Asteraceae* ονομάζονται και *Compositae*. Κύριο και κοινό χαρακτηριστικό των φυτών αυτής της οικογένειας είναι η σύνθετη δομή του άνθους. Ένα «άνθος» φυτού της παραπάνω οικογένειας αριθμεί στην πραγματικότητα πολλές εκατοντάδες ανθέων ομαδοποιημένα σε μια ταξιανθία που αποκαλείται κεφάλιο

(cartilum). Ουσιαστικά πρόκειται για ένα σύνθετο άνθος (ως εκ τούτου και η ονομασία της οικογένειας «Σύνθετα ή Compositae»), που αποτελείται από πολλά μικρά αυτοτελή άνθη (ανθίδια), τα οποία φέρονται επάνω σε μια επίπεδη και ενίοτε τοξωτή ή κωνική επιφάνεια του άνθους που λέγεται δίσκος ή ανθοδόχη του κεφάλιου (Εικόνα 1A). Το κάτω μέρος της ανθοδόχης αποτελεί το «υπάνθιο» μέρος της ταξιανθίας του κεφάλιου. Περιβάλλεται από λίγα και τις περισσότερες φορές από πολλά αλλεπάλληλα φυλλόμορφα ή λεπιόμορφα φυλλάκια (βράκτια φύλλα), τα οποία σχηματίζουν το περίβλημα «involucrum» της ταξιανθίας.

Τα κεφάλια αποτελούνται από μονογενή ή διγενή, ακτινόμορφα ή ζυγόμορφα άνθη. Τα ακτινόμορφα άνθη ονομάζονται σωληνοειδή ή επιδίσκια, βρίσκονται συνήθως στο κέντρο της ταξιανθίας (Εικόνα 1A) και έχουν σωληνοειδή στεφάνη που καταλήγει σε πέντε οδόντες και είναι διγενή. Τα σωληνοειδή άνθη φέρουν σχιζογενείς ελαιοφόρους αδένες στερούμενα όμως γαλακτοφόρων αγωγών. Τα ζυγόμορφα άνθη ονομάζονται γλωσσανθή ή επιχείλια. Είναι μονόχειλα, σπάνια δίχειλα, βρίσκονται συνήθως στην περιφέρεια της ταξιανθίας και είναι θήλεα μονογενή (Εικόνα 1A και 1B).



**Εικόνα 1:** Μέρη της ταξιανθίας των φυτών της οικογένειας Asteraceae (<http://www.landcareresearch.co.nz/resources/identification/plants/weedy-daisy-key/asteraceae-in-the-south-pacific>).

Ο κάλυκας τόσο των γλωσσανθών όσο και των σωληνόμορφων ανθέων έχει εξαλλοιωθεί σε λέπια, άκανθες, τρίχες ή σμήριγγες και ονομάζεται «Pappus» (Εικόνα 1B). Στα μονογενή άνθη δεν υπάρχουν στήμονες, ενώ στα διγενή είναι πέντε με ελεύθερα νήματα και ανθήρες ενωμένους σε σωλήνα μέσα από τον οποίο εξέρχεται ο ύπερος με το δισχιδές στίγμα. Τα καρπόφυλλα είναι δύο συμφυή, η ωθήκη μονόχωρη υποφυή, αποτελούμενη από δύο καρπόφυλλα και 1 στύλο με δισχιδές ως επί το πλείστον στίγμα (Εικόνα 1B).

Ο καρπός είναι αχάινιο, με δερματώδες περικάρπιο που συμφύεται πλήρως με το φλοιό του σπέρματος (Στεφανάκη, 1999). Ο πάππος παραμένει συνήθως στον καρπό ως πτητική συσκευή και χρησιμεύει για την μεταφορά του σε μεγάλες αποστάσεις. Τα φυτά είναι ανεμόχωρα ή επιζώχωρα.

Σύμφωνα με την ερευνητική μελέτη του Bremer (1989) στην οικογένεια Asteraceae συμπεριλαμβάνονται δυο υποοικογένειες, όπως φαίνεται αναλυτικά στον Πίνακα 1. Στην η υποοικογένεια των Cichoriaceae καθώς και στις τριττές Mutisieae και Inuleae δεν αντιστοιχούν σε φυσική ομαδοποίηση, επειδή τα μέλη που τις απαρτίζουν δεν είναι στενά συγγενικά μεταξύ τους. Οι άλλες τριττές (tribes) και η υποοικογένεια των Asteroideae θεωρούνται ως ενιαίες φυτικές ενότητες μια και αποτελούν μονοφυλετικές ομάδες (Bremer, 1989), δηλαδή ομάδες των οποίων τα μέλη κατάγονται από έναν και μόνον έναν κοινό πρόγονο και περιέχουν όλους τους απογόνους του εν λόγω προγόνου.

**Πίνακας 1 :** Ταξινόμηση των Asteraceae κατά Bremer (Bremer, 1989).

Οικογένεια	Υποοικογένειες	Τριττός
Asteraceae	Chicorideae	Mutisieae
		Cardueae
		Arctoidaeae
		Lactuceae
		Vernonieae
	Asteroideae	Heleniantheae
		Calenduleae
		Senecioneae
		Anthemideae
		Inuleae
		Astereae

Μεταξύ των φυτών της οικογένειας Asteraceae υπάρχουν αρκετά βιομηχανικά λαχανεύομενα (π.χ. τα φύλλα και η ταξιανθία των ειδών *Cynara sp.*), ζιζάνια, φαρμακευτικά (π.χ. *Echinacea sp.*, *Achillea millefolium*), αρωματικά καθώς και καλλωπιστικά φυτά (π.χ. ντάλια, ζέρμπερες) (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2:** Κατηγοριοποίηση των ειδών της οικογένειας Asteraceae με βάση την χρήση τους (Στεφανάκη, 1999).

Καλλιεργούμενα είδη				
Εστραγκόν ( <i>Artemisia dracunculus L.</i> )	Κνήκος ( <i>Carthamus tinctorius</i> )	( <i>Helianthus sp.</i> )	Αγκινάρα ( <i>Cynara sp.</i> )	Αγκινάρα της Ιερουσαλήμ ( <i>Helianthus tuberosus</i> )
Φαρμακευτικά είδη				
Εχινάκεια ( <i>Echinacea sp.</i> )	Χαμομήλι ( <i>Matricaria chamomilla L.</i> )	Τανάτσετο ( <i>Tanacetum parhenium L.</i> )	Καλεντούλα ( <i>Calendula officinalis L.</i> )	Αχίλλειος ( <i>Achillea millefolium L.</i> )
Αγκινάρα ( <i>Cynara scolymus</i> )	Κνίκος ( <i>Cnicus benedictus</i> )	Αψιθιά ( <i>Artemisia absinthium</i> )	( <i>Arnica Montana</i> )	Νεκρολούλουδο ( <i>Calendula officinalis</i> )
Καρυοφύλλι ( <i>Tanacetum vulgare</i> )	Χαμαιεύκη ( <i>Tussilago farfara</i> )		Χρυσόβεργα ( <i>Solidago vigr-aurea</i> )	
Καλλωπιστικά φυτά				
Εντελθάις ( <i>Leontopodium alpinum</i> )	Κατηφέδες ( <i>Tagetes sp.</i> )	Ντάλιες ( <i>Dahlia sp.</i> )	Ζέρμπερες ( <i>Gerbera sp.</i> )	Χρυσάνθεμα ( <i>Chrysanthemum sp.</i> )
Μαργαρίτες ( <i>Anthemis sp.</i> , <i>Leucanthemum sp.</i> )	Αψιθιά ( <i>Artemisia absinthium</i> )	Αγήρατο ( <i>Ageratum houstonianum</i> )	Ευπατόριο ( <i>Eupatorium cannabinum</i> )	Νεκρολούλουδο ( <i>Calendula officinalis</i> )
Σαντολίνη ( <i>Santolina Chamaecyparissus</i> )		Ασπρολούλουδο ( <i>Bellis</i> )		
Αρωματικά φυτά				
Εστραγκόν ( <i>Artemisia dracunculus L.</i> )	Γερμανικό χαμομήλι ( <i>Matricaria chamomilla L.</i> )		Ρωμαϊκό χαμομήλι ( <i>Anthemis nobilis L.</i> )	
Ζιζάνια				
Γαϊδουράγκαθο ( <i>Carduus sp.</i> )	Γαϊδουράγκαθο ( <i>Cirsium sp.</i> )	Νιτρόφιλο ( <i>Egineron acer</i> )	Νεκρολούλουδο ( <i>Calendula arvensis</i> )	( <i>Calinsonga paviiflora</i> )
Μαρτιάκος ( <i>Senecio vulgaris</i> )		(Chrysanthemum Coronarum)		

Τα φύλα και οι ταξιανθίες ορισμένων φυτών (π.χ. *Cynara sp.*) καταναλίσκονται ως λαχανικά. Σε πολλά φυτά περιέχονται αιθέρια έλαια, βάλσαμα, αλκαλοειδείς ουσίες με ιδιότητες φαρμακευτικές, τονωτικές αντιπυρετικές αντιρρευματικές νευροτονωτικές καθώς και ο πολυσακχαρίτης ινουλίνη με ιδιότητες αντιδιαβητικές. Επιπρόσθετα, τα είδη *Pyretrum cinerariaefolium*, *Inula viscose* και *Inula graveolens* χρησιμοποιούνται για την βιολογική καταπολέμηση επιβλαβών εντόμων εξαιτίας της έντονης μυρωδιάς που αναδίδουν (Στεφανάκη, 1999).

Τέλος, ορισμένα φυτά (π.χ. αψιθιά αγκινάρα) μνημονεύονται για την χρήση τους στην ποτοποιία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η χρήση της αψιθιάς για την παρασκευή του λικέρ αφέντι. Η παρατεταμένη κατανάλωση του ποτού αυτού προκαλεί ψυχικές διαταραχές και θεωρείται λίαν τοξικό του νευρικού συστήματος.

### **1.2.2 Γενικά χαρακτηριστικά του *Achillea millefolium***

Το γένος *Achillea*, που ανήκει σε μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες των ανθοφόρων φυτών, αντιπροσωπεύεται από 115 είδη, εκ των οποίων τα 25 εντοπίζεται στην Ελλάδα (Strid and Tan, 1991). Αρκετά από αυτά χρησιμοποιούνται ως αρωματικά, καλλωπιστικά φυτά ή και για τις βιολογικές τους δραστηριότητες (Mabberley, 1997). Ειδικότερα, το είδος *Achillea millefolium* (Αχιλλεύς) έχει χρησιμοποιηθεί ως φαρμακευτικό βότανο από πολλούς πολιτισμούς, εδώ και εκατοντάδες χρόνια, με αποτέλεσμα σήμερα να χρησιμοποιείται από αρκετές φαρμακοβιομηχανίες (Newall et al., 1996, Blumenthal et al., 2000).

Εκτός από τις θεραπευτικές του ιδιότητες, το φυτό αυτό είναι ιδιαίτερα γνωστό και για την ονομασία του. Όπως υποστηρίζει ο Gray (1950), η ονομασία του γένους *Achillea* αποδίδεται στον όνομα του Ελληνικού ήρωα Αχιλλέα, ο οποίος ανακάλυψε τις θεραπευτικές (επουλωτικές) ιδιότητές του, ενώ το όνομα του τομέα «millefolium» (χίλια φύλλα) αναφέρεται στα φύλλα του, τα οποία διαχωρίζονται σε πολλά λεπτά φυλλάκια. Στην Ευρώπη, η Αχιλλεύς είναι γνωστή ως «yarrow» ή ως χλιοφύλλο (Clapham et al., 1962). Εν τούτοις, στην Ελλάδα, συναντάται με πολυάριθμες, άλλες ονομασίες, ανάλογα με την περιοχή που αυτοφύεται. Οι πιο γνωστές από αυτές είναι Αγριαψιθιά, Πέλινο, Πισιδιά, Σεμεσάντο, Συμηλούδι

καθώς και Λάζαρος γιατί με τα λουλούδια του στολίζονται τα παιδιά που ψάλλουν το Μεγάλο Σάββατο για τη γιορτή του Λαζάρου (McIntyre et al., 1999).

Ο τομέας «millefolium» που αντιπροσωπεύεται από 12 ποικιλίες (Πίνακας 3) είναι ένας πολυετής θάμνος, με ύψος που κυμαίνεται συνήθως από 30 έως 60 cm.

Έχει βλαστούς χνουδωτούς, φύλλα σύνθετα και φυλλάρια σύνθετα, ακιδωτά (Ακουμνιανική και συνεργάτες, 2009). Εξαιτίας των πολλών τριχωμάτων της, το χρώμα της Αχίλλειους είναι πρασινωπό-γκρι (Figuereido and Pais, 1994).

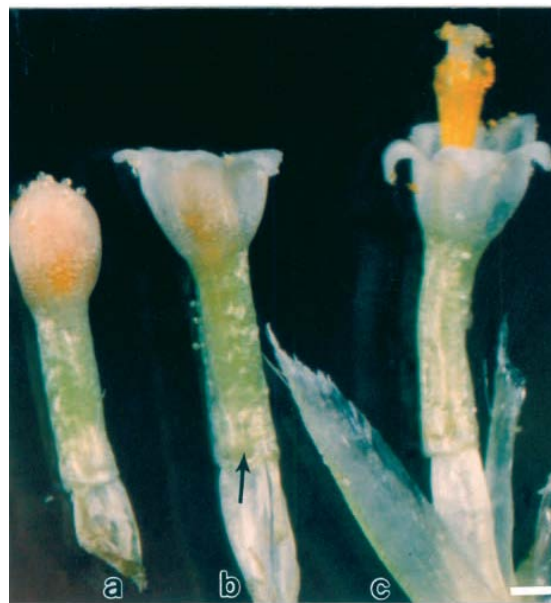
**Πίνακας 3:** Ποικιλίες του είδους *Achillea millefolium* (<http://plants.usda.gov>).

<i>Achillea millefolium</i> var. <i>alpicola</i> yarrow	<i>Achillea millefolium</i> var. <i>arenicola</i> yarrow	<i>Achillea millefolium</i> var. <i>nigrescens</i> yarrow
<i>Achillea millefolium</i> var. <i>borealis</i> boreal yarrow	<i>Achillea millefolium</i> var. <i>gigantea</i> Giant yarrow	<i>Achillea millefolium</i> var. <i>megacephala</i>
<i>Achillea millefolium</i> var. <i>millefolium</i> yarrow	<i>Achillea millefolium</i> var. <i>californica</i> California yarrow	<i>Achillea millefolium</i> var. <i>litoralis</i> coast yarrow
<i>Achillea millefolium</i> var. <i>pacifica</i> Pacific yarrow	<i>Achillea millefolium</i> var. <i>puberula</i> yarrow	<i>Achillea millefolium</i> var. <i>occidentalis</i> western yarrow

Η κεφαλή της ταξιανθίας είναι μονήρης, μικρού έως μέτριου μεγέθους και αποτελείται από 5-6 γλωσσοειδή ανθίδια (ray florets) και 12-24 επιδίσκια (disk florets) (Εικόνα 2). Τα άνθη της είναι άσπρα ενώ σε ορισμένες ποικιλίες μπορεί να είναι και ροζ. Ανθίζει κάθε χρόνο και η ανθοφορία της διαρκεί από τον Μάιο μέχρι τον Οκτώβριο. Τα νεκάρια παρατηρούνται κυρίως στα δισκοειδή ανθίδια, στη βάση της σωληνοειδούς στεφάνης (Εικόνα 3).



**Εικόνα 2:** Ταξιανθία του είδους *Achillea millefolium* (Sulborska and Weryszko-Chmielewska, 2006).



**Εικόνα 3:** Σωληνοειδή ανθίδια του είδους *Achillea millefolium*, σε διάφορα στάδια της άνθησης (a,b,c) (Μαύρο βέλος: θέση νεκταρίων) (Sulborska and Weryszko-Chmielewska, 2006).

Η *Achillea millefolium* σχηματίζει ριζώματα τα οποία βρίσκονται σε μικρό βάθος στο έδαφος. Η διάμετρος των ριζωμάτων κυμαίνεται από 1-6 mm.

Παρουσιάζει υψηλή ταξινομική διαφοροποίηση (μορφολογική και ανατομική) εξαιτίας του σε μεγάλη έκταση υβριδισμού που παρατηρείται στους πληθυσμούς της.



### 1.2.2α Γεωγραφική κατανομή

Σύμφωνα με την πρόσφατη βιβλιογραφική ανασκόπηση, το είδος *Achillea millefolium* L. είναι ευρέως εξαπλωμένο σε όλα τα βρετανικά νησιά όπως και σε όλη την Ευρασία (Ηπειρος Ευρώπης και Ασίας), ενώ από την περιοχή της Μεσογείου και της βόρειας Περσίας επεκτείνεται στον Αρκτικό Κύκλο και πέρα (Clausen et al., 1958, [http://zipcodezoo.com/Plants/A/Achillea\\_millefolium](http://zipcodezoo.com/Plants/A/Achillea_millefolium)) (Εικόνα 4).

Στον Ελλαδικό χώρο, το είδος αυτό έχει εντοπιστεί στη βόρεια Ελλάδα και ειδικότερα στα βουνά της Ροδόπης (Strid and Tan, 1991).



**Εικόνα 4:** Παγκόσμια κατανομή του φυτού *Achillea millefolium* ([http://zipcodezoo.com/Plants/A/Achillea\\_millefolium](http://zipcodezoo.com/Plants/A/Achillea_millefolium)).

Το είδος *Achillea millefolium* L. εντοπίζεται στα βρετανικά νησιά ως αυτοφυές είδος, ενώ στη Βόρεια Αμερική, την Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία θεωρείται ότι έχει εισαχθεί (Clapham et al., 1962). Χαρακτηρίζεται ως ένα από τα πιο κοινά ζιζάνια της Αργεντινής, της Αυστραλίας, του Καναδά, της Αγγλίας, της Γερμανίας, της Χαβάης, του Ιράν, της Σοβιετικής Ένωσης, των Η.Π.Α. και της Ισπανίας (Holm et al., 1979). Υπό τη μορφή αυτή συναντάται επιπρόσθετα στη Χιλή, στην Ινδία, όπως και στη χλωρίδα του Αφγανιστάν, της Αλάσκας και της Πολωνίας.

Στον Ελληνικό χώρο εμφανίζεται ως αυτοφυής βλάστηση κυρίως σε δάση και βοσκοτόπια, ενώ στη Γερμανία, Σερβία, Ουγγαρία, Γαλλία καθώς και σε ορισμένα κράτη της Αφρικής, καλλιεργείται ως καλλωπιστικό φυτό.

Ως καλλωπιστικό φυτό δεν έχει ιδιαίτερες απαιτήσεις, εξαιτίας της καλής προσαρμογής του σε ευρείες εδαφοκλιματικές συνθήκες. Ο πολλαπλασιασμός του είναι σχετικά εύκολος και γίνεται συνήθως με σπόρο. Η μεταφύτευση γίνεται το φθινόπωρο ή την άνοιξη σε αποστάσεις 40-50 επί 60-80 εκ.

Η αποξήρανση του *Achillea millefolium* γίνεται σε σκιερό μέρος, καλά αεριζόμενο και σε θερμοκρασία κάτω από 40 βαθμούς. Έτσι κατά την αποξήρανση το φυτό διατηρεί το φυσικό του χρώμα και δεν μεταβάλλεται η χημική του σύνθεση.

## **1.2.β Ενδιαίτημα-Οικότοπος του *Achillea millefolium***

### **1.2β<sub>1</sub> Κλίμα**

Στη Βόρεια Ευρώπη, η Αχίλλειος μπορεί να αναπτυχθεί σε περιοχές με ποικίλα κλιματικά χαρακτηριστικά. Πιο συγκεκριμένα, οι Clausen et al. (1958) έδειξαν ότι το είδος *A. millefolium* αναπτύσσεται ικανοποιητικά τόσο σε παράκτιες περιοχές της Δανίας, με μέση θερμοκρασία 0°C τον Ιανουάριο και 16°C τον Ιούλιο όσο και στην Σουηδική Λαπωνία, στην οποία η τιμή της μέσης ετήσιας θερμοκρασίας διακυμαίνεται από -15°C έως 11.7°C.

Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξε και ο Reynolds (1961) εξετάζοντας τα κλιματικά χαρακτηριστικά των ενδιαιτημάτων της Αχίλλειους στη Νέα Ζηλανδία. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του ερευνητή, το συγκεκριμένο είδος παρατηρήθηκε σε περιοχές, στις οποίες επικρατούσαν ξηροθερμικές συνθήκες (μέση ετήσια βροχόπτωση: 600 έως 800 mm και μέση ετήσια θερμοκρασία: 10°C έως 12.5°C) καθώς και σε περιοχές με υγρές και ψυχρές συνθήκες, όπου η τιμή της μέσης ετήσιας βροχόπτωσης κυμαίνονταν από 800 έως 1200 mm και η αντίστοιχη της θερμοκρασίας από 7.5°C έως 10°C.

### 1.2β<sub>2</sub> Φυτοκοινότητες

Το είδος *Achillea millefolium* L. εμφανίζεται σε μια ευρεία ποικιλία ενδιαιτημάτων στη Νέα Ζηλανδία, όπως σε καλλιεργούμενα εδάφη με ανοιξιάτικα και χειμερινά σιτηρά (McCaskill, 1947), μπιζέλια, φασόλια, τεύτλα και καλλιέργειες τριφυλλιού (Bourdlot et al., 1979) πολυετείς καλλιέργειες (π.χ. μηδική) (Matthews, 1975) και μέντα (Bourdlot et al., 1979). Επίσης, εντοπίζεται συχνά σε βοσκότοπους (Fenner, 1978), σε κήπους με γρασίδι (Garthwaite, 1930, Levy, 1931), ενώ φυτρώνει και στις άκρες επαρχιακών δρόμων (Matthews, 1975).

Ως ζιζάνιο εμφανίζεται κυρίως σε καλλιεργούμενα εδάφη με σιτηρά (Hilgendorf and Calder, 1952), διαμορφώνοντας πυκνές συστάδες, σε περίπτωση που η εξάπλωσή του δεν έχει αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά πριν τη σπορά τους.

### 1.2.β<sub>3</sub> Εδαφικές απαιτήσεις

Ερευνητικές μελέτες των Reynolds (1961) και Clapham et al. (1962) στη Νέα Ζηλανδία και στην Αγγλία, αντίστοιχα έδειξαν, ότι το είδος *A. millefolium* αναπτύσσεται ικανοποιητικά σε εδάφη με διαφορετικό βαθμό γονιμότητας, δηλαδή από «φτωχά» έως «πλούσια» εδάφη σε σχέση με τη συγκέντρωση των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων. Ωστόσο, μεταγενέστερη έρευνα του Hanf (1974) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η ανάπτυξη της Αχιλλειούς ευνοείται περισσότερο σε γόνιμα εδάφη, με ουδέτερη αντίδραση. Σε παρόμοια αποτελέσματα οδηγήθηκαν οι Scott and Maunsell (1974), οι οποίοι παρατήρησαν ότι η Αχιλλειός εντοπίζεται πιο συχνά σε οργανικά λιπασμένα εδάφη καθώς και σε βοσκόμενα λιβάδια.

Όσον αφορά τη χημική σύσταση των εδαφών, οι Mukula et al. (1969) παρατήρησαν ότι σε καλλιεργούμενα εδάφη με ανοιξιάτικα σιτηρά στην Φιλανδία, η ανθοφορία της *A. millefolium* L. έλαβε χώρα σε εδάφη με χονδρόκοκκη έως και λεπτόκοκκη σύσταση, όπως και σε οργανικά εδάφη. Εντούτοις, οι ανώτεροι ερευνητές επισημαίνουν ότι η ανάπτυξη της Αχιλλειούς ευνοείται επί το πλείστον σε αμμώδη, λιπασμένα εδάφη.

Εκτός από την ευρεία προσαρμοστικότητα σε ποικίλες εδαφοκλιματικές συνθήκες, η Αχιλλειός μνημονεύεται και για την ανθεκτικότητά της στην ξηρασία (Lambert, 1963). Η ικανότητα της αυτή αποδίδεται κυρίως στο βαθύ και εκτεταμένο

ριζικό της σύστημα, το οποίο επιτρέπει την εκμετάλλευση του αποθηκευμένου εδαφικού νερού σε βαθύτερους ορίζοντες, σε συνθήκες έντονης ξηρασίας.

### **1.2.γ Μορφολογία φύλλων**

Η μορφολογία των φύλλων του είδους *Achillea millefolium*, έχει μελετηθεί εκτενώς από τον Boudriot (1980) και τα πιο σημαντικά συμπεράσματα της διδακτορικής του μελέτη παρουσιάζονται στην παρούσα υποενότητα.

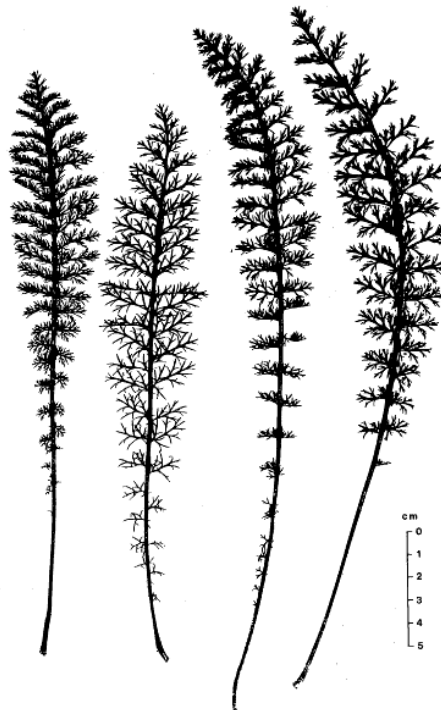
Ο Boudriot (1980) μελετώντας την μορφολογία των φύλλων του φυτού *Achillea millefolium*, στη Νέα Ζηλανδία, παρατήρησε ότι το μέγεθος, των εξεταζομένων φυτικών δειγμάτων, το πάχος τους, η παρουσία μίσχου (έμμισχα φύλλα) το πλάτος και ο προσανατολισμός των φυλλαρίων επηρεάζονται σημαντικά από την περιοχή ανάπτυξης της Αχίλλειους και τις επικρατούσες τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

Αναλυτικότερα, ο ερευνητής παρατήρησε ότι τα φύλλα των φυτών, τα οποία αναπτύχθηκαν σε θέσεις με έντονο και άπλετο φως ήταν παχύτερα συγκριτικά με τα αντίστοιχα σε πιο σκιερά μέρη, χαρακτηρίζονταν από την απουσία μίσχου (άμισχα φύλλα) και το μήκος τους υπερέβαινε τα 17 cm (Εικόνα 5 και 6).

Αντίθετα, στα σκιερά μέρη, ο μίσχος των φύλλων του βλαστού και της ταξιανθίας είναι ευδιάκριτος, με μήκος το οποίο προσεγγίζει το 1/3 του αντίστοιχου των φύλλων. Υπό τις συνθήκες αυτές, τα φυλλάρια των φύλλων είναι πιο στενά και πιο λεπτά σε σχέση με αυτά των φυτών που έχουν αναπτυχτεί σε ηλιόλουστες θέσεις καθώς και χνουδωτά στην αφή.



**Εικόνα 5:** Φύλλα του *Achillea millefolium* με διαφορετικά μήκη, αναπτυσσόμενα σε ηλιόλουστα μέρη (Boudriot, 1980).



**Εικόνα 6:** Φύλλα του *Achillea millefolium* με διαφορετικά μήκη, αναπτυσσόμενα σε σκιερά μέρη (Boudriot, 1980).

### 1.2.3 Λαογραφικά και ιστορικά στοιχεία του *A. millefolium*

Σύμφωνα με ιστορικές αναφορές το όνομα του φυτού αυτού, θεωρείται ότι προέρχεται από τον Ελληνικό ήρωα Αχιλλέα. Πιο συγκεκριμένα, ο θρύλος λέει πως η Αχιλλείος φύτευσε από την σκουριά που έπεσε στο χώμα από το δόρυ του Αχιλλέα για να θεραπεύσει πολλούς συντρόφους του στον Τρωικό πόλεμο (Εικόνα 7).

Βάση ενός άλλου μύθου υποστηρίζεται ότι όταν ο Αχιλλέας πληγώθηκε στη φτέρνα από το δηλητηριασμένο βέλος του Πάρι, η θεά Αφροδίτη κλαίγοντας τον συμβούλεψε να πάρει την Αχιλλείο που χαρακτηρίζονταν τότε ως το καλύτερο βότανο για την epούλωση των πληγών. Από αυτόν τον μύθο η Αχιλλείος έχει πάρει το όνομά της καθώς και άλλες ονομασίες όπως το «Δάκρυ της Αφροδίτης», το «χαμόγελο της Αφροδίτης».

Ένας άλλος μύθος λέει πως ο Αχιλλέας διδάχτηκε τις φαρμακευτικές ιδιότητες της Αχιλλείος για την θεραπεία των πληγών ειδικότερα από τον δάσκαλο Χείρωνα.



**Εικόνα 7:** Σχηματική αναπαράσταση της χρήσης του φυτού *Achillea millefolium* στην αρχαιότητα (<http://www.sacredearth.com/ethnobotany/plantprofiles/yarrow.php>).

Οι Δρυίδες έδωσαν στην Αχιλλείο πολλές ιερές δυνάμεις και την χρησιμοποιούσαν για να προβλέψουν τον καιρό. Οι μίσχοι της Αχιλλείος χρησιμοποιούνταν για τη μαντεία από τους αρχαίους Κινέζους. Το I Ching ή Βιβλίων των Αλλαγών, είναι επίσης γνωστό ως το Μαντείο του Μίσχου της Αχιλλείος (McIntry et al., 1999).

Πολλές λαϊκές παραδόσεις αποδίδουν στην Αχίλλειο πολλές ισχυρές και μαγικές δυνάμεις και την αφιερώνουν στον Άγιο Ιωάννη τον βαπτιστή. Πολλοί λαοί κρεμούσαν την Αχίλλειο στις εξώπορτες των σπιτιών τους και στις εκκλησίες την παραμονή της γιορτής του Ιωάννη του βαπτιστή. Μετά την δύση του Ηλίου έκαιγαν την Αχίλλειο σε λατρευτικές πυρές, τις φωτιές του Αϊ Γιάννη.

Όπως το δόρυ σκότωσε τον Αχιλλέα έτσι και η Αχίλλειος θεωρείται ότι μπορεί να είναι βλαβερή, αφού μνημονεύεται ότι σχετίζεται με κακά πνεύματα. Στην αρχαιότητα, οι μάγισσες χρησιμοποιούσαν το φυτό αυτό στα μαγικά φίλτρα που έφτιαχναν, τα οποία ονομάζανε «παιχνίδια του διαβόλου». Επιπρόσθετα, λαϊκές παραδόσεις υποστηρίζουν ότι ένα κλαδάκι Αχίλλειου, κρεμασμένο πάνω από την κούνια βρέφους μπορεί να κρατήσει τα κακά πνεύματα μακριά του.

Τα παλιά χρόνια ο κόσμος σεβόταν τις θεραπευτικές ιδιότητες της Αχίλλειος γι' αυτό και την αποκαλούσε «το ιώδιο των αγρών».

Τον Μεσαίωνα έτριβαν λίγο από τα φύλλα της Αχίλλειος για να σταματήσουν τις ημικρανίες από την υπέρταση, αλλά και την ρινορραγία γαργαλώντας τις εσωτερικές μεμβράνες της μύτης με ένα φύλλο. Έτσι, η Αχίλλειος ονομάστηκε nosebleed - μάτωμα μύτης. Επίσης, η Αχίλλειος πήρε το όνομα «θερμοβότανο» εξαιτίας της αντιπυρετικής ιδιότητάς της.

Η Αχίλλειος έχει άμεση σχέση με τον έρωτα γι' αυτό στους γάμους αποτελούσε παράδοση να τρώνε Αχίλλειο και να την τοποθετούν στην ανθοδέσμη της νύφης. Πίστευαν πως η Αχίλλειο εξασφάλιζε στους νεόνυμφους, τουλάχιστον μια επταετία στον έγγαμο βίο τους. Γι' αυτό το φυτό είναι γνωστό και ως «επταετής έρωτας».

Ο Διοσκουρίδης ο Αναζαρβέας (1<sup>ος</sup> μ.Χ. αιώνας) την χρησιμοποίησε σαν αιμοστατικό. Επίσης το χρησιμοποιούσαν από πολύ παλιά σαν αιμοστατικό για να σώσουν τραυματίες στα πεδία μάχης και για να ρίξουν τον πυρετό τους. Οι Αγγλοσάξονες ονόμασαν την Αχίλλειο «επισκευαστή σωμάτων» και οι Ινδιάνοι της Αμερικής εκτιμούσαν την ικανότητα να γιατρεύει πληγές και τραύματα.

Ένας νοσοκόμος του 1<sup>ου</sup> παγκόσμιου πολέμου διηγιόταν τον τρόπο που γιάτρευε τις πληγές δεκάδων στρατιωτών σε στιγμές όπου δεν υπήρχε άλλου είδους περίθαλψη, παρά μόνο η Αχίλλειος.

Στην Γερμανία τον 16<sup>ο</sup> αιώνα έριχναν στα βαρέλια του κρασιού σπόρους Αχίλλειους για να διατηρούνται καλύτερα τα κρασιά. Στις βόρειες χώρες χρησιμοποιούσαν την Αχίλλειο αντί του λυκίσκου για την μύρα.

Στην Ιρλανδία το 19<sup>ο</sup> αιώνα πίστευαν πως η Αχίλλειος έφερνε καλοτυχία επειδή ήταν το πρώτο φυτό που έκοψε ο Ιησούς όταν ήταν παιδί. Σύμφωνα με λαϊκή πεποίθηση, όποιος έβλεπε στο όνειρο του να μαζεύει Αχίλλειο για να θεραπεύσει κάποιον, σύντομα θα μάθαινε ευχάριστα νέα. Επίσης, πίστευαν πως η Αχίλλειος γιάτρευε πληγωμένες και ραγισμένες από έρωτα καρδιές.

Οι επουλωτικές της ιδιότητες της Αχίλλειους είναι γνωστές εδώ και αιώνες για τις, γι' αυτό και στην Σκοτία παρασκεύαζαν μια παραδοσιακή αλοιφή για την επούλωση πληγών.

Στις μέρες μας η Αχίλλειος χρησιμοποιείται πολύ στην αρωματοποιία, βοτανοθεραπεία και στην αρωματοθεραπεία (Saeidnia et al., 2011).



## 1.2.4 Χημικές και φυσικές ιδιότητες του *A. millefolium*

### 1.2.4α Γενικά

Η πλειοψηφία των φυτοχημικών μελετών στα είδη του γένους *Achillea* έχουν δείξει ότι πολλά από τα συστατικά τους είναι ιδιαίτερα βιοδραστικά. Ειδικότερα, οι Si et al. (2006), αναφέρουν ότι από τα είδη του γένους *Achillea* έχουν απομονωθεί γύρω στις 40 χημικές ουσίες, οι οποίες κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες:

- ▶ Τερπενοειδή (μονοτερπένια, σесκιτερπένια, τριτερπένια, διτερπένια)
- ▶ Φλαβονοειδή
- ▶ Λιγνάνες
- ▶ Ταννίνες
- ▶ Διάφορα (π.χ. λιπαρά οξέα, παράγωγα αμινοξέων, alkalimides).

Τα βιομόρια αυτά είναι γνωστά ως δευτερογενείς μεταβολίτες, επειδή προέρχονται από ενδιάμεσες ενώσεις του πρωτογενούς μεταβολισμού και συντίθενται μέσω βιοχημικών οδών που στο σύνολο τους συνιστούν τον δευτερογενή μεταβολισμό.

Η παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών αποτελεί μια συντονισμένη και ολοκληρωμένη δραστηριότητα των φυτικών οργανισμών η οποία συνδέεται στενά με την ικανότητα διαφοροποίησης δηλαδή τον μηχανισμό δημιουργίας εξειδικευμένων κυττάρων. Κατά συνέπεια, η ικανότητα επομένως κάθε φυτού να παράγει τους μεταβολίτες αυτούς ακολουθεί ένα ιδιαίτερο πρότυπο στο χώρο και στο χρόνο (Καραμπουνιώτης, 2003).

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά της ομάδας των δευτερογενών μεταβολιτών είναι τα εξής:

- ▶ Ο συνολικός αριθμός τους υπερβαίνει κατά πολύ εκείνο των πρωτογενών μεταβολιτών.
- ▶ Οι μεταβολίτες αυτοί προέρχονται από ενδιάμεσες ενώσεις του πρωτογενούς μεταβολισμού (π.χ. ακετυλοσυνένζυμο-Α, ορισμένα αμινοξέα κ.ά.)

- ▶ Η σύνθεση και συσσώρευσή τους αποτελεί μια συντονισμένη και ολοκληρωμένη δραστηριότητα των φυτικών κυττάρων που συνδέεται στενά με την ικανότητα διαφοροποίησης.
- ▶ Πολυάριθμα παρακλάδια του δευτερογενούς μεταβολισμού λειτουργούν αποκλειστικά ή ενισχύονται μόνο σε ορισμένες οικογένειες φυτών.

Αναλυτικότερες πληροφορίες για τον ρόλο της κάθε υποκατηγορίας των δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν ανιχνευτεί στην Αχίλλειο παρουσιάζονται στο κεφάλαιο.

#### **1.2.4β Αιθέρια έλαια**

Τα αιθέρια έλαια είναι μίγματα πτητικών ουσιών που προσδίδουν σε κάθε φυτό που τα παράγει την χαρακτηριστική του οσμή. Ουσιαστικά πρόκειται για τερπενικές ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους, οι οποίες είναι υγρές σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και δεν έχουν καμία σχέση με τα λίπη και τα έλαια.

Η έκκριση των αιθέριων ελαίων δημιουργούν στα φύλλα μια επικάλυψη που συμβάλλει στην ελάττωση της υπερθέρμανσης και στον περιορισμό της διαπνοής στην προστασία των φυτών από υψηλές θερμοκρασίες και το ψύχος, στην αντοχή των φυτών στην ξηρασία, στην epούλωση των πληγών τους και πιθανόν να διαδραματίζουν και άλλους σημαντικούς ρόλους συμμετέχοντας στις διάφορες λειτουργίες των φυτών. Αναστέλλουν τη φύτευση των σπερμάτων άλλων φυτών δημιουργώντας γύρω από το φυτό που τα παράγει ένα μικροπεριβάλλον χωρίς ανταγωνισμό στην πρόσληψη νερού και θρεπτικών από το έδαφος. Δημιουργούν στην επιφάνεια των φυτικών οργάνων μια "ασπίδα" που απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία και προστατεύει τον πυρήνα των κυττάρων και τους χλωροπλάστες από βλάβες (Μποζαμπαλίδης, 2008).

Τα αιθέρια έλαια παράγονται σε ειδικούς εκκριτικούς σχηματισμούς των φυτών, τους ελαιαδένες. Οι βασικοί τύποι ελαιαδένων είναι οι αδενώδεις τρίχες, οι ελαιοφόροι αγωγοί, οι ελαιοφόρες κοιλότητες και τα ελαιοφόρα ιδιόβλαστα κύτταρα. (Μποζαμπαλίδης, 2008).

Στην οικογένεια Compositae, όπως και σε πολλές άλλες (π.χ. Lamiaceae, Geraniaceae, Solanaceae Cannabaceae), τα αιθέρια έλαια εκκρίνονται από τις

αδενώδεις τρίχες που καλύπτουν τα εναέρια τμήματα των φυτών για αμυντικούς σκοπούς (Buchanan et al., 2000).

Η σύσταση του αιθέριου ελαίου εξαρτάται, εκτός βέβαια του πρωταρχικού που είναι ο γενετικός παράγοντας (είδος, υποείδος, ποικιλία κλπ), από τον εντοπισμό τους στα διάφορα μέρη του φυτού, το στάδιο οντογένεσης του φυτού, αν είναι στην αρχή ή σε πλήρη ανθοφορία στο στάδιο της σποροπαραγωγής κλπ. Επίσης σημαντικοί παράγοντες θεωρούνται η εποχή του έτους αλλά και η ώρα της συγκομιδής. Γι' αυτό οι Κατσίωτης και Χατζοπούλου (2010), επισημαίνουν ότι τα φυτικά υλικά προς απόσταξη πρέπει να συλλέγονται σε ορισμένη περίοδο του οντογενετικού τους κύκλου, κάτω από ειδικές κλιματολογικές συνθήκες και σε ορισμένες ώρες της ημέρας (χάραμα, μεσημέρι, απόγευμα).

Για το υπό μελέτη είδος, η περίοδος της ανθοφορίας θεωρείται η κατάλληλη εποχή (καλοκαίρι) για την συγκομιδή της, γιατί τότε αποστάζονται από τα άνθη της τα περισσότερα αιθέρια έλαια. Επί το πλείστον, η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα τις πρωινές ώρες, εξαιτίας την υψηλότερης συγκέντρωσής τους στις ανθισμένες ταξιανθίες του *Achillea millefolium*.

Τα αιθέρια έλαια από τα άνθη της Αχίλλειους, παραλαμβάνονται με απόσταξη με ατμό. Βάση των McIntry et al. (1999), πρόκειται για ένα σκούρο πράσινο-μπλε διάλυμα με φρέσκια δροσερή, γλυκιά αλλά στυφή οσμή και με ελαφρώς πικρή γεύση. Χημικές αναλύσεις των Smelcerovic et al. (2010), αναφέρουν ότι το υψηλότερο ποσοστό (>64%) των ολικών αιθέρων ελαίων από τα εναέρια τμήματα του *Achillea millefolium* αντιπροσωπεύεται από μονοτερπνοειδή, ενώ τα σεσκιτερπένια αντιπροσωπεύουν μόνο το 11,1% των ανιχνευμένων ουσιών (Πίνακας 4). Στα συστατικά αυτά αποδίδεται μέρος των θεραπευτικών ιδιοτήτων των αιθέριων ελαίων της για τις οποίες μνημονεύεται (π.χ. αντι-αλλεργιογόνο, αντιφλεγμονώδης, σπασμολυτική δράση).

**Πίνακας 4:** Σύσταση αιθέριων ελαίων των εναέριων τμημάτων του φυτού *Achillea millefolium*, προσδιοριζόμενα με τις μεθόδους φασματομετρίας GC, GC-MS, LC-MS και <sup>13</sup>C NMR (Smelcerovic et al., 2010).

a-Pinene	a-Terpmeol
Camphene	β-Caryophyllene
Sabinene	(Z)-β-Farnesene
β-Pinene	Humulene
p-Cymene	Germacrene D
1,8-Cineole	α-Muurolene
γ-Terpinene	Cadina-3,9-diene
Camphor	fl-Elemol
Borneol	Caryophyllene oxide
Terpinen-4-ol	Endesma-7(11)-en-4-ol
	Hexahydrofarnesyl acetone

Το υδροδιάλυμα που παραλαμβάνεται από την απόσταξη μαζί με το αιθέριο έλαιο είναι εξίσου θεραπευτικό. Η μυρωδιά του είναι άγρια και δυνατή που μοιάζει όμως περισσότερο με την οσμή των λουλουδιών παρά με την αντίστοιχη του αιθέριου ελαίου.

### 1.2.5 Χρήσεις του *A. millefolium*

Η Αχίλλειος είναι ένα φυτό της ελληνικής χλωρίδας, με ποικίλες εφαρμογές τόσο στην ιατρική για τις θεραπευτικές της ιδιότητές της, όσο και σε γενικότερους τομείς, όπως στην λαχανοκομία, υπό την μορφή βρώσιμου λαχανικού (φυλλώδες μέρος της).

Στην παρούσα διατριβή, οι θεραπευτικές και μη ιδιότητες, του υπό μελέτη φυτού παρουσιάζονται αναλυτικά στις υποενότητες 1.2.5α και 1.2.5β αντίστοιχα.

#### 1.2.5α Μη θεραπευτικές

Τα φύλλα και τα άνθη της Αχίλλειους μπορεί να χρησιμοποιηθούν ποικιλοτρόπως, παρουσιάζοντας ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών από καλλυντικό έως φαρμακευτικό βότανο.

Στην κατασκευή των κήπων, η *Achillea millefolium* είναι πολύ διαδεδομένη ως φυτό «μπορντούρας», ενώ οι ανθισμένες ταξιανθίες με τα ιδιαίτερα χρώματα της χρησιμοποιούνται στην ανθοδετική για την δημιουργία ανθοδεσμών με φρέσκα ή αποξηραμένα λουλούδια. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σαν χλοοτάπητας λαμβανομένου υπόψη ότι πολλαπλασιάζεται εύκολα από τις ρίζες της και είναι ανθεκτική στα πατήματα.

Σε ορισμένες περιοχές του Καναδά, η *Achillea millefolium* χρησιμοποιείται στη βελτίωση των εδαφών, προστατεύοντας τα επικλινή εδάφη από τη διάβρωση. Η ιδιότητά της αυτή αποδίδεται στο ριζικό της σύστημα (ριζώματα), με το οποίο επιτυγχάνεται η σταθεροποίηση του εδάφους, ως αποτέλεσμα της ταχείας εξάπλωσης της (Small et al., 2000).

Γνώστη είναι και η χρήση της Αχίλλειους στη διατροφή των αγροτικών ζώων (αιγοπρόβατα και πουλερικά), παρόλη την πικρή γεύση της. Στα βοοειδή, συνίσταται η αποφυγή της χρήσης της στο σιτηρέσιο τους εξαιτίας της πιθανής αλλοίωσης της γεύσης του αγελαδινού γάλακτος.

Στη διατροφή του ανθρώπου τα φύλλα της Αχίλλειους μπορούν να καταναλωθούν ως φρέσκα στις σαλάτες είτε να γίνουν σούπα, η οποία παρόλη την πικρή της γεύσης χαρακτηρίζεται ως ιδιαίτερα δυναμωτική.

Επιπρόσθετα, τα άνθη της χρησιμοποιούνται στην ποτοποιία, για τον αρωματισμό ορισμένων λικέρ, ενώ τα φύλλα της μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν υποκατάστατο του λυκίσκου για γεύση και συντηρητικό για την μπύρα.

Η Αχίλλειος μνημονεύεται και για την τονωτική-μαλακτική δράση της στο τριχωτό της κεφαλής.

Πρόσφατα, οι Kiumarsi et al. (2009), διαπίστωσαν ότι η *A. millefolium* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια νέα φυσική χρωστική για την βαφή μάλλινων ινών, λόγω της παρουσίας των φλαβονοειδών luteolin και arigenin στους φυτικούς ιστούς της.

Τέλος, η Αχίλλειος περιέχει ορισμένες ενώσεις με εντομοκτόνο δράση, στις οποίες αποδίδονται οι απωθητικές ιδιότητες της έναντι επιβλαβών εντόμων. Γι' αυτό τον λόγο, μερικοί γεωπόνοι την φυτεύουν σε κήπους, με σκοπό την απώθηση μυρμηγκιών, ορισμένων ειδών μυγών και κολεόπττερων.

### **1.2.5β Θεραπευτικές**

Οι θεραπευτικές ιδιότητες των φαρμακευτικών φυτών καθορίζονται από την παρουσία στα όργανα των δραστικών συστατικών που έχουν φυσιολογική επίδραση στα σώματα των ανθρώπων και των ζώων ή είναι βιολογικά ενεργά ως προς τα παθογόνα αίτια διάφορων ασθενειών.

Όπως αναφέρουν οι Ody (1993) και McIntry et al. (1999), τα χρησιμοποιούμενα όργανα του φυτού *Achillea millefolium* για ιατρικούς σκοπούς είναι οι ανθισμένες ταξιανθίες, το αιθέριο έλαιο τους, τα νωπά φύλλα και τα επίγεια ξηρά μέρη του, τα οποία χρησιμοποιούνται με διάφορες μορφές (π.χ βάμμα, κομπρέσα) (Πίνακας 5). Σε αυτά τα όργανα αποδίδονται πλήθος από τις θεραπευτικές ιδιότητες και βιολογικές του δράσεις, οι σημαντικότερες των οποίων κατά τους Saeidnia et al. (2011), παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 5.

**Πίνακας 5:** Εφαρμογές των φυτικών μερών του *Achillea millefolium* (Ody, 1993).

Άνθη	Έγχυμα	Φύλλα	Νωπά
	Εισρόφηση		Κατάπλασμα
Αιθέριο έλαιο	Λάδι μασάζ	Επίγεια μέρη	Έγχυμα
	Εντριβή θώρακα		Βάμμα
			Κομπρέσα

► **Αντισπασμωδική δράση**

Τα φλαβονοειδή και το τερπενοειδές βισαβολόλη που περιέχονται στο είδος *Achillea millefolium* έχουν αποδείχθει ότι έχουν αντισπασμωδική δράση στον ειλεό των πειραματόζων. Μεταξύ των φλαβονοειδών που έχουν απομονωθεί από τα φυτικά μέρη της Αχίλλειους, οι πιο κοινές είναι η γαλανγίνη, η κερσετίνη και η ευπατιλίνη, οι οποίες προκαλούν ισχυρή χαλάρωση του ειλεού (Abu-Niaaj et al., 1996, Hammad and Abdalla, 1997).

Τα ανώτερα ενισχύονται και από τα αποτελέσματα των Babaei et al.(2007), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι το υδροαλκοολικό εκχύλισμα του *Achillea millefolium* αναστέλλει τις ηλεκτρικά επαγόμενες συστολές στον ειλεό ινδικού χοιριδίου. Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξαν και οι Saeidnia et al. (2011), ύστερα από βιβλιογραφική ανασκόπηση των φυτοχημικών και θεραπευτικών ιδιοτήτων των ειδών του γένους *Achillea*. Τέλος, οι Si et al. (2006) παρατήρησαν ότι το υδατικό εκχύλισμα του αιθέριου ελαίου του *Achillea millefolium* έχει εκτός από σπασμολυτική, αντι-αλλιεργόνο και αντιφλεγμονώδη δράση.

► **Αντισπερματογόνο δράση**

Μια ιδιαίτερη ενδιαφέρουσα ιδιότητα του φυτού Αχίλλειο είναι η αντισπερματογόνο δράση του. Οι Montanari et al. (1998), εξέτασαν την επίδραση της χορήγησης υψηλών δόσεων αιθανολικού (200 mg/kg/ ήμερα, για 20 ημέρες) και υδροαλκοολικού εκχυλίσματος (300 mg/kg/ ήμερα, για 30 ημέρες) στην σπερματογενετική ικανότητα ελβετικών ποντικών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των ερευνητών, τα ποντίκια που επεβλήθησαν σε αυτές τις δυο μεταχειρίσεις συγκριτικά με τα αντίστοιχα «μάρτυρες» χαρακτηρίζονταν από αυξημένο αριθμό μεταφάσεων στο βλαστικό επιθήλιο. Το γεγονός αυτό αποδόθηκε στη διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τα συγκεκριμένα φυτικά εκχυλίσματα.

### ► Αντι-ελκώδης δράση

Τα υδατικά εκχυλίσματα του *Achillea millefolium* έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματικότητα στην προστασία του γαστρικού βλεννογόνου από τις οξείες γαστρικές διαταραχές που προκαλούνται από την αιθανόλη και την ινδομεθακίνη καθώς και στην epούλωση χρόνιων πεπτικών διαταραχών που προκαλούνται από το οξικό οξύ ( $ED_{50}=32$  mg/kg, χορήγηση εκ του στόματος). Αναλυτικότερα, οι Cavaicanti et al. (2006) διαπίστωσαν ότι η στοματική χορήγηση (30, 100 και 300 mg/kg) του υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ανέστειλε τις επαγόμενες από την αιθανόλη γαστρικές αλλοιώσεις κατά 35%, 56% και 81%, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, οι Potrich et al. (2010), παρατήρησαν ότι η χορήγηση μικρών δόσεων (1 και 10 mg/kg) υδροαλκοολικού εκχυλίσματος μείωσε το χρόνιο πεπτικό έλκος που προκαλείται από το οξικό οξύ κατά 43% και 65%, αντίστοιχα, συμβάλλοντας παράλληλα και στην αναγέννηση του γαστρικού βλεννογόνου. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την τοξική αντίδραση του στον ανθρώπινο οργανισμό, μετά από μακροχρόνια χρήση των υδατικών του εκχυλισμάτων, καθιστούν την Αχίλλειο ιδιαίτερα αποτελεσματικό βότανο σε παθήσεις του πεπτικού συστήματος.

Χωρίς, να έχει ακόμα επαρκώς τεκμηριωθεί, οι Baggio et al. (2002) υποστηρίζουν ότι η αντι-ελκώδης δράση της Αχίλλειους αποδίδεται στην αναστολή της των γαστρικών εκκρίσεων ή στην αύξηση παραγόντων με προστατευτική δράση του γαστρικού βλεννογόνου, όπως η αύξηση της ροής του αίματος.

### ► Αντιφλεγμονώδη δράση

Η Αχίλλειος διακρίνεται ακόμα και για τις αντιφλεγμονώδεις της ιδιότητες, γεγονός που έχει επιβεβαιωθεί από ιατρικές έρευνες που απέδειξαν πως αυτές οι ιδιότητες οφείλονται εκτός από τις «alkamides» (Greger, 1984) και στα σεσκιτερπένια (Hegazy et al., 2006).

Πρόσφατη ερευνητική μελέτη των Babei et al. (2007) οδήγησε στην απομόνωση νέων χημικών ενώσεων με αντιμικροβιακές ιδιότητες. Αναλυτικότερα, οι ερευνητές εφαρμόζοντας την μέθοδο της χρωματογραφικής ανάλυσης στο υδατικό εκχύλισμα χλωριούχου μεθυλενίου-μεθανολικού εκχυλίσματος, από εναέρια μέρη του *A. coarctata*, απομόνωσαν εκτός από τις ήδη γνωστές ενώσεις



ligustolide-A XXXVIII, arteludovicinolide-A XXXIX και XL austriacin (Σχήμα παραρτήματος 1α) και δύο νέα παράγωγα του οξέος guaiane:

▶ 1α,6α,8α-trihydroxy-5α,7βH-guaia-3,10(14),11(13)-trien-12-oic acid XXXVI

▶ 1α,6α,8α-trihydroxy-5α,7βH-guaia-3,9,11(13)-trien-12-oic acid XXXVII

οι οποίες ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των μακροφάγων κυττάρων που συμβάλλουν στην άμυνα του οργανισμού. Τέλος, παρατήρησαν ότι η ένωση XXXVII καθώς και XXXIX (Σχήμα παραρτήματος 1α, 1β) έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες.

Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξαν και οι Werner et al. (2007), στο είδος *Achillea clypeolata*, ενισχύοντας έτσι την αντιφλεγμονώδη ιδιότητα του υδατικού εκχυλίσματος των φυτών του γένους *Achillea*.

#### ▶ Αντιβακτηριακή δράση

Η αντιβακτηριακή δράση της Αχίλλειους αποδίδεται στις τερπενοειδείς ενώσεις και ειδικότερα στα μονοτερπένια (π.χ βορνεόλη), τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί στο αιθέριο έλαιο της (de Santanna et al., 2009). Πρόσφατη μελέτη των Stojanovic et al. (2007), επιβεβαίωσε την συγκεκριμένη ιδιότητά της μετά από εξέταση, της δράσης των εκχυλισμάτων (εξάνιο: αιθέρας: μεθανόλη, σε αναλογία 1:1:1) από τα εναέρια μέρη των ειδών *A. clavennae*, *A. holosericea* Sm, *A. lingulata*, και *A. millefolium* έναντι πέντε βακτηρίων (*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* και της *Salmonella enteritidis*) και δύο μυκήτων (*A. niger* και *C. albicans*). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των ερευνητών, τα εκχυλίσματα και των τεσσάρων ειδών διέθεταν ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης έναντι όλων τα ελεγχθέντων στελεχών (Stojanovic et al., 2007).

#### ▶ Αιμοστατική δράση

Η Αχίλλειος και ειδικότερα τα επίγεια ξηρά τμήματα του φυτού είναι κατάλληλη για όλα τα είδη αιμορραγίας, εξωτερικά και εσωτερικά. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί εσωτερικά ως αιμοστατικό για αιμορροΐδες που αιμορραγούν, ενώ αντιστρόφως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της εμμηνόρροιας. Χαρακτηρίζεται το βότανο που η μητέρα φύση έχει χαρίσει στις γυναίκες, αφού καλμάρει πολλές γυναικολογικές ανωμαλίες, όπως δυσμηνόρροια (δηλαδή έντονοι πόνοι περιόδου), αμηνόρροια, διαταραχές στην εμμηνόπαυση και σπασμούς μήτρας.

### ► Στυπτική δράση

Η Αχίλλειος μνημονεύεται και για την στυπτική δράση της, η οποία αποδίδεται στις τανίνες. Όπως είναι ήδη γνωστό, οι τανίνες έχουν την ιδιότητα να δημιουργούν ισχυρά σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες (σε φυσιολογικές συνθήκες και να τις κατακρημνίζουν. Ένεκα των ιδιοτήτων αυτών που απορρέουν από την πληθώρα των υδροξυλίων που υπάρχουν σε ένα ευμέγεθες φαινολικό μόριο οι τανίνες έχουν στυπτικές ιδιότητες.

Εκτός από τις ανώτερες ιδιότητες, σημαντικό είναι να αναφερθεί, ότι η Αχίλλειος είναι ένα από τα πιο γνωστά φαρμακευτικά βότανα για τους πυρετούς. Όπως υποστηρίζουν οι McIntry et al. (1999), ένα ζεστό ρόφημα προξενεί θεραπευτικό ιδρώτα που δροσίζει τον πυρετό και απομακρύνει τις τοξίνες. Όπως όλα τα εφιδρωτικά φάρμακα, η Αχίλλειος διευκολύνει την κυκλοφορία του αίματος στο δέρμα και έτσι ρίχνει την πίεση, κάτι που επίσης οφείλεται στις φυτικές χρωστικές της, οι οποίες διευρύνουν τις περιφερειακές αρτηρίες, ενώ ακόμη συντελούν στη διάλυση των θρόμβων.

Σχετικά με τις προφυλάξεις, η ερευνητική κοινότητα υποστηρίζει ότι η χρήση της Αχίλλειους για πολύ μεγάλο διάστημα μπορεί να επιφέρει δερματικά στίγματα, ζαλάδες, θολώσεις και πονοκεφάλους. Σπάνια, η Αχίλλειος μπορεί να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση. Εντούτοις, το αιθέριο έλαιο της Αχίλλειους απαγορεύεται στην εγκυμοσύνη, γιατί είναι διεγερτικό της μήτρας (McIntry et al., 1999).

### **1.2.6 Τριχώματα των φυτών**

Με τον όρο τριχώματα περιγράφονται οι μονοκύτταρες ή πολυκύτταρες δομές της επιδερμίδας, που προέρχονται μόνο από επιδερμικά κύτταρα και αναπτύσσονται εξωτερικά στην επιφάνεια διαφόρων φυτικών οργάνων.

Τα τριχώματα μπορούν να εντοπιστούν σε όλα τα όργανα του φυτού: βλαστητικά (φύλλα, νεαρά στελέχη, κλαδιά και στις ρίζες σε μια μικρή απόσταση πάνω από το κορυφαίο μερίστωμά τους) και αναπαραγωγικά (σέπαλα, πέταλα, στήμονες γυρεόκοκκους σπέρματα και καρπούς). Η λειτουργία των τριχωμάτων, ίσως ποικίλει, ανάλογα με το όργανο στο οποίο εντοπίζονται. Μια επιπρόσθετη διάκριση γίνεται μεταξύ όλων των τριχωμάτων που αναπτύσσονται στα υπέργεια τμήματα του φυτού και σε εκείνα που αναπτύσσονται στα υπόγεια τμήματα του. Τα τριχώματα της πρώτης ομάδας είναι πολύ διαφορετικά στα χαρακτηριστικά, ενώ εκείνα της δεύτερης ομάδας αποτελούνται σχεδόν αποκλειστικά από ριζικά τριχίδια.

Εντούτοις, η κύρια διάκριση των τριχωμάτων γίνεται μεταξύ των αδενωδών και μη αδενωδών τριχωμάτων. Το κύριο χαρακτηριστικό διάκρισης μεταξύ των μη αδενωδών τριχωμάτων είναι η μορφολογία τους. Το κύριο χαρακτηριστικό μεταξύ των τύπων αδενωδών τριχωμάτων είναι συνήθως τα υλικά που εκκρίνουν, συσσωρεύουν ή αφομοιώνουν. Η μορφολογία και η λειτουργία είναι συνήθως χαρακτηριστικά για περαιτέρω κατηγοριοποίηση εντός κάθε ομάδας. (Μποζαμπαλίδης, 2008).

#### **1.2. 6α Μη αδενώδη τριχώματα**

Τα μη αδενώδη τριχώματα ποικίλουν τόσο μορφολογικά όσο και ανατομικά, και κατηγοριοποιούνται με βάση των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών. Μπορεί να είναι μονοκύτταρα ή πολυκύτταρα ενώ και οι δυο τύποι μπορεί να φέρουν ή όχι διακλαδώσεις. Τα πολυκύτταρα χωρίς διακλαδώσεις τριχώματα μπορεί να αποτελούνται από μια ή πολλές σειρές κυττάρων (μονόσειρα, δίσειρα ή πολύσειρα, αντίστοιχα). Μπορεί να ποικίλουν σε μήκος, μέγεθος, και σχήμα να είναι συμμετρικά ή ασύμμετρα, ομοιόμορφα ή ανομοιόμορφα σε πλάτος

και να λεπταίνουν ή να αμβλύνουν στην άκρη. Επιπλέον, μπορεί να ποικίλουν σε πάχος και σε σύσταση των κυτταρικών τους τοιχωμάτων (Werker, 2000).

Συχνά στα φύλλα εντοπίζονται περισσότεροι του ενός τύποι μη αδενωδών τριχωμάτων και μάλιστα μερικές φορές σε διαφορετικές θέσεις. Η εξήγηση αυτή αποδίδεται στο γεγονός ότι διαφορετικοί τύποι τριχωμάτων αναπτύσσονται στο ίδιο όργανο και στο ότι ο ιδιαίτερος ρόλος του καθενός δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί (Werker, 2000).

Τα μη αδενώδη τριχώματα θεωρούνται ότι παρέχουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα ενός φυτικού οργανισμού. Στα τριχώματα αυτά κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης τους φαίνεται να συσσωρεύονται δευτερογενείς μεταβολίτες, συνήθως φαινολικές ουσίες οι οποίοι παρέχουν προστασία έναντι παθογόνων αλλά και της υπεριώδους ακτινοβολίας. Επομένως τα στρώματα μη αδενικών τριχωμάτων που καλύπτουν όλα τα υπέργεια όργανα αφενός αποτελούν φράγματα μηχανικής και χημικής προστασίας έναντι εντόμων και παθογόνων, αφετέρου συνιστούν αποτελεσματικά φίλτρα έναντι της υπεριώδους ακτινοβολίας (Καραμπουρνιώτης, 2003). Επίσης, όταν τα μη αδενώδη τριχώματα είναι πυκνά κατανεμημένα δημιουργούν ένα οριακό στρώμα που προστατεύει το φυτό από τις απώλειες ύδατος, προφυλάσσει φυτοφάγα ζώα αλλά και έντομα που θα απέθεταν τα ωά τους για επώαση.

### **1.2.6β Αδενώδη τριχώματα**

Ο όρος αδενώδη τριχώματα αναφέρεται σε μία μεγάλη ποικιλία αδένων. Οι αδένες διαφέρουν στη χημική σύσταση των ουσιών που εκκρίνουν, συσσωρεύουν ή απορροφούν καθώς και στο τρόπο παραγωγής τους, στη δομή τους, στη θέση που εντοπίζονται στο φυτό (ίδιοι αδένες αλλά σε βλαστητικά ή αναπαραγωγικά όργανα) και βέβαια στη λειτουργία τους. Όλα τα παραπάνω εξυπηρετούν στην ταξινόμηση τους. Όπως ισχύει και για τα μη αδενώδη τριχώματα, υπάρχουν μονοκύτταρα ή πολυκύτταρα με μία ή πολλές σειρές κυττάρων.

Μια τυπική αδενώδης πολυκύτταρη τρίχα αποτελείται από: 1. Μία εκκριτική κεφαλή (secretory head) η οποία περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα εκκριτικά κύτταρα 2. Ένα μίσχο (stalk) μονοκύτταρο ή πολυκύτταρο 3. Ένα ή περισσότερα

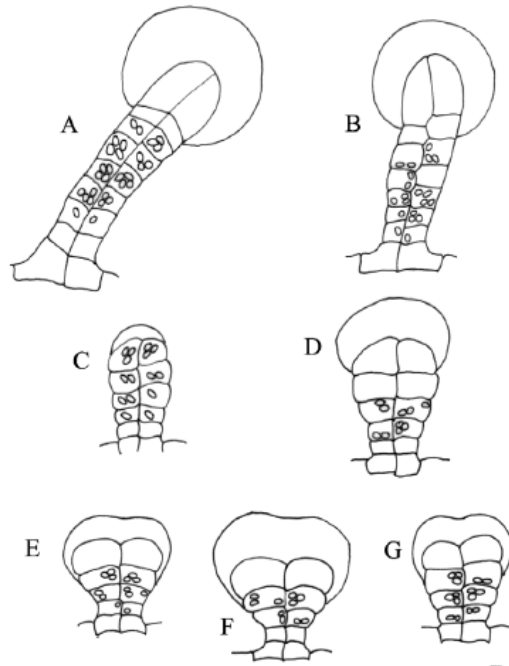
κύτταρα βάσης και 4. Ένα ή περισσότερα κύτταρα λαιμού ανάμεσα στα κύτταρα του μίσχου και της κεφαλής (neck cell (s)) (Εικόνα 6β).

Υπάρχουν όμως πολλές παραλλαγές από την παραπάνω τυπική μορφή, όπως για παράδειγμα η ολοκληρωτική απουσία μίσχου, στις οποίες οφείλεται η μεγάλη ποικιλομορφία των αδενωδών τριχωμάτων. Οι διαφορές μεταξύ των κυττάρων των τριχωμάτων είναι τόσο μορφολογικές όσο και ανατομικές που φτάνουν σε υπομικροσκοπικό επίπεδο (Werker, 2000).

Τα αδενώδη τριχώματα διαφοροποιούνται κυρίως στο μίσχο και στην κεφαλή. Ο μίσχος ποικίλει σε μήκος, και είναι μονοκύτταρος, μονόσειρος ή αποτελείται από λίγες σειρές κυττάρων, ενώ η κεφαλή, η οποία ποικίλει σε μέγεθος, είναι σφαιρική ή ελλειψοειδής, ή διαφορετικού σχήματος, και αποτελείται από ένα ή πολλά κύτταρα. Σε εκείνες τις περιπτώσεις, στις οποίες η κεφαλή είναι πολυκύτταρη, ίσως διαιρείται μόνο από οριζόντια τοιχώματα, ή μόνο από κάθετα ή και από οριζόντια και κάθετα τοιχώματα (Solereider, 1908).

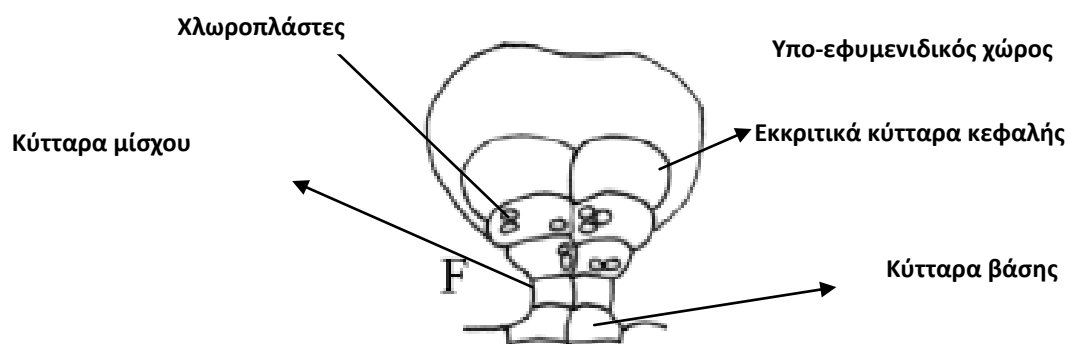
Σε πολλά αδενώδη τριχώματα τα πλευρικά τοιχώματα των κυττάρων του μίσχου ενισχύονται με κουτίνη ή σουβερίνη ή και τα δύο. Η ενίσχυση αυτή λειτουργεί ως «λωρίδα Caspari» αποτρέποντας την αποπλαστική μεταφορά των εκκρινικών υλικών προς την επιδερμίδα (Fahn, 2000, Turner et al., 2000b), ενώ κάποιιοι προτείνουν ότι η ενίσχυση προσφέρει στήριξη στην κεφαλή (Bosabalidis and Tsekos, 1982, Gersbach et al., 2001).

Στην οικογένεια Asteraceae, οι Ciccarrelli et al. (2007) διαπίστωσαν ότι τα αδενώδη τριχώματα σε διάφορα είδη της οικογένειας Asteraceae είναι δίσειρα και απαρτίζονται από 10 κύτταρα (Εικόνα 6α).



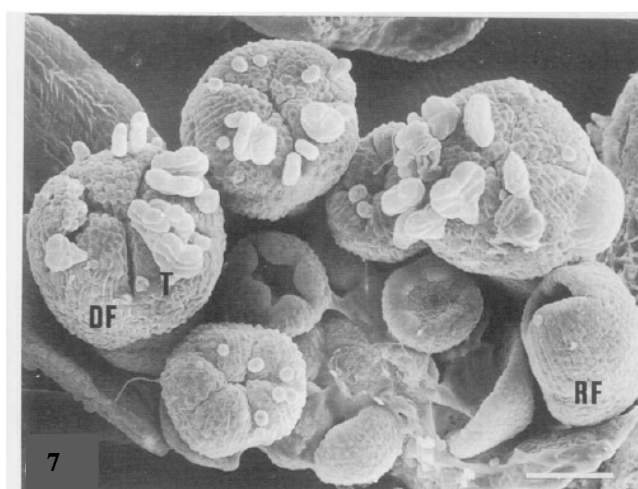
**Εικόνα 6α:** Τύποι αδενωδών τριχωμάτων της ωσθήκης από διαφορά είδη της οικογενείας Asteraceae . Πολυκύτταρα, δίσειρα αδενώδη τριχώματα (A: *Dittrichia viscosa*, B:*Pulicaria dysenterica*, C:*Bellis perrenis*, D:*Eupatorium cannabinum*, E:*Tanatecum parthenium*, F:*Achillea maritima*,G: *Matricaria chamomilla* (Cicarrelli et al., 2007).

Ειδικότερα, στα είδη *Bellis perrenis*, *Tanatecum parthenium*, *Achillea maritima*, *Matricaria chamomilla* και *Eupatorium cannabinum*, η αδενώδης τρίχα αποτελείται από 2 κύτταρα βάσης, 2 κύτταρα μίσχου και 6 κύτταρα κεφαλής. Στα είδη *Bellis perrenis* και *Eupatorium cannabinum* ο αριθμός των κυττάρων της κεφαλής κυμαίνεται από 6-8, ενώ στα είδη *Dittrichia viscosa* και *Pulicaria dysenterica* κάθε σειρά κυττάρων στην κεφαλή απαρτίζεται από 6 έως 9 κύτταρα (Εικόνα 6α). Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των δυο τελευταίων ειδών είναι ο μεγάλος υποεφυμενιδικός χώρος του στην κεφαλή συγκριτικά με το αντίστοιχο των άλλων ειδών (Εικόνα 6α, C, D., E, F. G.).

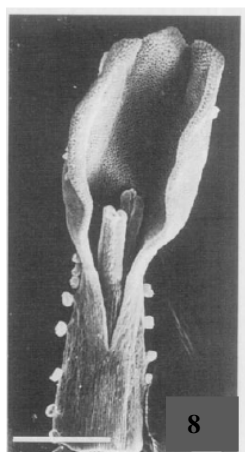


**Εικόνα 6β:** Κατά μήκος τομή του αδενικού τριχωμάτος του είδους *Achillea maritima* (Ciccarelli et al., 2007).

Οι Figueredo and Pais (1994), εξετάζοντας την ανατομία των αδενωδών τριχωμάτων στο είδος *Achillea millefolium*, παρατήρησαν ότι τα αδενώδη τριχώματα εμφανίζονται στα περιφερειακά και δισκοειδή άνθη, στους λοβούς της στεφάνης καθώς και στα φύλλα (Εικόνα 7). Επιπρόσθετα, διαπίστωσαν ότι όταν το μήκος του ανθιδίου φτάσει τα 0,25μm, τότε εμφανίζονται τα πλήρως ανεπτυγμένα αδενικά τριχώματα παράλληλα με αυτά που βρίσκονται στα πρώτα στάδια της ανάπτυξής τους. Επιπρόσθετα, υποστηρίζουν ότι πριν την εμφάνιση των αδενωδών τριχωμάτων στην ωοθήκη, τα αντίστοιχα τριχώματα στην στεφάνη έχουν πλήρως διαφοροποιηθεί (Εικόνα 8).



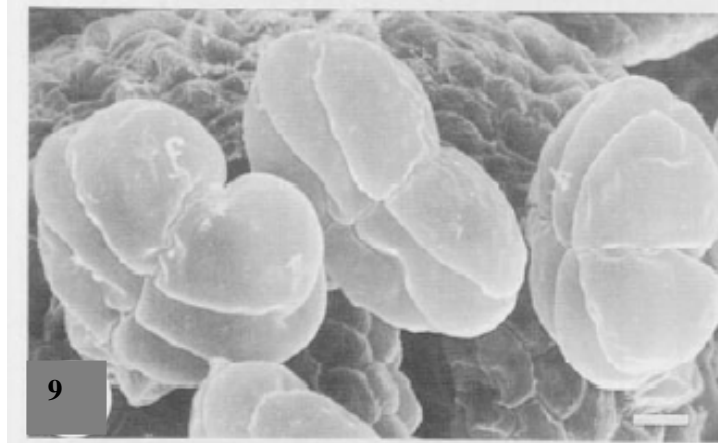
**Εικόνα 7:** Κεφάλιο του *Achillea millefolium* στα αρχικά στάδια της ανάπτυξής του. Ανθίδια επικαλυμμένα με αδενώδη τριχώματα σε διάφορα της στάδια ανάπτυξης τους. (DF:Δισκοειδές άνθος RF: περιφερειακό άνθος).



**Εικόνα 8:** Κατανομή των τριχωμάτων σε πλήρως ανεπτυγμένο περιφερειακό άνθος (Figueiredo and Pais, 1994).

Σε αρκετές περιπτώσεις, η ανάπτυξη του τριχώματος συμβαίνει κατά τα αρχικά στάδια της ανάπτυξης του φύλλου, συνήθως πριν από την ανάπτυξη των στομάτων και σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμα και πριν από την εμφανή διάκριση των φυλλικών καταβολών. Οι Figueiredo and Pais (1994), εξετάζοντας την οντογένεση των αδενωδών τριχωμάτων στην ταξιανθία του είδους *Achillea millefolium*, διαπίστωσαν ότι η ανάπτυξη των τριχωμάτων ξεκινάει πριν την ανάπτυξη των κεφαλίων. Ένα πρωτοδερμικό κύτταρο, διαιρείται αρχικά αντικλινώς και προκύπτει ένα κύτταρο βάσης και ένα ακραίο κύτταρο. Στη συνέχεια αυτά υποδιαιρούνται με τη δημιουργία ενός κεκλιμένου και ενός περικλινούς κυτταρικού τοιχώματος αντίστοιχα. Στη συνέχεια μέσω τριών περικλινών διαιρέσεων δημιουργούνται δυο σειρές κυττάρων (Sancho and Katinas, 2002). Σύμφωνα με τους Figueiredo and Pais (1994), στο στάδιο αυτό το μήκος των τριχωμάτων είναι 50μm και το πλάτος τους 70 μm (Εικόνα 7 και 9).

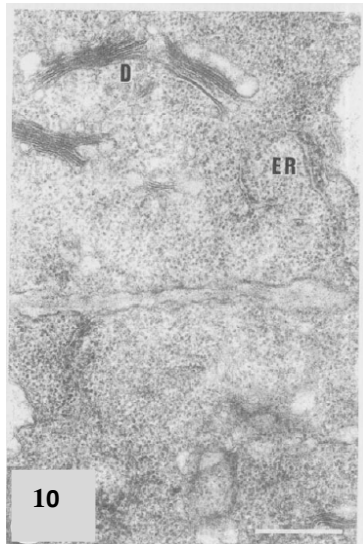




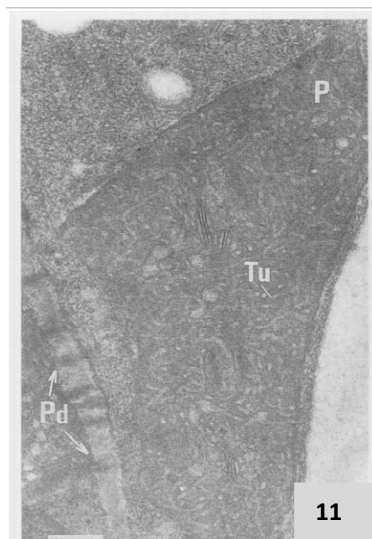
**Εικόνα 9:** Δίσειρα αδενώδη τριχώματα του είδους *Achillea millefolium* (Figueiredo and Pais, 1994).

Στα αδενώδη τριχώματα διακρίνονται τρεις φάσεις ανάπτυξης: η προ-εκκριτική, η εκκριτική και η μετα-εκκριτική (Figueiredo and Pais, 1994).

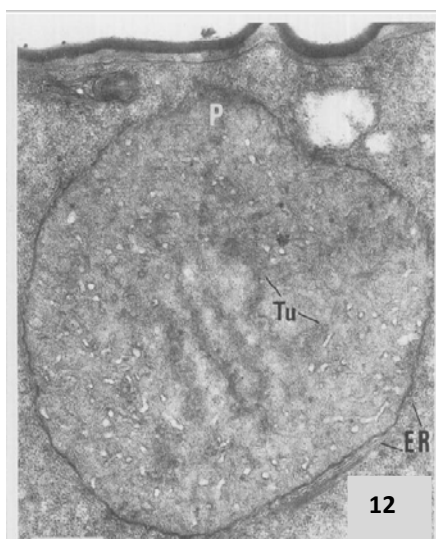
▪ **Προ-εκκριτική φάση.** Η προ-εκκριτική φάση ξεκινάει με την διαφοροποίηση του τριχώματος από ένα απλό πρωτοδερμικό κύτταρο και σταματάει όταν ο αδένας αποκτήσει το τελικό του μέγεθος (δέκα κύτταρα, δίσειρα). Κατά το στάδιο αυτό, τα αδενώδη κύτταρα μοιάζουν με μεριστωματικά κύτταρα. Έχουν μεγάλους πυρήνες στο κέντρο τους, πολυάριθμα μικρά κενοτόπια, μερικά μιτοχόνδρια και πολυάριθμα πολυμορφικά πλαστίδια με σωληνοειδείς διαμορφώσεις (Εικόνα 11). Επιπρόσθετα, παρατηρείται ενδοπλασματικό δίκτυο καθώς και πολλά δικτυοσώματα (Εικόνα 10). Τα πλασμοδέσματα εμφανίζονται συχνά στα κυτταρικά τοιχώματα που συνορεύουν με τα εκκριτικά κύτταρα. Στο τέλος της προ-εκκριτικής φάσης, το σωληνοειδές δίκτυο των πλαστιδίων γίνεται πιο πυκνό και μέρος των ενδοπλασματικών δικτύων εμφανίζεται κοντά σε αυτά τα πλαστίδια (Εικόνα 12) (Figueiredo and Pais, 1994)



**Εικόνα 10:** Ηλεκτρονική μικρογραφία μέρους των αδενωδών κυττάρων του των τριχωμάτων στο στάδιο της προ-εκκριτικής φάσης. Στο κυτόπλασμα εμφανίζονται πολλά δικτυοσώματα (D) καθώς και ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) (Figueredo and Pais, 1994).

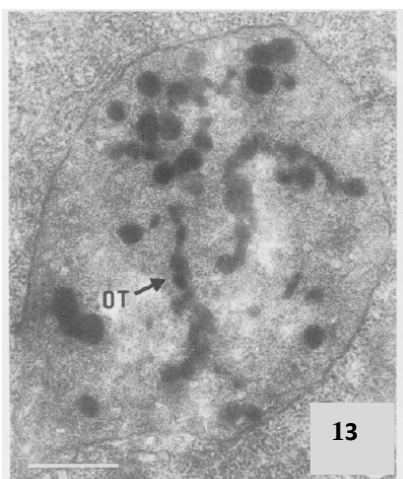


**Εικόνα 11:** Πολυμορφικό πλαστίδιο (P) με σωληνοειδείς διαμορφώσεις του ενδοπλασματικού δικτύου (TU) σε αδενώδες κύτταρο τριχώματος στο στάδιο της προ-εκκριτικής φάσης. Εμφανή πλασμοδέματα (Pd). (Figueredo and Pais, 1994).



**Εικόνα 12:** Ηλεκτρονική μικρογραφία μέρους των αδενωδών κυττάρων του των τριχωμάτων στο τελευταίο στάδιο της προ-εκκριτικής φάσης. Οι σωληνοειδείς δομές (TU) εμφανίζονται μέσα στο πλαστίδιο (P) και γίνονται πιο πυκνές. Μέρος του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) εμφανίζεται πλησίον των πλαστιδίων αυτών (Figueredo and Pais, 1994).

▪ **Εκκριτική φάση.** Στη φάση αυτή, διαφοροποιείται έντονα η δομή των πλαστιδίων συγκριτικά με την αντίστοιχη στην προ-εκκριτική φάση. Δηλαδή, οι πολυάριθμες σωληνοειδείς δομές στα πλαστίδια στην πρώτη φάση μειώνονται αισθητά στη δεύτερη, έχουν οσμοφυλλικό περιεχόμενο και μέρος των ενδοπλασματικών δικτύων βρίσκονται παρακείμενα των πλαστιδίων (Εικόνα 13). Τα δικτυοσώματα και τα μιτοχόνδρια παραμένουν άφθονα.



**Εικόνα 13:** Πλαστίδιο του αδενώδους κυττάρου του τριχώματος στο εκκριτικό στάδιο. Εμφάνιση οσμοφυλλικές σωληνοειδείς διαμορφώσεις (OT) (Figueredo and Pais, 1994). Ορισμένα ενδοπλασματικά δίκτυα εμφανίζονται πλησίον των πλαστιδίων αυτών.

▪ **Μετα- Εκκριτική φάση.** Κατά το στάδιο αυτό, τα παλαιότερα τριχώματα υπόκεινται σε μια βαθμιαία υποβάθμιση των κυτταρικών συστατικών τους, στα ανώτερα κύτταρά τους.

### 1.2.7 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη της δομής του φύλλου της Αχίλλειους (*Achillea millefolium*) με τα διάφορα είδη οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας καθώς και ο ιστοχημικός εντοπισμός των συστατικών του στα διάφορα φυτικά όργανα των φύλλων της.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Συλλογή του φυτικού υλικού

Για την ιστοχημική και μορφολογική μελέτη του φυτού «*Achillea millefolium*» εναέρια τμήματά του (φύλλα) συλλέχτηκαν κατά τους εαρινούς και φθινοπωρινούς μήνες. Μετά από κάθε συλλογή, τα φύλλα μεταφέρονταν στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, και αμέσως γινόταν η κατάλληλη επεξεργασία τους για την παρατήρηση με τα διάφορα είδη μικροσκοπίας.

### 2.2 Προετοιμασία παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το οπτικό μικροσκόπιο (Ο.Μ.)

Τα στάδια της διαδικασίας που ακολουθήθηκε είναι:

- **Κοπή** φυτικών ιστών μεγέθους 1x5 mm, από διάφορες περιοχές του ελάσματος των φύλλων, με ξυραφάκι. Στην περίπτωση των πολύ νεαρών φύλλων (<5mm) αυτά χρησιμοποιήθηκαν ολόκληρα. Η διαδικασία αυτή έγινε μέσα σε τρυβλίο με μονιμοποιητικό στους 4°C.
- **Μονιμοποίηση** (στερέωση, καθήλωση, προσήλωση, fixation), η οποία έχει ως σκοπό την ακινητοποίηση (νέκρωση) όλων των διαδικασιών του κυττάρου. Έγινε με εμβάπτιση των δειγμάτων, σε μονιμοποιητικό διάλυμα Karnovsky (Κεφ. 2.7), χρησιμοποιώντας ως ρυθμιστικό διάλυμα Κακοδυλικό Νάτριο (Κεφ 2.7) (Serva 15540,  $C_2H_6AsO_2Na \cdot 3H_2O$ ) 0,1 M, pH=7,2, και σε φιαλίδιο των 5 ml για 2-3 h στους 4°C. Ύστερα από παραμονή 1h στο μονιμοποιητικό διάλυμα, δημιουργήθηκε κενό αέρος στο φιαλίδιο, ώστε να αφαιρεθεί ο αέρας από τους μεσοκυττάριους χώρους και να διευκολυνθεί η διάχυση – διείδυση του μονιμοποιητικού, στο εσωτερικό των ιστών.
- **Έκπλυση** των δειγμάτων με ρυθμιστικό διάλυμα 3 φορές, από 15 min κάθε φορά.
- **Μεταστερέωση** με  $OsO_4$  1% σε νερό για 2 h.
- **Έκπλυση** με ρυθμιστικό διάλυμα 3 φορές από 15 min κάθε φορά.

- **Αφυδάτωση** με αιθυλική αλκοόλη 30% και 50% από 15 min. Κατά το στάδιο αυτό, γίνεται αντικατάσταση του νερού του μονιμοποιημένου δείγματος με αιθυλική αλκοόλη.
- **Αφυδάτωση** με 1% οξικό ουρανύλιο σε αιθυλική αλκοόλη 70%, όπου τα δείγματα παραμένουν όλη τη νύχτα για χρώση en block.
- **Αφυδάτωση** με αιθυλική αλκοόλη 90% για 15 min και 100%, 3 φορές για 15 min τη φορά.
- **Αλλαγή διαλύτη** από αιθυλική αλκοόλη σε **προπυλενοξείδιο** για 1 h. Πρόκειται για τον ενδιάμεσο διαλύτη μεταξύ της αιθυλικής αλκοόλης και των εποξικών ρητινών που θα χρησιμοποιηθούν στο επόμενο στάδιο.
- **Προπυλενοξείδιο-ρητίνη (1:1)**. Στο ίδιο φιαλίδιο προστίθεται ίση ποσότητα ρητίνης Spurr (Κεφ 2.7) με το προπυλενοξείδιο και το φιαλίδιο αφήνεται στον απαγωγό ανοιχτό, υπό συνεχή αργή ανάδευση (2 r.p.m.) για 18 h, ώστε να εξατμιστεί το προπυλενοξείδιο και να παραμείνουν τα δείγματα σε ρητίνη 100%.
- **Έγκλειση** των δειγμάτων σε εποξική ρητίνη, σε καλούπια σιλικόνης και πολυμερισμός στον κλίβανο, στους 68°C για 48-72 h.

### **2.3 Τμήση τομών και χρώση μονιμοποιημένων παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το οπτικό μικροσκόπιο (O.M.)**

Η τμήση τομών έγινε με τον υπερμικροτόμο, τύπου REICHERT OMU-III. Για το O.M. κόβονται ημίλεπτες τομές πάχους 1,5-2 μm, με γυάλινα μαχαίρια, τα οποία κατασκευάστηκαν στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας με την ειδική συσκευή (knife-maker της εταιρείας Reichert-Taab). Στη συνέχεια, οι τομές τοποθετούνται σε σταγόνα αποσταγμένου νερού πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες, που είναι καλυμμένες με ζελατίνα (Grimstone and Skaer, 1972), ώστε οι τομές να απλώνονται και να επικολλώνται καλύτερα πάνω στην αντικειμενοφόρο.

Η αντικειμενοφόρος με τις τομές, τοποθετείται στη συνέχεια σε θερμαινόμενη πλάκα στους 70-80°C και μόλις στεγνώσει η σταγόνα νερού, γίνεται

χρώση των τομών με κυανούν της τολουιδίνης 1% σε βόρακα 1%. Ακολουθεί έκπλυση με αποσταγμένο νερό και στέγνωμα της αντικειμενοφόρου σε θερμαινόμενη πλάκα. Όταν στεγνώσει η πλάκα, γίνεται η επικόλληση της καλυπτρίδας χρησιμοποιώντας είτε μία σταγόνα από την ίδια την εποξική ρητίνη, είτε Eukitt (Agar Scientific Ltd.), προκειμένου να μονιμοποιηθούν οι τομές.

Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι η τμήση τομών για παρατήρηση με το οπτικό μικροσκόπιο έγινε επίσης και με το κρουστάτη (ψυκτικός μικροτόμος) Leica CM 1850.

#### **2.4 Προετοιμασία παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Η.Μ.Σ.)**

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης είναι ένα όργανο που λειτουργεί όπως περίπου και ένα οπτικό μικροσκόπιο μόνο που χρησιμοποιεί δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας αντί για φως, για να εξετάσει αντικείμενα σε λεπτομερή κλίμακα. Το Η.Μ.Σ. παράγει καλά εστιασμένες τρισδιάστατες εικόνες με μεγάλη λεπτομέρεια. Ένα σύγχρονο Η.Μ.Σ. έχει διακριτική ικανότητα που φτάνει τα 3  $\mu\text{m}$ .

Το Η.Μ.Σ. χρησιμοποιεί μία δέσμη ηλεκτρονίων που σαρώνουν την επιφάνεια του παρασκευάσματος με πολύ μεγάλη ταχύτητα. Η δέσμη των ηλεκτρονίων παράγεται από ένα νήμα και ένα σύστημα ανόδου-καθόδου, όπου εφαρμόζεται υψηλή τάση, συνήθως της τάξης των 15-40 kV, για την επιτάχυνση των ηλεκτρονίων. Η δέσμη των ηλεκτρονίων αφού εστιαστεί από σύστημα συγκεντρωτικών φακών, βομβαρδίζει το παρασκεύασμα με αποτέλεσμα κάποια από τα ηλεκτρόνια να το διαπερνούν, κάποια να σχεδιάζονται ή να άγονται, ενώ συγχρόνως να προκαλείται η παραγωγή δευτερογενών ηλεκτρονίων, ακτινών X και ηλεκτρονίων Auger. Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια που προέρχονται από την επιφάνεια του παρασκευάσματος έχουν σχετικά μικρή ενέργεια που σχετίζεται με την τοπογραφία του. Αυτά τα ηλεκτρόνια συλλέγονται, ψηφιοποιούνται και το σήμα μεταβιβάζεται σε Ηλεκτρονικό υπολογιστή όπου γίνεται η παρατήρηση, επεξεργασία της εικόνας και η αποθήκευση.

Ένα παρασκεύασμα για να μπορεί να παρατηρηθεί με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Η.Μ.Σ.), πρέπει να είναι αφυδατωμένο, καλός αγωγός ηλεκτρισμού και να αντέχει στο υψηλό κενό.

Για την προετοιμασία των φυτικών δειγμάτων που παρατηρήθηκαν στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Η.Μ.Σ.) ακολουθήθηκε η εξής πορεία:

- **Κόψιμο των δειγμάτων** μεγέθους 5x5 mm, από διάφορες περιοχές του ελάσματος των φύλλων, με ξυραφάκι. Στην περίπτωση των νεαρών φύλλων, αυτά χρησιμοποιήθηκαν ολόκληρα. Το τελικό μέγεθος ορισμένων δειγμάτων καθορίστηκε μετά από την ξήρανση.
- **Μονιμοποίηση-Στερέωση** με γλουταρική αλδεΐδη 3% σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M (Sörensen) (Κεφ 2.7) με pH=7,2 στους 4°C για 2-3 ημέρες.
- **Έκπλυση** των δειγμάτων με αποσταγμένο νερό 4 φορές, από 30 min.
- **Αφυδάτωση** των δειγμάτων έγινε σε σειρά διαλυμάτων ακετόνης προοδευτικά αυξανόμενης συγκέντρωσης, αρχίζοντας από διάλυμα ακετόνης από 30% και φτάνοντας μέχρι την απόλυτη ακετόνη 100%. Η διαβάθμιση ήταν της τάξεως του 20% (εκτός της τελευταίας). Κάθε 20 min γίνονταν η αλλαγή. Η αλλαγή με ακετόνη 100% πραγματοποιήθηκε 3 φορές. Στο τελευταίο διάλυμα ακετόνης, τα δείγματα παραμένουν για 24 h.
- **Ξήρανση** στη συσκευή κρίσιμου σημείου (Critical Point Dryer, POLARON 3000). Στη συσκευή αυτή, γίνεται αντικατάσταση της ακετόνης με υγρό CO<sub>2</sub>, το οποίο στη συνέχεια απομακρύνεται, αφού μετατραπεί σε αέριο αδιαβατικά (κρίσιμο σημείο).
- **Επικόλληση των δειγμάτων** σε υποδοχείς (stubs) είτε με αυτοκόλλητους δίσκους άνθρακα (Agar Scientific Ltd.) διπλής όψης, είτε με κόλλα τύπου UHU.
- **Επικάλυψη των δειγμάτων** με καθαρό χρυσό, με εκκένωση αίγλης σε ατμόσφαιρα αργού (Ar). Η διαδικασία, έγινε σε εξαχνωτή Denton-Vacuum DV-502, εφοδιασμένο με τα κατάλληλα εξαρτήματα.

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

## 2.5 Σύσταση διαλυμάτων

### ❖ Μονιμοποιητικό Διάλυμα Karnovsky

2g παραφορμαλδεΐδης διαλύονται σε 25 ml αποσταγμένο νερό, στους 60-70°C με ανάδευση. Εν συνεχεία, προστίθεται σταγόνα-σταγόνα 1 N NaOH με συνεχή ανάδευση μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Όταν κρυώσει το διάλυμα, προστίθενται 10 ml γλουταρικής αλδεΐδης 25% και συμπληρώνεται ο όγκος του στα 50 ml, με το ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικό νάτριο. Το τελικό pH του μονιμοποιητικού διαλύματος είναι ουδέτερο (pH: 7,2).

### ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού νατρίου (sodium cacodylate) (0,1 M)

2,15 g sodium cacodylate διαλύονται σε 100 ml αποσταγμένου νερού. Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος ρυθμίζεται στο 7,2-7,4 με HCl. Διατηρείται στους 4°C για μερικές ημέρες.

### ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M (Sörensen)

Αρχικά παρασκευάζονται δυο stock διαλύματα:

#### ▶ Διάλυμα stock A:

Σε 1l απιονισμένου νερού διαλύονται 35,61 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

#### ▶ Διάλυμα stock B:

Σε 1l απιονισμένου νερού διαλύονται 27,60 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

τα οποία μπορούν να διατηρηθούν στους 4°C για μερικές εβδομάδες. Για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος με pH 7,2 σε 50 ml απιονισμένου νερού προστίθενται 36 ml από το stock δ/μα A και 14 ml από το stock δ/μα B.

### ❖ Συστατικά Ρητίνης Spurr

Σε μαγνητικό αναδευτήρα αναδεύονται για αρκετή ώρα 10 g ERL, μαζί με 7 g DER, 26 g NSA και 0,4 g S-1(πολυμεριστής).

### ❖ Επικάλυψη αντικειμενοφόρων με ζελατίνα

1 g ζελατίνης/1 lt χλιαρού αποσταγμένου νερού στο οποίο προστίθεται 0,1 g  $\text{CrKSO}_4$ . Σχολαστικά πλυμένες και στεγνωμένες αντικειμενοφόροι, εμβαπτίζονται



στο διάλυμα όταν αυτό κρυώσει και αφήνονται να στεγνώσουν, σε κατακόρυφη θέση, σε χώρο χωρίς σκόνη (Grimstone and Skaer, 1972).

❖ **Κιτρικός μόλυβδος**

0,1-0,2 g NaOH διαλύονται σε 50 ml αποσταγμένου νερού μαζί με 0,25 g κιτρικού μόλυβδου.

## **2.6 Προετοιμασία νωπών παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το Οπτικό Μικροσκόπιο (Ο.Μ.)**

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

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

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

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

### **2.6.1 Αυτοφθορισμός**

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

- Κυτταρίνη → δε φθορίζει
- Λιγνίνη → φωτεινό γαλάζιο
- Χλωροφύλλη → κόκκινο
- Σουμπερίνη → γαλάζιο
- Κουτίνη → γκρι
- Φαινολικά οξέα → κίτρινο

## 2.7 Ιστοχημεία

Διάφορες ιστοχημικές μέθοδοι εφαρμόστηκαν σε τομές νωπών φύλλων με το χέρι, μερικά λεπτά από την αποκοπή τους από το φυτό, για παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο, στο μικροσκόπιο φθορισμού ή στο στερεοσκόπιο. Πιο συγκεκριμένα οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή ήταν οι εξής :

- **Αντιδραστήριο Nadi**

Το αντιδραστήριο Nadi χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό τερπενοειδών, τα οποία και χρωματίζονται ιώδη/βιολετί. Το διάλυμα παρασκευάζεται ακριβώς πριν χρησιμοποιηθεί. Επειδή το αντιδραστήριο αυτό είναι ιδιαίτερα φωτοευαίσθητο, διατηρείται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο (Pasqua et al., 2003).

Για την παρασκευή του διαλύματος αναμιγνύονται 0,5 ml από 1%  $\alpha$ -naphтол σε 40% αλκοόλη, με 0,5 ml από 1% N,N-dimethyl-p-phenylenediamine monohydrochloride σε αποσταγμένο νερό, και με 49 ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος 0,05 M (pH 7,2). Οι τομές καλύπτονται προκειμένου να μην εκτίθενται στο φως και παραμένουν στο αντιδραστήριο για 1h. Η παρατήρηση γίνεται σε γλυκερόλη στο Ο.Μ.

- **Sudan IV**

Το αντιδραστήριο χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό λιπιδίων, κουτίνης και σουβερίνης (εκτός των φωσφορολιπιδίων), τα οποία και χρωματίζονται κόκκινα. Η αντίδραση στηρίζεται στην επιλεκτική διαλυτότητα της χρωστικής στα λιπίδια. Αναλυτικότερα, η χρωστική είναι πιο διαλυτή στα λιπίδια του ιστού από ότι στον διαλύτη και στον οποίο αρχικά διαλύθηκε (αλκοόλη). Ως εκ τούτου, με την απλή τοποθέτηση του ιστού στη χρωστική, τα λιπίδια την προσλαμβάνουν. Η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης στηρίζεται σε πολλούς παράγοντες ανάμεσα στους οποίους και η φυσική κατάσταση των λιπιδίων. Γενικά, η αντίδραση για τα έλαια είναι πολύ πιο αποτελεσματική από ότι για τα λίπη, τα οποία και παρουσιάζουν ασθενή αντίδραση (Jensen, 1962).

Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι για τον συγκεκριμένο διαλύτη (αλκοόλη) απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στην διατήρηση των χρόνων, διότι η αλκοόλη είναι διαλύτης των λιπών και μπορεί να δημιουργηθούν προβλήματα στις τομές μετά από μεγάλη παραμονή τους στο διάλυμα (Johansen, 1940).

Φτιάχνεται διάλυμα 0,5% Sudan IV σε 85% αλκοόλη, στο οποίο εμβαπτίζονται οι τομές για 2-5 min. Ακολουθεί γρήγορη έκπλυση σε 50% αλκοόλη και στη συνέχεια παρατήρηση σε μια σταγόνας γλυκερόλης στο οπτικό μικροσκόπιο.

Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί κορεσμένο διάλυμα σε αλκοόλη, στο οποίο οι τομές εμβαπτίζονται στο διάλυμα για 5 min. Ακολουθεί γρήγορη έκπλυση σε απόλυτη αλκοόλη και η παρατήρηση γίνεται με το Ο.Μ. σε σταγόνα γλυκερόλης.

- **Θειϊκός Σίδηρος (FeSO<sub>4</sub>)**

Για τον εντοπισμό τανινών μπορεί να χρησιμοποιηθεί διάλυμα FeSO<sub>4</sub>, με το οποίο οι τανίνες παίρνουν χρώμα πορτοκαλί έως μαύρο (Clark, 1981, Johansen, 1940).

Το αντιδραστήριο προκύπτει από την προσθήκη 0,25 ml παγόμορφου οξικού οξέως, 10 ml 37% φορμαλδεΐδης και 2 g FeSO<sub>4</sub> σε 89 ml αποσταγμένου νερού. Οι τομές κόβονται σε νερό και στη συνέχεια τοποθετούνται στο αντιδραστήριο όπου και παραμένουν για 18 h. Η παρατήρηση γίνεται με το Ο.Μ. σε σταγόνα γλυκερόλης.

- **Τριχλωριούχο Αργίλιο/Aluminium Trichloride (AlCl<sub>3</sub>)**

Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό φλαβονών (flavones), φλαβονολών (flavonols) και φλαβανονών (flavanones) στο μικροσκόπιο φθορισμού. Ο φθορισμός που προκύπτει είναι πρασινοκίτρινος για τις φλαβόνες, κίτρινος για τις φλαβονόλες και μπλε για τις φλαβανόνες. Το διάλυμα παρασκευάζεται είτε με νερό είτε με αιθυλική αλκοόλη, το αποτέλεσμα είναι το ίδιο (Guerin et al., 1971).

Το διάλυμα προκύπτει με διάλυση 5% χλωριούχου αργιλίου σε νερό ή σε αιθυλική αλκοόλη. Οι τομές τοποθετούνται σε λίγες σταγόνες διαλύματος. Ακολουθεί άμεση παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού.

- **Dragendorff**

Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των αλκαλοειδών, τα οποία βάφει έντονο πορτοκαλί. Για τη μέθοδο αυτή παρασκευάζονται δυο διαλύματα:

Διάλυμα Α [1,7 g βασικού νιτρικού βισμούθιου σε 100 ml διαλύματος οξικού οξέος 20%] και Διάλυμα Β [40,0 g ιωδιούχου καλίου σε 100 ml νερού] τα οποία αναμειγνύονται ως εξής:

5ml **A**+ 5 ml **B** +20 ml **οξικού οξέος** + 70 ml **νερού**

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

## **2.8 Μικροσκόπια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τις μορφολογικές, ανατομικές και ιστοχημικές παρατηρήσεις**

### **Οπτικό Μικροσκόπιο (Ο.Μ.)**

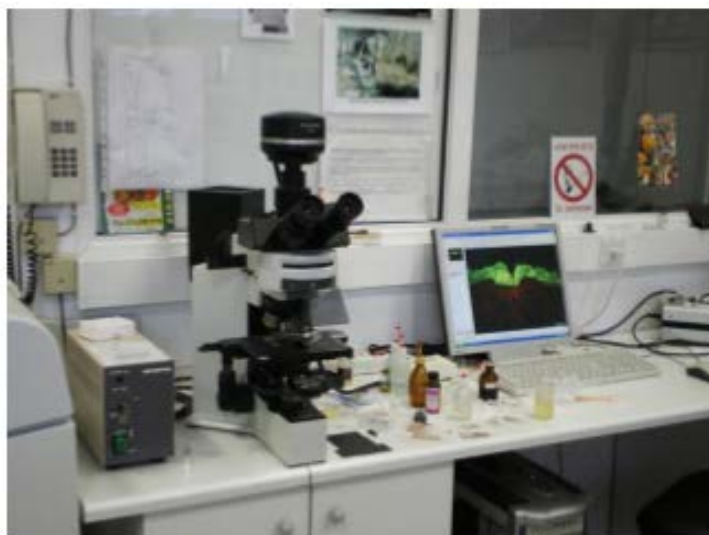
Χρησιμοποιήθηκε το οπτικό μικροσκόπιο τύπου OLYMPUS BX40 του Εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, το οποίο είναι εφοδιασμένο με τα κατάλληλα εξαρτήματα για παρατηρήσεις σε φωτεινό ή σκοτεινό πεδίο, αντίθετης φάσης και επιφθορισμό.

Τα φίλτρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

i. φίλτρο διέγερσης BP 330-385, που επιτρέπει τη διέλευση ακτινοβολιών μεταξύ 330 και 385 nm και

ii. φίλτρο φραγμού BA 420, που απορροφά όλα τα μήκη κύματος κάτω από 420 nm (Εικόνα 14α).

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



**Εικόνα 14α:** Οπτικό μικροσκόπιο

### Στερεοσκόπιο

Έγινε χρήση του στερεοσκοπίου τύπου OLYMPUS SZX12 του Εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας.

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

Το Η.Μ.Σ. του Εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, τύπου Jeol 6360 (Jeol, Japan) (Εικόνα 14β).



**Εικόνα 14β:** Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Η.Μ.Σ.)

## **2.9 Φωτογράφιση**

Για το Ο.Μ. και το Στερεοσκόπιο η λήψη φωτογραφιών έγινε με ψηφιακή videocamera τύπου CCD colour camera SSC-DC 38P/45 (Sony Corporation, Tokyo, Japan). Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Jeol 6360) είναι εφοδιασμένο με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Olympus MegaView G2.

### III. Αποτελέσματα

#### 3.1 Μακροσκοπικές παρατηρήσεις

Σύμφωνα με πρόσφατες μακροσκοπικές παρατηρήσεις, το υπό μελέτη φυτό Αχίλλειος, χαρακτηρίζεται από βλαστούς χνουδωτούς, φύλλα σύνθετα και φυλλάρια σύνθετα λεπιοειδή, ακιδωτά. Εξαιτίας των πολλών τριχωμάτων της, το χρώμα της Αχίλλειους είναι πρασινωπό-γκρι.

Είναι φυτό ποώδες, πολυετές, ανθοφόρο, χαμηλής σε ύψος ανάπτυξης. Η κεφαλή της ταξιανθίας είναι μονήρης, μικρού μεγέθους και αποτελείται από γλωσσοειδή ανθίδια και πολυάριθμα επιδίσκια (Εικόνα 15).



**Εικόνα 15:** *Achillea millefolium* (πηγή : [www.briargate.org](http://www.briargate.org)).

### 3.2 Ιστοχημικές παρατηρήσεις

Η ιστοχημεία είναι μια από τις πιο ευρέως εφαρμοζόμενες μεθόδους για την ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών στα διάφορα μέρη του φυτού (π.χ. φύλλα, ταξιανθίες, ρίζες) (Pearse, 1995, Pereira and Carrapico, 2007, Rahmalia, 2011). Το γεγονός αυτό οφείλεται στη θετική ή αρνητική αντίδραση των συστατικών αυτών, μετά από την εμβάπτιση των νωπών φυτικών δειγμάτων σε διάφορες χρώσεις.

Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις για τη μην αξιόπιστη αποτελεσματικότητά της όπως για παράδειγμα, η εμφάνιση χρωμάτων σε τομές, τα οποία δεν έχουν επιστημονικά τεκμηριωθεί, ενώ μέχρι και την προηγούμενη δεκαετία, στα περισσότερα άρθρα, η αξιολόγηση των ιστοχημικών παρατηρήσεων ήταν ελλιπής (π.χ. συγκεντρωτικός πίνακας ιστοχημείας, απουσία ιστοχημικών τομών-εικόνων) (Crowell, 1999).

Στην παρούσα διατριβή, εξετάστηκε η πιθανή παρουσία των εξής πέντε μεταβολιτών: φλαβονοειδή, λιπίδια, αλκαλοειδή, τανίνες, τερπένια, στα φύλλα του *Achillea millefolium*, με το Οπτικό Μικροσκόπιο και το Μικροσκόπιο Φθορισμού. Τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν από τις ιστοχημικές παρατηρήσεις παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω (Κεφ. 3.3.1-3.3.5), ενώ συνοπτικά δίνονται στον Πίνακα 8 (Κεφ. 4.1).

#### 3.2.1 Τριχλωριούχο Αργίλιο ( $\text{AlCl}_3$ )

Η χρώση με το τριχλωριούχο αργίλιο χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση φλαβονοειδών φαινολών. Σε εγκάρσιες τομές νωπών φύλλων του φυτού Αχίλλειο, προκύπτουν τα παρακάτω αποτελέσματα:

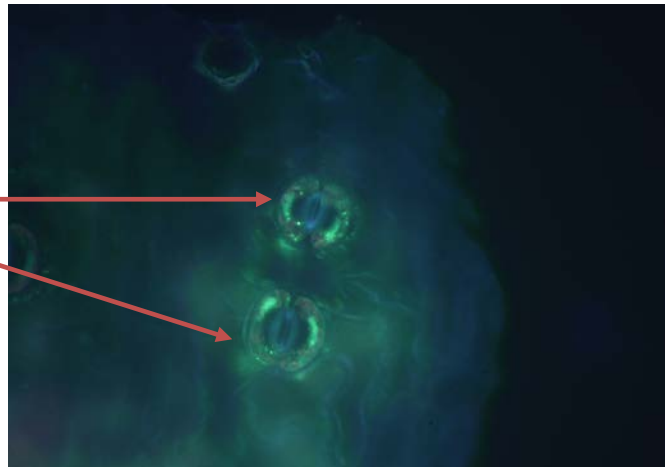
Τα στόματα και το δρυφρακτοειδές παρέγχυμα χρωματίζονται πρασινοκίτρινα επιβεβαιώνοντας κατά συνέπεια την ύπαρξη φλαβόνων (Εικόνα 16α και 16β).

Ο μπλε φθορισμός στην εφυμενίδα δείχνει ενδεχόμενος τη θέση των φλαβανονών, ενώ τα επιδερμικά κύτταρα της προσαξονικής επιφάνειας φθορίζουν πράσινο. Τα ελαιοσταγονίδια παρουσιάζουν κόκκινο-πορτοκαλί χρώμα, λόγω της πιθανής απορρόφησης χλωροφύλλης κατά την τμήση των τομών (Εικόνα 16β)



(Φασσέας, 1999). Τέλος, με τον αυτοφθορισμό διαπιστώνεται και η ύπαρξη παχιάς εφυμενίδας (Εικόνα 16γ, άσπρο βέλος).

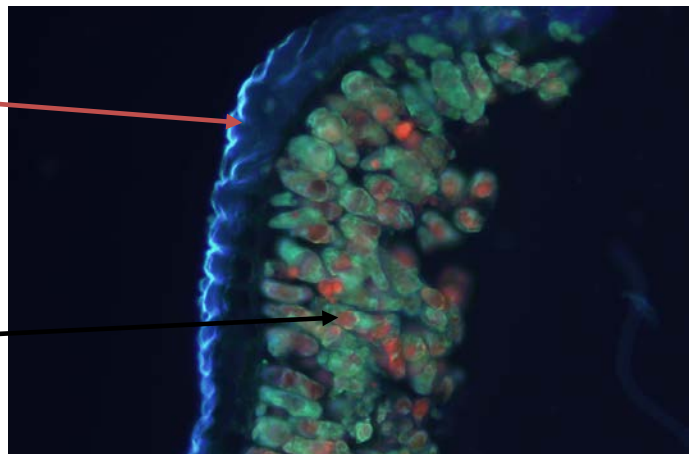
Πρασινokίτρινος  
αυτοφθορισμός στομάτων



**Εικόνα 16α:** Τομή εμβαπτισμένη στη χρωστική τριχλωριούχο αργίλιο/Aluminium trichloride ( $\text{AlCl}_3$ ).

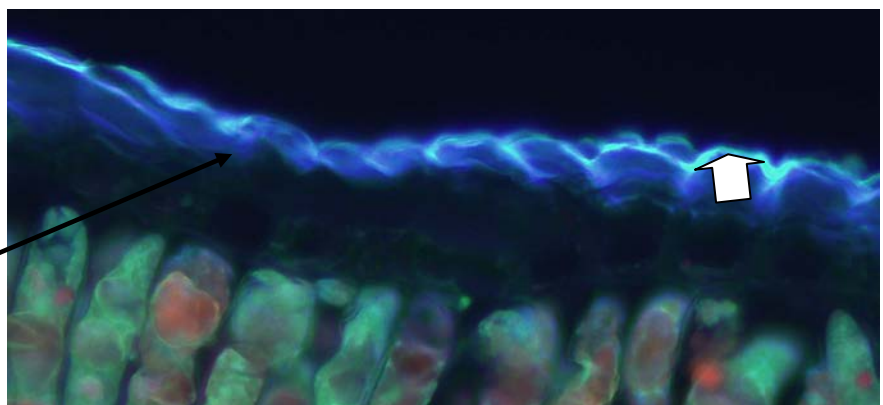
Μπλε αυτοφθορισμός  
εφυμενίδας

Κόκκινος-πορτοκαλί  
αυτοφθορισμός  
ελαιοσταγονιδίων



**Εικόνα 16β:** Τομή προσaxονικής επιφάνειας φύλλου εμβαπτισμένη στη χρωστική τριχλωριούχο αργίλιο/Aluminium trichloride ( $\text{AlCl}_3$ ) σε κλίμακα 100nm.

Πράσινος αυτοφθορισμός  
επιδερμικών κυττάρων



**Εικόνα 16γ:** Αποκοπή και μεγέθυνση τμήματος της εικόνας

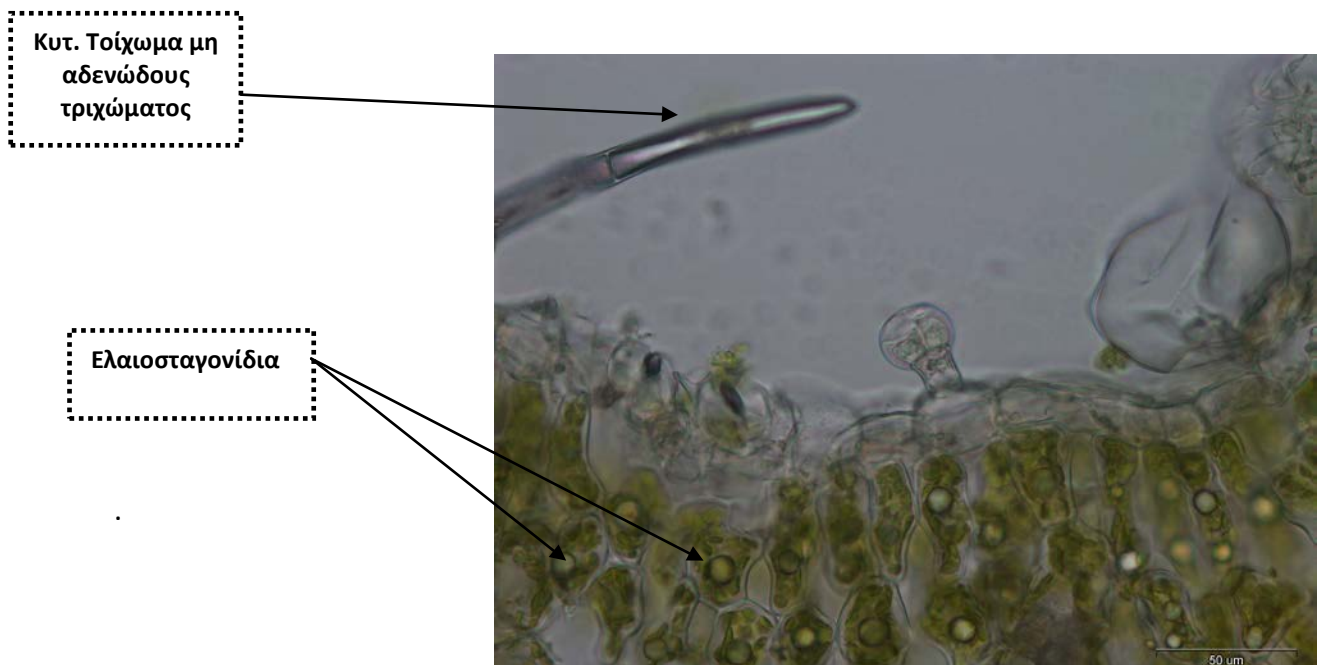
### 3.2.2 Θεϊκός σίδηρος (FeSO<sub>4</sub>)

Η χρώση με το θειικό σίδηρο βάφει τις τανίνες των φυτικών ιστών με πορτοκαλί έως μαύρο χρώμα.

Στα υπό μελέτη δείγματα, αρνητική αντίδραση δίνει η εφυμενίδα, τα επιδερμικά κύτταρα και τα αδενώδη τριχώματα (Εικόνα 17α και 17β). Αντίθετα, τα μη αδενώδη τριχώματα και το σκληρόγυμα των ηθμαγγειωδών δεσμίδων χρωματίζονται μαύρα (Εικόνα 17γ και 17δ).



Εικόνα 17α: Αποκοπή τμήματος της εικόνας 17β.



Εικόνα 17β: Τομή εμβαπτισμένη στη χρωστική θειικός σίδηρος (FeSO<sub>4</sub>) σε κλίμακα 50nm.

Σκληρόγχομα  
Ηθμαγγειωδών  
δεσμίδων



**Εικόνα 17γ:** Τομή εμβαπτισμένη στη χρωστική θειικός σίδηρος ( $\text{FeSO}_4$ ) σε κλίμακα 100nm.

Διακλαδιζόμενα μη αδενώδη  
τριχώματα



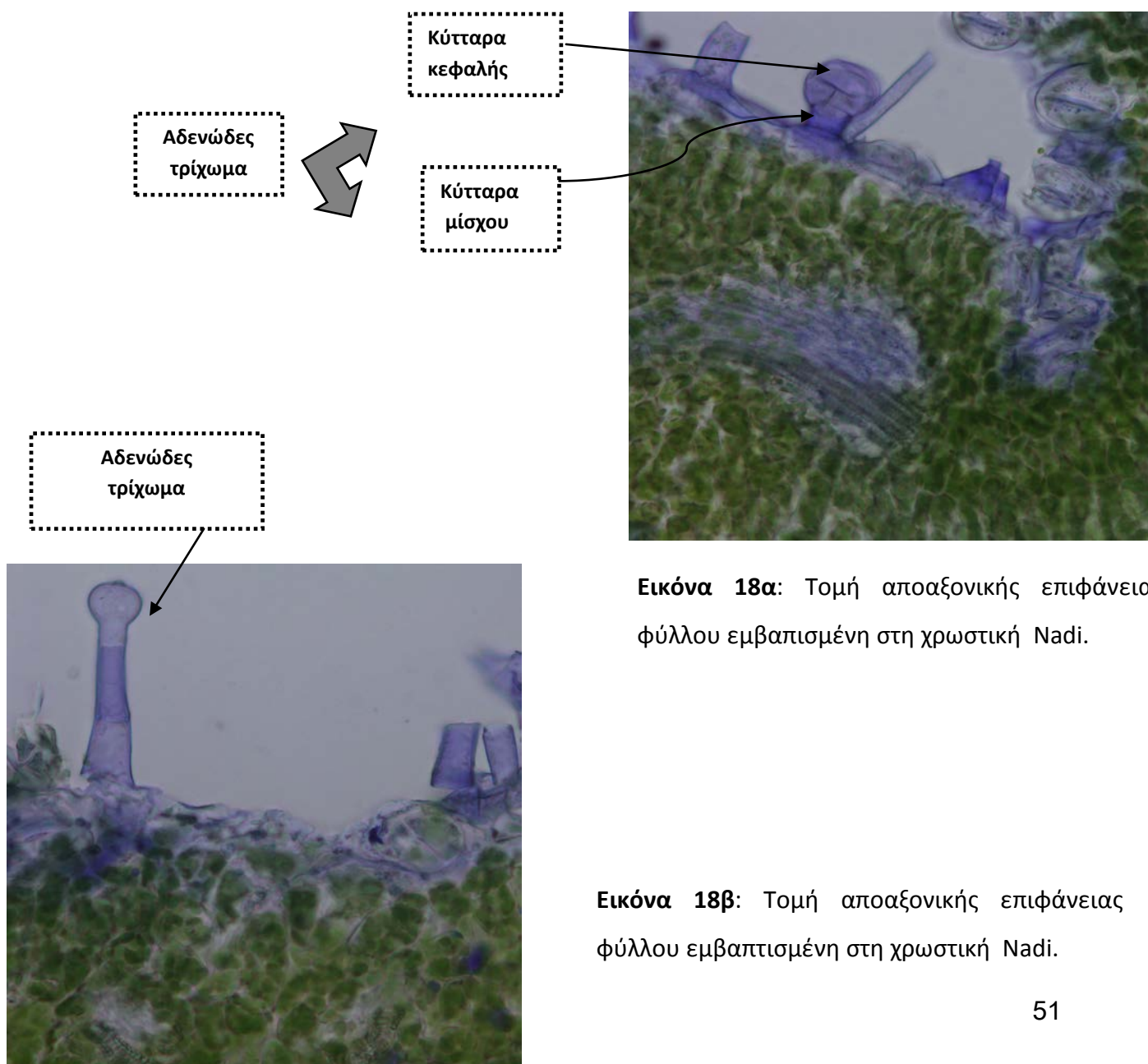
**Εικόνα 17δ:** Τομή εμβαπτισμένη στη χρωστική θειικός σίδηρος ( $\text{FeSO}_4$ ) σε κλίμακα 100nm.

### 3.2.3 Αντιδραστήριο Nadi

Το αντιδραστήριο αυτό χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό τερπενίων, τα οποία χρωματίζονται μπλε-ιώδη.

Με το Nadi, θετική αντίδραση δίνουν, η εφυμενίδα, τα επιδερμικά κύτταρα τόσο της προσαξινικής όσο και της αποαξονικής επιφάνειας των φύλλων, τα στόματα, τα κύτταρα κεφαλής, μίσχου και βάσης (εφυμενίδα) του αδενώδους τριχώματος καθώς και οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Εικόνα 18α, 18β και 18γ)

Τα κύτταρα του μεσόφυλλου δεν αντιδρούν με τη συγκεκριμένη χρωστική, εκτός από τις σφαιρικές δομές (ελαιοσταγονίδια) μέσα στα κύτταρα του παρεγχύματος, οι οποίες χρωματίζονται βιολετί (Εικόνα 18γ).

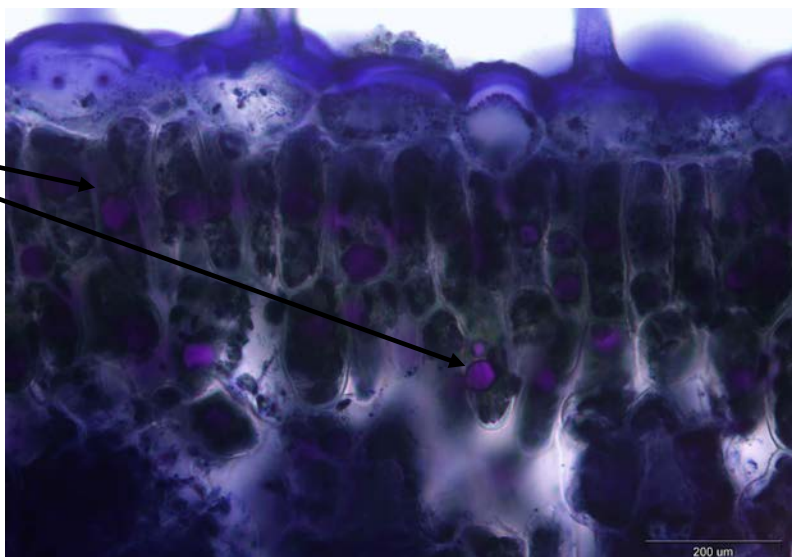


**Εικόνα 18α:** Τομή αποαξονικής επιφάνειας φύλλου εμβαπισμένη στη χρωστική Nadi.

**Εικόνα 18β:** Τομή αποαξονικής επιφάνειας φύλλου εμβαπτισμένη στη χρωστική Nadi.

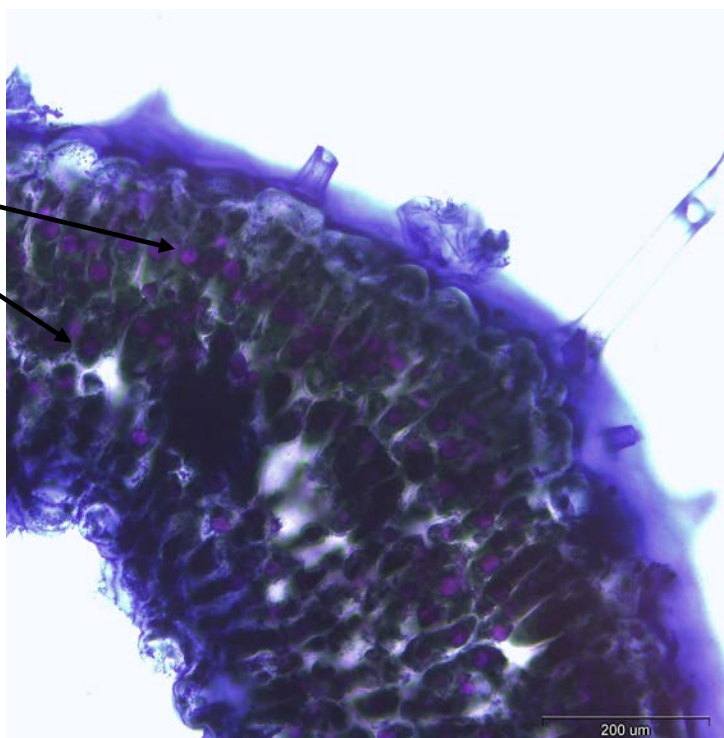


Ελαιοσταγονίδια



**Εικόνα 18γ:** Τομή προσαξονικής επιφάνειας φύλλου εμβαπτισμένη με τη χρωστική Nadi σε κλίμακα 200nm.

Ελαιοσταγονίδια



**Εικόνα 18δ:** Τομή φύλλου εμβαπτισμένη με τη χρωστική Nadi σε κλίμακα 200nm.

### 3.2.4 Sudan IV

Από την εικόνα 19α παρατηρείται η ύπαρξη κάποιων λιπιδίων ή κουτίνης από τον ερυθρό χρωματισμό της εφυμενίδας από την χρωστική Sudan IV. Ασθενής ερυθρός χρωματισμός παρατηρείται στα ελαιοσταγονίδια των κυττάρων του μεσόφυλλου, στην κεφαλή του αδενώδους τριχώματος καθώς και στην βάση του μη αδενώδους τριχώματος (Εικόνα 19β).



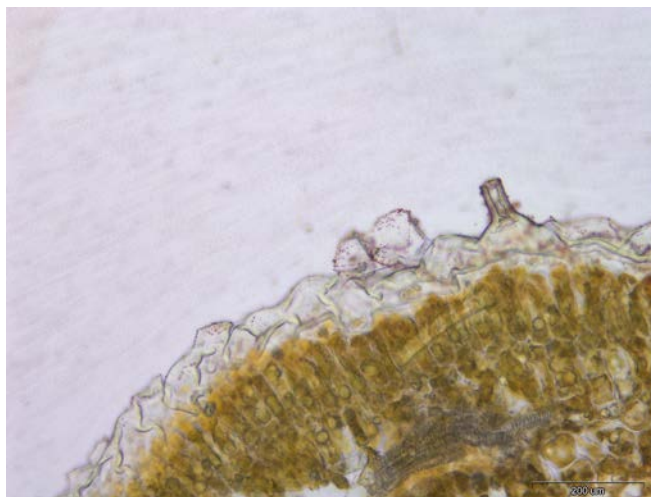
**Εικόνα 19α:** Τομή εμβαπτισμένη στη χρωστική Sudan IV σε κλίμακα 50nm.



**Εικόνα 19β:** Τομή εμβαπτισμένη στη χρωστική Sudan IV σε κλίμακα 100nm.

### 3.2.5 Dragendorff

Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των αλκαλοειδών, τα οποία βάφει έντονο πορτοκαλί. Το αντιδραστήριο δεν έδωσε θετική αντίδραση στους ιστούς του φύλλου (Εικόνα 20α, 20β και 20γ).



**Εικόνα 20α:** Τομή εμβαπτισμένη στη χρωστική Dragendorff σε κλίμακα 200nm.

Δενδροειδής μορφή  
μη αδενώδους τριχώματος



**Εικόνα 20β:** Τομή εμβαπτισμένη στη χρωστική Dragendorff.

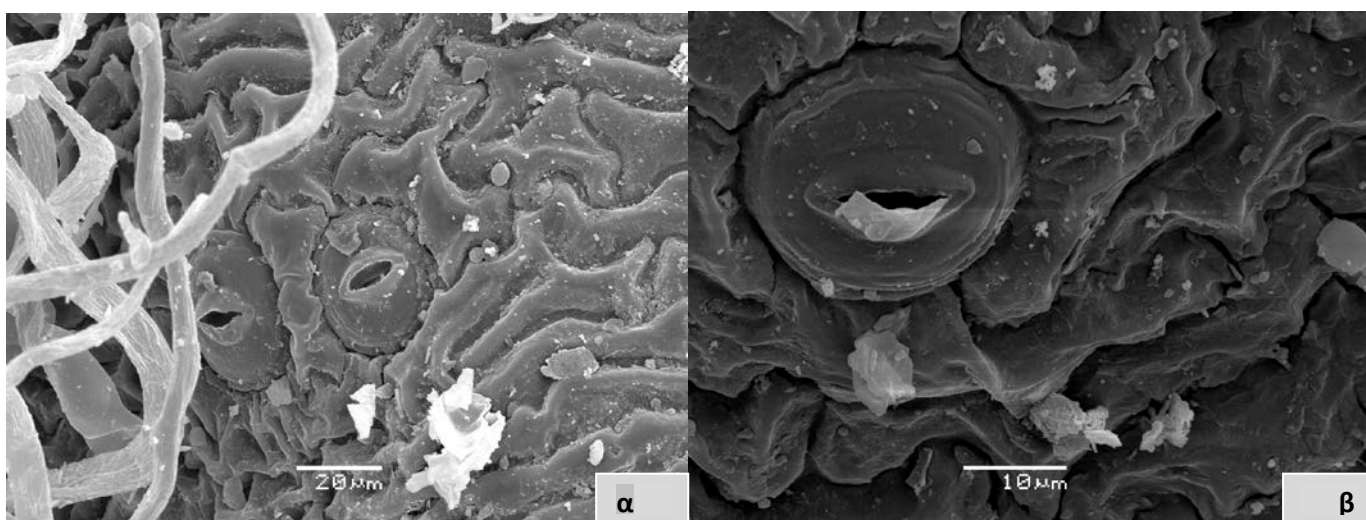


**Εικόνα 20γ:** Τομή εμβαπτισμένη στη χρωστική Dragendorff, σε κλίμακα 200 nm.

### 3.3 Ανατομικές παρατηρήσεις με το Οπτικό Μικροσκόπιο

Στην παρούσα υποενότητα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι φωτογραφίες, οι οποίες ελήφθησαν από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Η.Μ.Σ), μετά από κατάλληλη επεξεργασία των φυτικών δειγμάτων. Όπως υποστηρίζεται από πλήθος ερευνητικών εργασιών με την ανώτερη διαδικασία, λαμβάνονται αναλυτικές πληροφορίες για την εξωτερική μορφολογία των διάφορων φυτικών οργάνων, οι οποίες συμβάλλουν στη διεξοδική μελέτη της δομικής τους ανάπτυξης και της φυσιολογικής τους λειτουργίας (Κεφ. 4.2, διατριβής).

Στον κλάδο της ανατομικής μικροσκοπικής έρευνας των φύλλων, οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στην ανατομία/μορφολογία των στομάτων, της αποαξονικής και προσαξονικής επιφάνειας τους καθώς στον τύπο και τη δομή των τριχωμάτων τους. Στην *Achillea millefolium*, η κατανομή και ο τύπος των στομάτων παρουσιάζονται στις εικόνες 21α, 21β, 21γ και 21δ, ενώ τα είδη των τριχωμάτων (αδενώδεις και μη αδενώδεις τρίχες) και η μορφολογία τους στις εικόνες 22-25. Μια γενική άποψη της ανατομίας της προσαξονικής και αποαξονικής πλευράς του φύλλου καθώς και μια γενική διάταξη των φύλλων της Αχίλλειους εμφανίζονται στις εικόνες 26, 28 και 29 αντίστοιχα. Τέλος παρουσιάζεται η μορφολογία της εγκάρσιας τομής του φύλλου, στην εικόνα 30, στην οποία είναι εμφανές το χυμοτόπιο (Εικόνα 31).

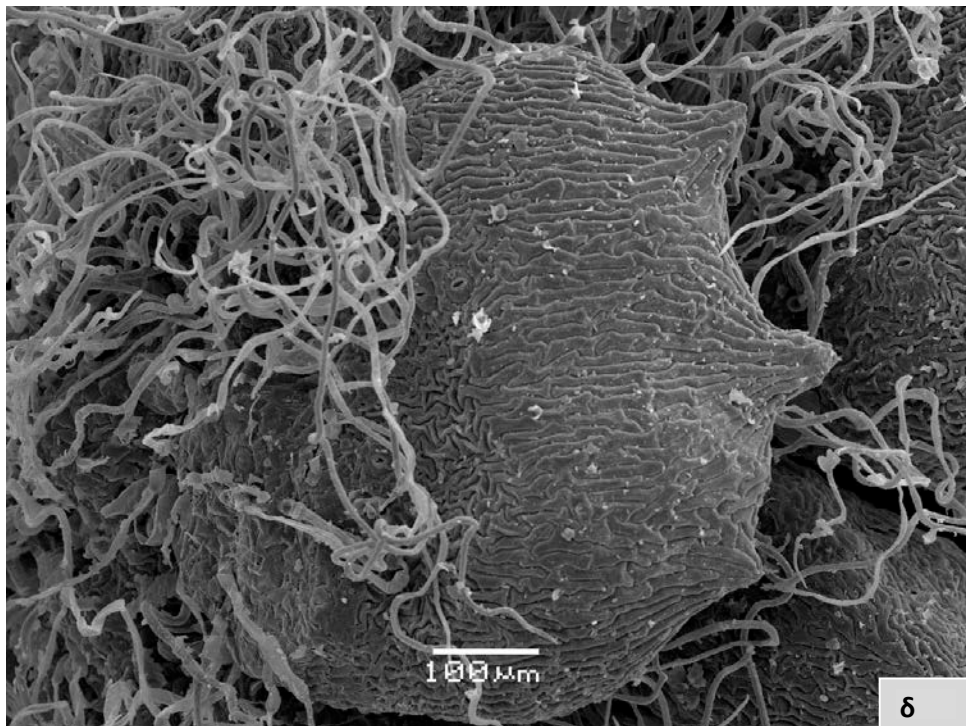


**Εικόνα 21:** α. Στόματα όπως φαίνονται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, σε κλίμακα 20nm. β. Στόμα σε κλίμακα 10 nm.

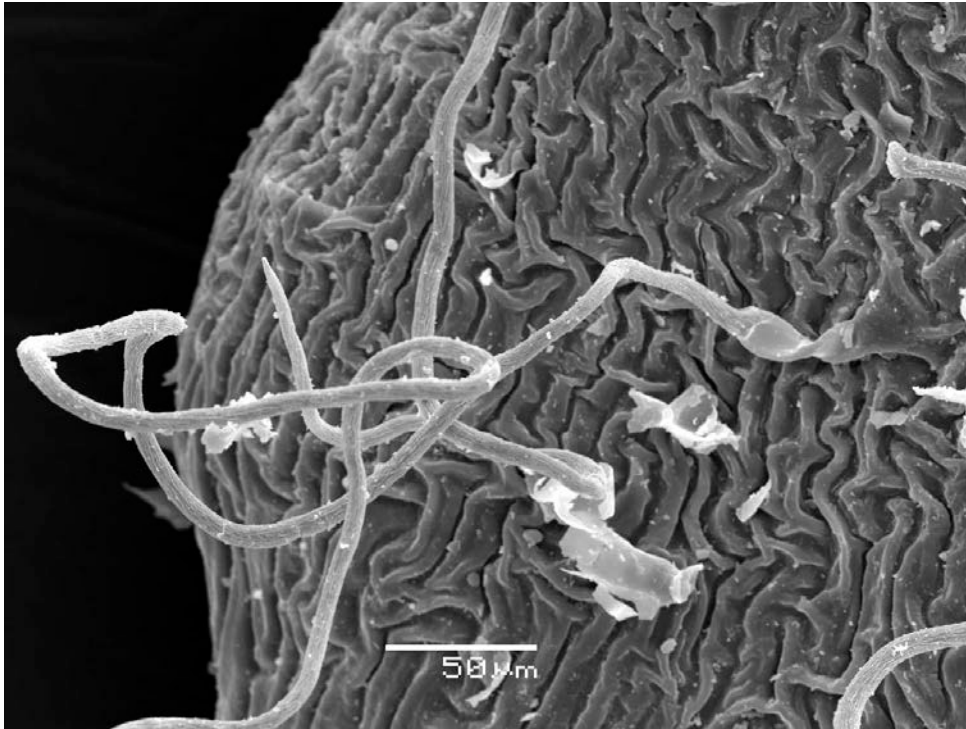




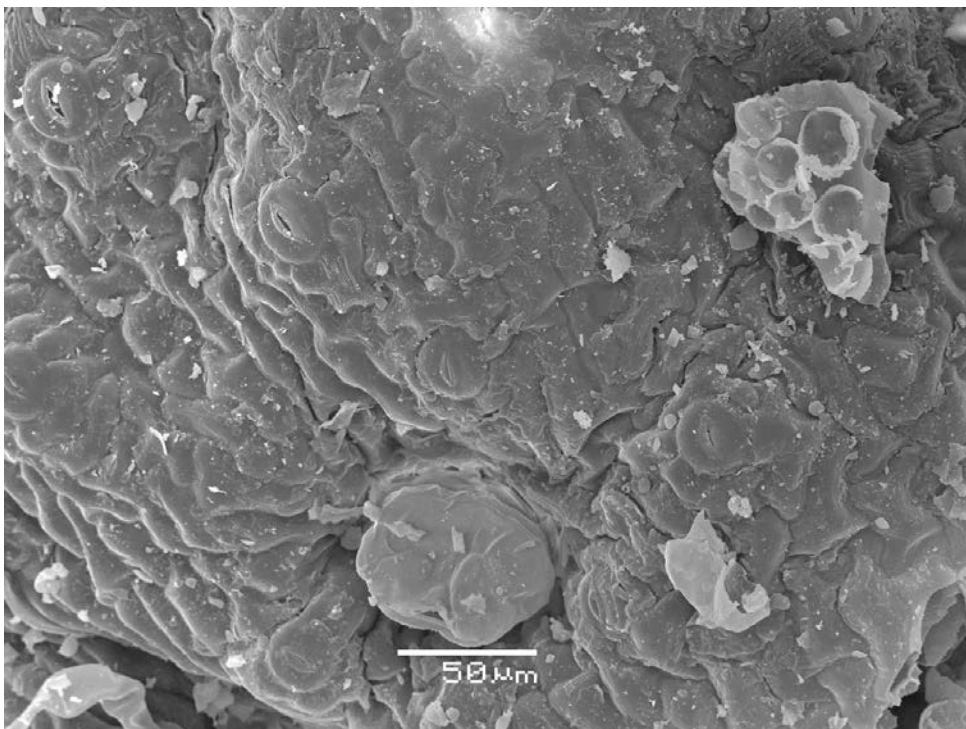
**Εικόνα 21γ:** Κατανομή στομάτων. Στομάτια υπάρχουν από την επάνω πλευρά μέχρι την άκρια ενώ από την κάτω μέχρι το σημείο που υπάρχει αλληλοεπικάλυψη. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, σε κλίμακα 50nm.



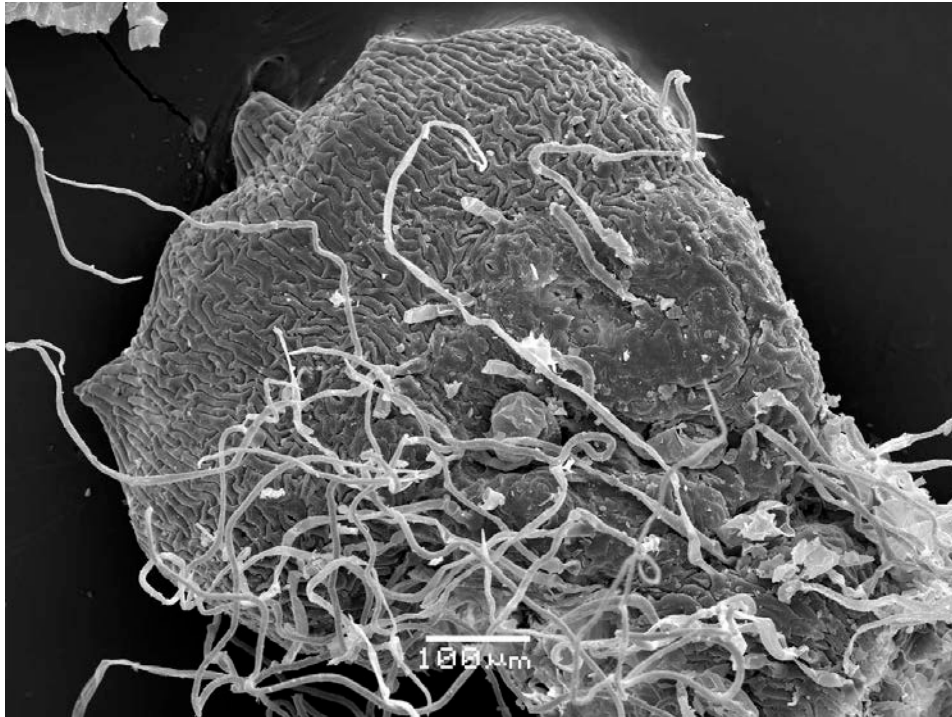
**Εικόνα 21δ:** Κατανομή στομάτων. Αδενώδη τρίχας στο σημείο αλληλοεπικάλυψης, όπως φαίνεται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, σε κλίμακα 100nm.



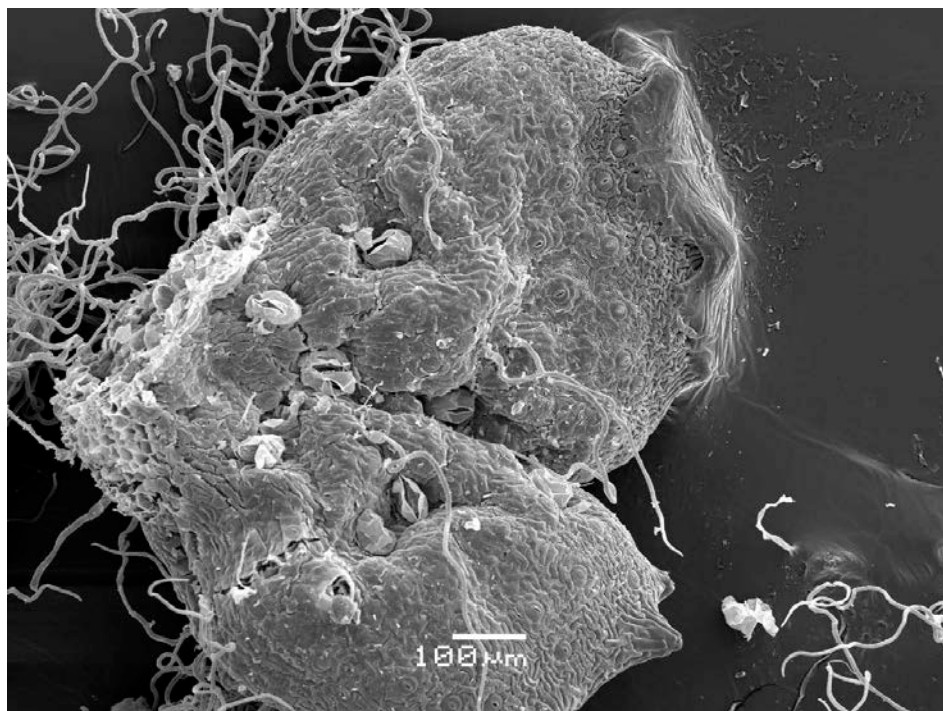
**Εικόνα 22:** Μη αδενώδεις τρίχες. Τρίχες, μακριές και διακλαδιζόμενες, όπως φαίνονται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, σε κλίμακα 50nm.



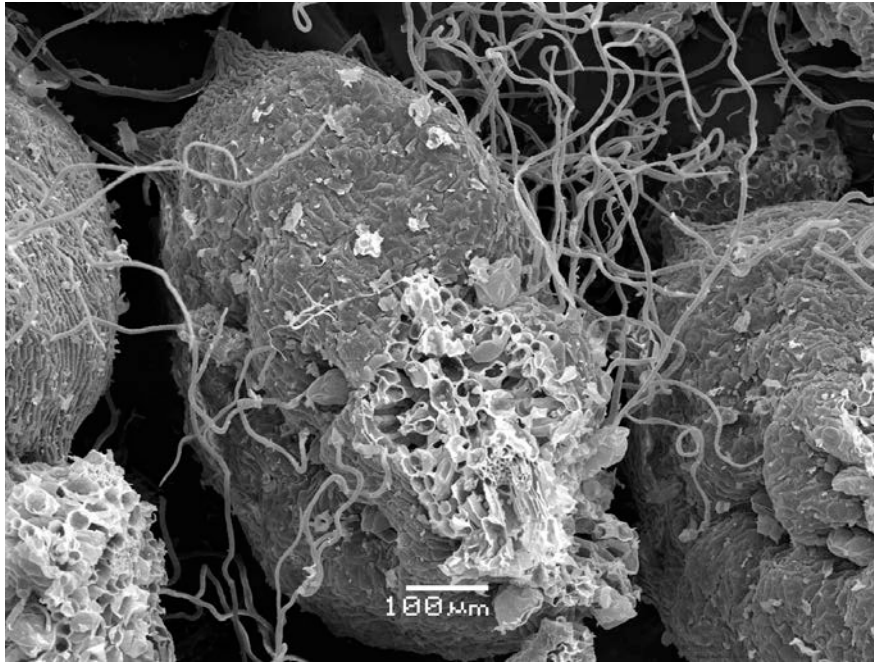
**Εικόνα 23:** Αδενώδης τρίχα στην προσαξονική πλευρά του φύλλου, όπως φαίνεται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, σε κλίμακα 50nm.



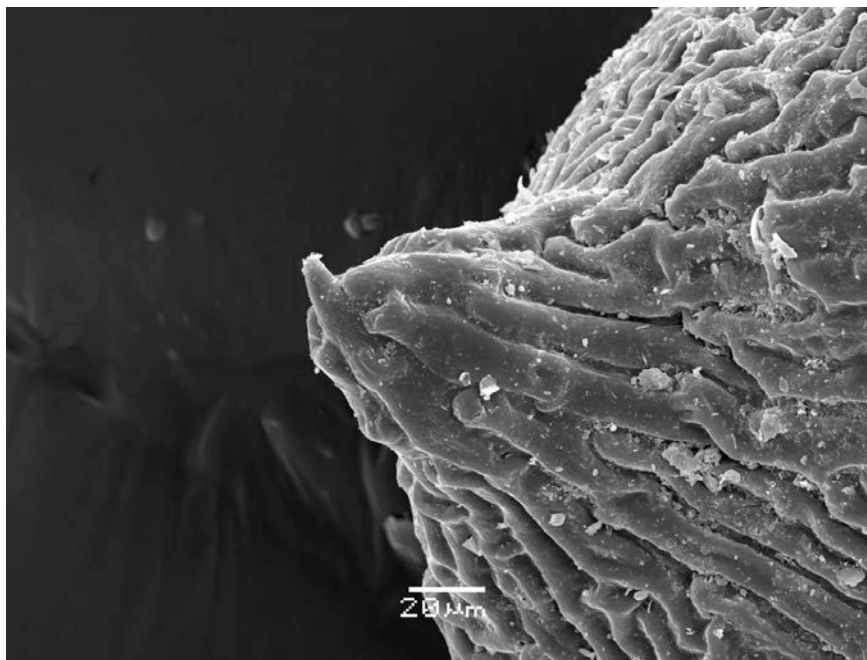
**Εικόνα 24:** Στην βάση των φύλλων υπάρχουν αδενώδεις τρίχες, όπως φαίνονται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, σε κλίμακα 100μm.



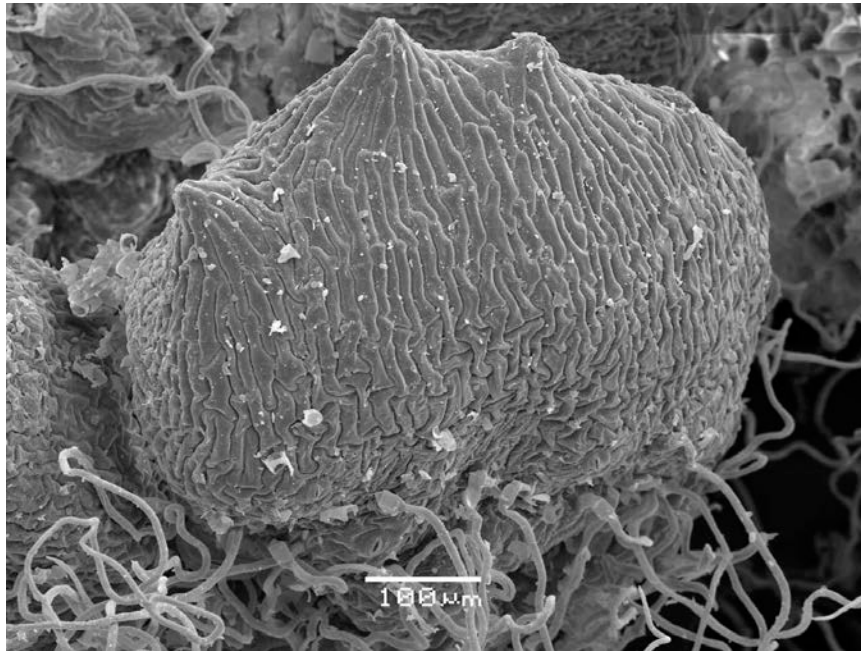
**Εικόνα 25:** Μέσα πλευρά των δύο φύλλων. Από την επάνω πλευρά έχει πολλές αδενώδεις τρίχες και τα στόματα φτάνουν μέχρι έξω. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, σε κλίμακα 100μm.



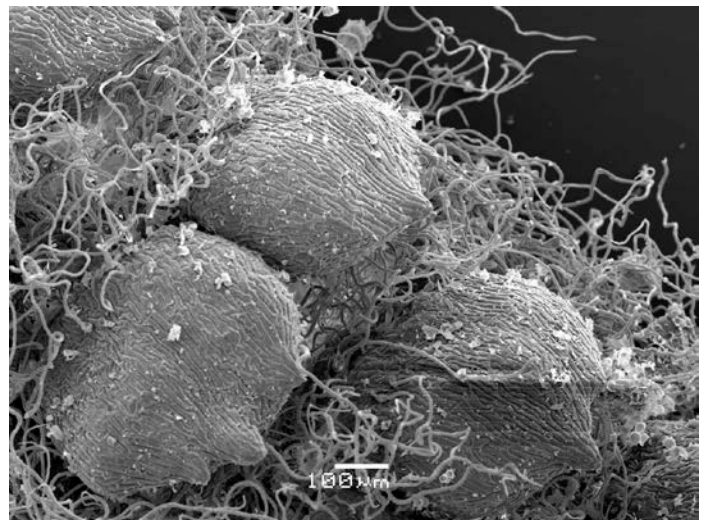
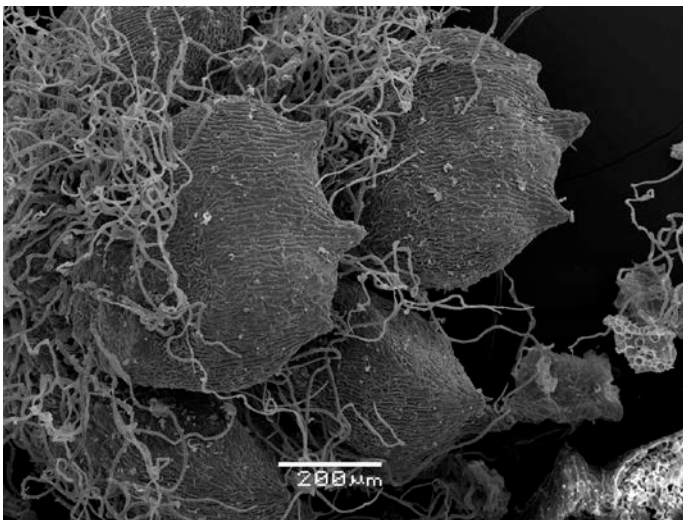
**Εικόνα 26:** Προσαξονική μεριά – η μέσα πλευρά. Τα στόματα παρουσιάζονται μέχρι την άκρια. Φαίνεται το σημείο προσκόλλησης στο μίσχο. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης σε κλίμακα 100nm.



**Εικόνα 27:** Αιχμηρές απολήξεις στα κράσπεδα των φύλλων, όπως φαίνονται από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, σε κλίμακα 20nm.

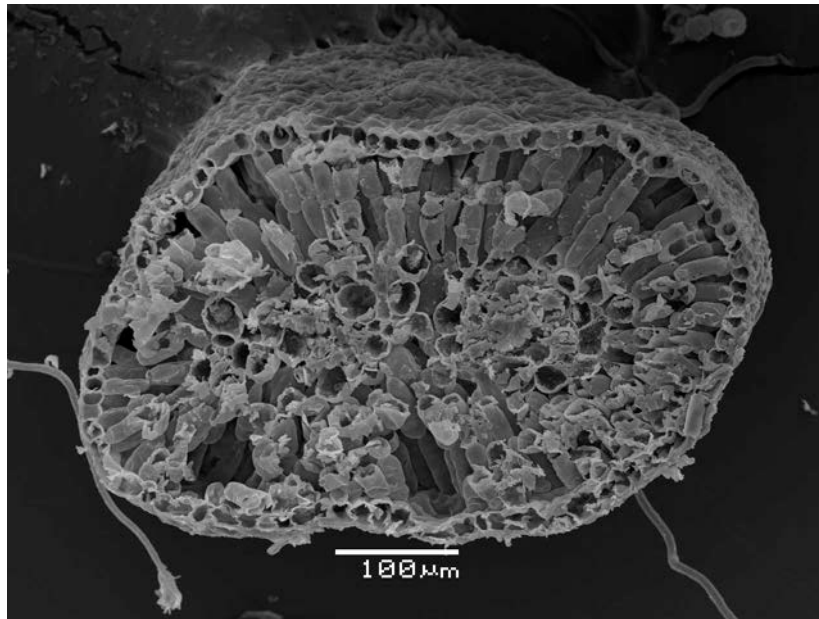


**Εικόνα 28:** Γενική άποψη του φύλλου από την κάτω μεριά, όπως φαίνεται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης σε κλίμακα 100nm. Εμφανή τα μη αδενώδη τριχώματα.

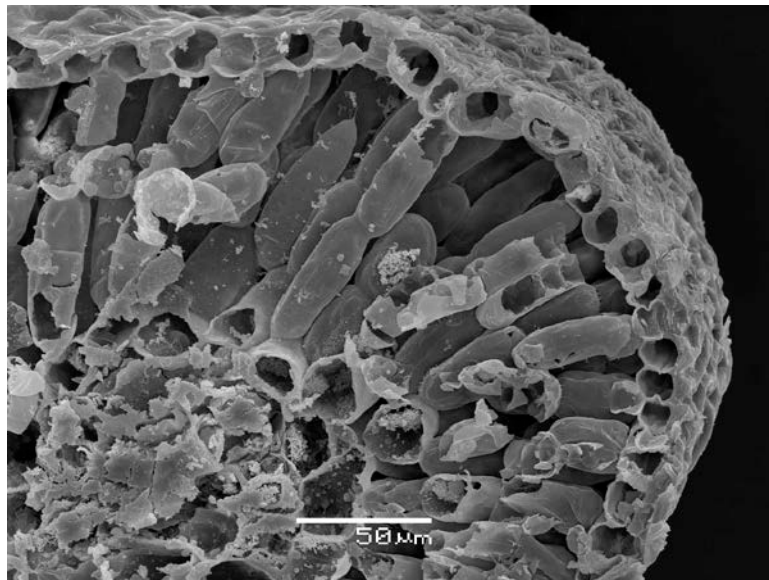


**Εικόνα 29:** Γενική εικόνα διάταξης των φύλλων όπως φαίνεται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, σε κλίμακα 200nm και 100nm.





**Εικόνα 30:** Τομή φύλλου, όπως φαίνεται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, σε κλίμακα 100nm.



**Εικόνα 31:** Χυμοτόπιο- μέσα στον οποίο φαίνονται οι χλωροπλάστες. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, σε κλίμακα 100nm.

## 4.Συζήτηση

### 4.1 Ιστοχημεία

#### 4.1.1 Τριχλωριούχο Αργίλιο ( $\text{AlCl}_3$ )

Όπως έχει αναφερθεί, με το τριχλωριούχο αργίλιο αναγνωρίζονται διάφορα είδη φλαβονοειδών φαινολών με βάση το χρώμα του αυτοφθορισμού τους. Ο αυτοφθορισμός αποτελεί διαγνωστικό χαρακτηριστικό των ενώσεων αυτών (παράγωγα της 2 φαινυλοχρωμόνης), με αποτέλεσμα να εμφανίζονται ποικίλα χρώματα (μπλε, πρασινοκίτρινο, κίτρινο και κόκκινο) κατά την παρατήρηση με το οπτικό μικροσκόπιο, εξαιτίας των διαφορετικών χημικών δομών τους (Wagner and Bladt, 1996).

Τα φλαβονοειδή ή οι φλαβονοειδείς φαινόλες αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα των φαινολικών ενώσεων, αφού περιλαμβάνουν πάνω από 5000 αναγνωρισμένα στελέχη (Harborne, 1993). Υπάρχουν μόνο στα φυτά και αποτελούν τμήμα των αμυντικών τους μηχανισμών. Επιπρόσθετα, τους προσφέρουν ανοσία απέναντι σε μύκητες, έντομα και άλλους επιβλαβείς οργανισμούς. Χημικά αποτελούνται από αρωματικούς και μη δακτυλίους, όπου συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς οξυγόνου-υδρογόνου. Ανάλογα με το βαθμό οξείδωσης του πυρανικού δακτυλίου διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες (παράγωγα του 2-φαινυλοβενζοπυριλίου, της 2-φαινυλοχρωμόνης, της φαινυλοχρωμανόνης και της βενζυλικεδενεκουμαρόνης) (Winkel-Shirpley, 2001) εκ των οποίων η δεύτερη έχει ταυτοποιηθεί στα είδη του γένους *Achillea* (Si et al., 2006).

Από τα παράγωγα της 2-φαινυλοχρωμόνης στα υπό μελέτη νωπά δείγματα των φύλλων του *Achillea millefolium*, εντοπίζονται φλαβόνες, οι οποίες φθορίζουν πρασινοκίτρινο το δρυφρακτοειδές παρέγχυμα και τα στόματα. Η ταυτοποίηση των ενώσεων αυτών στα φύλλα της Αχίλλειους συμφωνεί με τα συμπεράσματα της πλειοψηφίας των ερευνητών, σύμφωνα με τα οποία, οι φλαβόνες αποτελούν την κυριότερη ομάδα των αναγνωρισμένων φλαβονοειδών φαινολών στο συγκεκριμένο είδος (Falk et al., 1975, Tzakou et al., 1995, Si et al., 2006) (Πίνακας 6). Οι πιο σημαντικοί εκπρόσωποι των φλαβονών στην Αχίλλειο είναι: απιγενίνη, η λουτεολίνη και οι γλυκοσίδες τους (Bandyukova and Sergeeva, 1974, Guedon et al., 1993).

**Πίνακας 6:** Φλαβονοειδή που έχουν αναγνωρισθεί στο είδος *Achillea millefolium*.

Όνομα	R <sup>3</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	R <sup>7</sup>	R <sup>8</sup>	R <sup>2'</sup>	R <sup>3'</sup>	Πηγή
<b>Φλαβόνες</b>								
Luteolin	H	OH	H	OH	H	OH	OH	Guedon et al., 1993, Tzakou et al., 1995
Cynaroside	H	OH	H	Ogle	H	OH	OH	Horhammer , 1961
Lyteolin 7-malonyl glucoside	H	OH	H	Mal-Gle	H	OH	OH	Guedon et al., 1993
Apigenin	H	OH	H	OH	H	H	OH	Guedon et al., 1993
Cosmosiin	H	OH	H	OGlc	H	H	OH	Horhammer , 1961, Guedon et al., 1993, Tzakou et al., 1995 Stojanovic, et al., 2005
5- Hydroxy-3,6,7,4-tetramethoxyflavone	OMe	OH	OMe	OMe	H	OH	OMe	Falk et al., 1975
Casticin	OMe	OH	OMe	OMe	H	OH	OMe	Falk et al., 1975
Apigenin 7-malonyl glucoside	H	OH	H	Mal-Gle	H	H	OH	Guedon et al., 1993
<b>Φλαβόλη</b>								
Rutin	Orat	OH	H	OH	H	OH	OH	Guedon et al., 1993, Tzakou et al., 1995

Ο μπλε αυτοφθορισμός που παρατηρείται στην εφυμενίδα αποδίδεται κυρίως στις φλαβανόνες (Φασσέας, 1999). Εντούτοις, οι Combrinck et al. (2007) αναφέρουν ότι ο μπλε χρωματισμός που παρατήρησαν σε αδενώδη τριχώματα του φυτού *Lippia scaberrima* μπορεί επιπρόσθετα να οφείλεται στην παρουσία φαινολοκαρβοξυλικών οξέων και κουμαρίνης. Το γεγονός αυτό αποδίδεται από τους Wagner and Bladt (1996), στο ότι στην κατηγορία των φλαβονοειδών ενώσεων συχνά εντάσσονται και τα φαινυλοκαρβοξυλικά οξέα όπως καφεϊκό οξύ, κουμαρινικό οξύ, και χλωρογενικό οξύ, τα οποία φθορίζουν μπλε. Οι Fraisse et al. (2011), εξετάζοντας την ποιοτική και την ποσοτική σύσταση καφεϊκών παραγώγων σε φαρμακευτικά φυτά της οικογένειας Asteraceae, παρατήρησαν ότι πολλά από τα εξεταζόμενα είδη (π.χ. *Achillea millefolium*, *Tanacetum vulgare*) χαρακτηρίζονταν από υψηλές ποσότητες χλωρογενικού οξέος. Αντίθετα, παρατηρήθηκε σχεδόν πλήρης απουσία του chicoric οξέος.



Τέλος, ο Gersbach (2002) αναφέρει ότι το μπλε χρώμα του φθορισμού δεν αποδίδεται στις φλαβάνονες, οι οποίες παρατηρούνται ελάχιστα στη φύση, αλλά στην κουτίνη και την σουβερίνη, που αποτελούν δυο από τα κυριότερα χημικά συστατικά της εφυμενίδας.

Βάση των ανωτέρων διεξάγεται το συμπέρασμα ότι η ταυτοποίηση των φλαβανόνων με τη χρώση του τριχλωριούχου αργιλίου δεν αποτελεί αξιόπιστη ιστοχημική μέθοδο.

Σχεδόν σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξαν και οι Souza et al. (2006), οι οποίοι παρατήρησαν ότι μεταξύ των πέντε χρησιμοποιούμενων αντιδραστηρίων (Shinoda, Taubock, Pew,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{AlCl}_3$ ) για την ανίχνευση των φλαβονοειδών μόνο τα τρία έδωσαν θετική αντίδραση. Εκτός του παράγοντα αυτού, οι Simoes et al. (1999) υποστηρίζουν ότι η αρνητική αντίδραση μπορεί οφείλεται στην περίοδο δειγματοληψίας των φυτικών δειγμάτων καθώς στα χαρακτηριστικά του βιοτόπου όπου αναπτύσσεται το φυτό

#### **4.1.2 Θεϊκός σίδηρος ( $\text{FeSO}_4$ )**

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

Οι τανίνες είναι γενικές τοξίνες και ελαττώνουν την αύξηση και επιβίωση των φυτοφάγων που τις καταναλώνουν. Επιπλέον, δρουν απωθητικά της βόσκησης αφού προκαλούν μια έντονη στυπτική αίσθηση στο στόμα επειδή δεσμεύονται από τις σιελοπρωτεΐνες. Η δράση τους αυτή σχετίζεται με την ιδιότητά τους να αντιδρούν και να κατακρημνίζουν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλικών τους ομάδων και ηλεκτραρνητικών περιοχών του πρωτεϊνικού μορίου, είτε σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες (σε σημεία

όπου υπάρχουν αμινομάδες ή σουλφυδρυλομάδες), αφού προηγουμένως οξειδωθούν προς κινόνες παρουσία φαινολοξειδασών. Εκτός αυτού, δρουν ως παράγοντες οι οποίοι ευνοούν το σχηματισμό ελεύθερων μορφών οξυγόνου. Σε περίπτωση τραυματισμού του φυτικού ιστού, οι τανίνες των χυμοτοπίων έρχονται σε επαφή με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του ιστού και τις καθιστούν δύσπεπτες (Καραμπουρνιώτης, 2003).

Στο υπό μελέτη είδος, η ιστοχημική ανάλυση έδειξε ότι οι τανίνες εντοπίζονται κυρίως στο σκληρόγυμα και στα μη αδενώδη τριχώματα. Αντίθετα, η εφυμενίδα και τα κύτταρα του μεσόφυλλου δίνουν αρνητική αντίδραση. Το αποτέλεσμα αυτό σε συνδυασμό με την παρατεταμένη παραμονή των τομών φύλλων στο αντιδραστήριο αυτό (18 ώρες) φανερώνει τη δυσκολία διάχυσης του αντιδραστηρίου στα κύτταρα αυτά.

Οι τανίνες αν και δεν απαντώνται σε μεγάλες ποσότητες στα φύλλα των φυτών, η παρουσία τους στα φύλλα της Αχίλλειους έχει ταυτοποιηθεί από αρκετούς ερευνητές (Panizza, 1997, Martins et al., 2000, Lorenzi and Matos, 2002, Souza et al., 2006). Το γεγονός αυτό συγκλίνει με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, υποδεικνύοντας τη σημαντική συνεισφορά των συστατικών αυτών στην άμυνα των φυτικών ιστών έναντι αντίξων περιβαλλοντικών συνθηκών.

#### 4.1.3 Nadi

Με το αντιδραστήριο Nadi ταυτοποιούνται τα τερπένια στους διάφορους φυτικούς ιστούς. Τα τερπένια (ή ισοπρενοειδή) απαρτίζονται περίπου από 25000 μέλη. Συναντώνται σε μεγάλο αριθμό ανώτερων φυτών αλλά και σε βρυόφυτα, μύκητες και βακτηρία. Η σύνθεση τους είναι αποτέλεσμα αποκλειστικά φυσικών ενζυματικών αντιδράσεων. Η δομή τους προκύπτει από τη συνένωση κεφαλής – ουράς μονάδων ισοπροπενίου (2-μέθυλο-1,3-βουταδιένιο). Ο άνθρακας 1 ονομάζεται κεφαλή της ισοπρεπικής μονάδας, ενώ ο άνθρακας 4 θεωρείται η ουρά.

Τα τερπένια ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των ισοπρενικών μονάδων που περιέχουν και την ιδιαίτερη δομή κάθε μορίου σε 6 κατηγορίες (Buchanan et al., 2000): μονοτερπένια ( $C_{10}$ ), σεσκετερπένια ( $C_{15}$ ), διτερπένια ( $C_{20}$ ), σεστερτερπένια ( $C_{25}$ ), τριτερπένια ( $C_{30}$ ) και τετρατερπένια ( $C_{40}$ ).

Στα διάφορα είδη του γένους *Achillea*, έχουν ταυτοποιηθεί 136 τερπενοειδή, η πλειοψηφία των οποίων αντιπροσωπεύεται από την κατηγορία των σεσκιτερπένιων (Si et al., 2006). Εντούτοις, στο είδος *Achillea millefolium*, έχουν αναγνωριστεί μόνο πέντε τερπενοειδή, τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 7.

**Πίνακας 7:** Τερπενοειδή του φυτού *Achillea millefolium* (Si et al., 2006).

<b>12,6a-Guaianolides (Σεσκιτερπένια)</b>	<b>Πηγή</b>
Achillicin	Cuong et al., 1979, Kubeka et al., 1999
8a-(Tigloyloxy) artabsin 1,4-endoperoxide	Kubeka et al., 1999
8a-(Angeloyloxy) artabsin 1,4-endoperoxide	Kubeka et al., 1999
a-Longipin-2-en-1-one (longipinanes)	Kastner et al., 1996, Kubeka et al., 1999, Fischer, et al., 2001, Rauchensteiner et al., 2002
7b-Hydroxy-a-longipin-2-en-1-one	Kubeka et al., 1999, Rauchensteiner et al., 2002

Η παρουσία των συστατικών αυτών στα φύλλα του είδους *Achillea millefolium* επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, τα οποία συγκλίνουν με τα συμπεράσματα της πλειοψηφίας των ερευνητών (Si et al., 2006, Saeidnia et al., 2011, Bombo et al., 2012). Ειδικότερα, θετική αντίδραση δίνουν η εφυμενίδα, τα επιδερμικά κύτταρα τόσο της προσαξονικής όσο και της αποαξονικής επιφάνειας των φύλλων, τα στόματα, τα κύτταρα κεφαλής, μίσχου και βάσης (εφυμενίδα) του αδενώδους τριχώματος, οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες καθώς και οι σφαιρικές δομές (ελαιοσταγονίδια) στα κύτταρα του μεσόφυλλου.

Ιδιαίτερα αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε όλα τα κύτταρα του αδενώδους τριχώματος εντοπίζονται φλαβονοειδή. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι τα τερπένια όταν βγαίνουν στον υποεφυμενιδικό χώρο δεν υφίστανται χημικές τροποποιήσεις με αποτέλεσμα να είναι ανιχνεύσιμα με το αντιδραστήριο αυτό.

#### **4.1.4 Sudan IV**

Η κουτίνη και η σουβερίνη αν και αποτελούν βασικά δομικά συστατικά της εφυμενίδας των εναέριων φυτικών μερών και ορισμένων εσωτερικών ιστών (π.χ τα περιβλήματα των σπερμάτων, οι υποστοματικές κοιλότητες) στο υπό μελέτη είδος

η παρουσία τους δεν είναι ευδιάκριτα εμφανής. Ο χρωματισμός της εφυμενίδας, των ελαιοσταγονιδίων, της κεφαλής του αδενώδους τριχώματος καθώς και της βάσης του μη αδενώδους τριχώματος είναι ασθενής ερυθρός. Το αποτέλεσμα αυτό αντιτίθεται των αντίστοιχων του Werker (2000), ο οποίος υποστηρίζει ότι τα κυτταρικά τοιχώματα των κυττάρων του μίσχου στα αδενώδη τριχώματα είναι ενισχυμένα σε κουτίνη προκειμένου να αποτραπεί η αποπλασμική οδός.

#### 4.1.5 Dragendorff

Σύμφωνα με πρόσφατη βιβλιογραφική ανασκόπηση, το αντιδραστήριο Dragendorff χρησιμοποιείται εκτός για την ανίχνευση των αλκαλοειδών και για την ταυτοποίηση τριτοταγών αμινών με τη μέθοδο της χρωματογραφίας με λεπτή στοιβάδα (TLC)(Harborne,1991). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι το Dragendorff κατακρημνίζει τις πρωτεΐνες (Evans,1996), συνάγει στο συμπέρασμα ότι τα αποτελέσματα που παραλαμβάνονται με αυτή την μέθοδο θα πρέπει να ερμηνεύονται με ιδιαίτερη προσοχή (Pereira and Carrariço, 2007).

Στην παρούσα διατριβή, το αποτέλεσμα μετά από την χρώση των τομών φύλλων στο αντιδραστήριο αυτό είναι αρνητικό (Πίνακας 8). Κανένας φυτικός ιστός δεν χρωματίζεται, συμπεραίνοντας είτε την απουσία των αλκαλοειδών στο υπό μελέτη είδος είτε την αδύναμη ταυτοποίηση τους με τη συγκεκριμένη μέθοδο λόγω της πολύ μικρής συγκέντρωσής τους. Απουσία αλκαλοειδών μετά από ιστοχημική ανάλυση με τέσσερα διαφορετικά αντιδραστήρια Drangedorff, Boucharda, Mayer, Bertrand, παρατήρησαν και οι Souza et al. (2009) σε φύλλα του *Achillea millefolium*, αναπτυσσόμενο στην Ισπανία.

Ωστόσο, σε αντίθετα συμπεράσματα οδηγήθηκαν οι Panizza, (1997), Martins et al. (2000) και Lorenzi and Matos (2002), αποδίδοντας τη θετική χρώση των φυτικών ιστών στην Αχιλλεΐνη, τον κυριότερο εκπρόσωπο της κατηγορίας των αλκαλοειδών, που έχουν ταυτοποιηθεί στην Αχιλλεΐο.

**Πίνακας 8:** Συγκεντρωτικός πίνακας ιστοχημείας.

Χρωστική	Ενώσεις που χρωματίζει	Ιστοί και κυτταρικές δομές που αντιδρούν
Τριχλωριούχο Αργίλιο	Φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβονόλες	Τα στόματα, το δρυφρακτοειδές παρέγχυμα, η εφυμενίδα καθώς και τα ελαιοσταγονίδια των κυττάρων του μεσόφυλλου.
FeSO <sub>4</sub>	Τανίνες	Τα μη αδενώδη τριχώματα και το σκληρέγχυμα των ηθμαγγειωδών δεσμίδων.
Nadi	Τερπενοειδή	Η εφυμενίδα, τα επιδερμικά κύτταρα της προσαξονικής και της αποαξονικής επιφάνειας των φύλλων, τα αδενώδη τριχώματα καθώς και οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες.
Sudan IV	Λιπίδια	Τα ελαιοσταγονίδια των κυττάρων του μεσόφυλλου, η εφυμενίδα, η κεφαλή του αδενώδους τριχώματος καθώς και η βάση του μη αδενώδους τριχώματος.
Dragendorff	Αλκαλοειδή	Κανένας

#### 4.2 Ανατομία φύλλων

Για την ανατομική περιγραφή του φύλλου της Αχίλλειους συνδυάστηκαν τα αποτελέσματα των ιστοχημικών αναλύσεων και τα αντίστοιχα του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.

Τα κύτταρα του μεσόφυλλου συσσωρεύουν ελαιοσταγονίδια, τα οποία δίνουν θετική αντίδραση τόσο με το Nadi όσο και με το Sudan IV (Εικόνα 18δ και 19α). Το αποτέλεσμα αυτό φανερώνει την λιπαρή φύση αυτών των σφαιροειδών δομών όπως τερπένια, έλαια και λιπαρά οξέα.

Ενδιαφέρον, επίσης παρουσιάζει η κατανομή τους στο φύλλο. Όπως προκύπτει από τις εικόνες 17γ και 19β, τα ελαιοσταγονίδια αν και παρατηρούνται σε όλο το μεσόφυλλο, η συγκέντρωσή τους είναι σχετικά πιο αυξημένη κάτω από την άνω επιδερμίδα.

Σχετικά με το στρώμα των τριχών (*indumentum*), η επιφάνεια του φύλλου *Achillea millefolium* επικαλύπτεται κυρίως από αδενώδη τριχώματα (Εικόνα 25), ενώ στην κάτω επιφάνεια είναι πιο έντονα τα μη αδενώδη τριχώματα (Εικόνα 28). Το αποτέλεσμα αυτό συγκλίνει με τα αντίστοιχα των Nirmala and Karthiyayini (2010), οι οποίοι μετά από εξέταση των ανατομικών χαρακτηριστικών των φύλλων του *Achillea millefolium*, διαπίστωσαν την παρουσία αδενωδών και μη αδενωδών τριχών στην προσαξονική επιφάνεια των φύλλων.

Τα αδενώδη τριχώματα που καλύπτουν τα εναέρια τμήματα των φυτών είναι γνωστά για την έκκριση των αιθέριων ελαίων, ενώ η παρουσία τους στη βάση των φύλλων αποσκοπεί στην προστασία τους από φυτοφάγα ζώα καθώς και από μικρόβια. Σύμφωνα με την πρόσφατη ανατομική μελέτη του Nirmala and Karthiyayini (2010), σε αναπτυσσόμενη Αχιλλέα στην Ινδία, τα αδενώδη τριχώματα είναι δίσειρα με μήκος 80  $\mu\text{m}$  και πλάτος 40  $\mu\text{m}$ , ενώ τα μη αδενώδη τριχώματα, είναι μονόσειρα, με ποικίλο μήκος. Το πάχος τους είναι 650 $\mu\text{m}$ , η διάμετρος της απόληξης του τριχώματος είναι 15 $\mu\text{m}$ , ενώ αντίστοιχη των κυττάρων στη βάση 30 $\mu\text{m}$ .

Στην παρούσα διατριβή, όπως διαφαίνεται από την εικόνα 28, οι μη αδενώδεις τρίχες, είναι μακριές και διακλαδιζόμενες. Όσον αναφορά την ποσότητα τους αν και δεν είναι πολλές, φαίνονται πυκνές εξαιτίας της διακλάδωσης τους και του μεγάλου μήκους τους. Έτσι με αυτό τον τρόπο σχηματίζεται ένα σχετικά πυκνό πλέγμα προστασίας της αποαξονικής και προαξονικής επιφάνειας του φύλλου.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι η παρουσία τους είναι ιδιαίτερα έντονη στη μέση πλευρά, στην περιοχή όπου υπάρχει αλληλοεπικάλυψη των φύλλων (Εικόνα 26 και 29). Η παρουσία τους σε αυτό το σημείο αποσκοπεί στην προστασία των φύλλων ώστε να μην ακουμπάει το ένα με το άλλο και να μην υπάρχει διάκενο. Με αυτόν τον τρόπο, οι μη αδενώδεις τρίχες εμποδίζουν τα έντομα να διεισδύσουν στα φύλλα.

Εκτός από τον τύπο των τριχωμάτων, ιδιαίτερο ενδιαφέρον ανατομικό χαρακτηριστικό των φύλλων της Αχιλλείου, είναι οι αιχμηρές απολήξεις, στα κράσπεδα των φύλλων (Εικόνα 21δ, 27 και 28). Παρουσιάζονται 3 έως 4 σε κάθε

φυλλάριο και δεν φαίνεται να έχουν κάποια συγκεκριμένη λειτουργία, αφού δεν υπάρχει σκληρόγυμα (κύτταρα λιγνίνης).

Όσον αναφορά τα στόματα, εμφανίζονται και στις δυο επιφάνειες των φύλλων, δηλαδή από την άνω πλευρά μέχρι την άκρια ενώ από την κάτω μέχρι το σημείο που υπάρχει αλληλοεπικάλυψη (Εικόνα 21δ). Επομένως, το φυτό χαρακτηρίζεται ως αμφιστοματικό, όπως αρκετά είδη της οικογένειας Compositae (εκτός του *Artemisia armeniaca*) (Zarinkamar, 2007). Η αμφιστοματικότητα όπως αναφέρουν, οι Terashima et al. (2006) βοηθάει στη μείωση της αντίστασης στη διάχυση του CO<sub>2</sub>. Επίσης, οι Fahm and Cutler (1992) υποστηρίζουν πως η παρουσία των στομάτων στην προσαξονική και αποαξονική πλευρά των φύλλων, συντελεί επιπρόσθετα, στη ταχύτερη ανταλλαγή αερίων καθώς και στην ταχύτερη ψύξη του.

Ο Zarinkamar (2007) εξετάζοντας τα χαρακτηριστικά των στομάτων 470 φυτικών ειδών δικοτυλήδωνων, τα οποία άνηκαν σε 65 οικογένειες, οδηγήθηκαν στα ακόλουθα συμπεράσματα για το είδος *Achillea millefolium*:

- η πυκνότητα των στομάτων στην προσαξονική επιφάνεια είναι 89.68 mm<sup>2</sup> ενώ στην αποαξονική 39.73 mm<sup>2</sup>.
- Το μέγεθος των στοματικών κυττάρων είναι 35.528 nm στην προσαξονική επιφάνεια και 35.317 nm στην αποαξονική.
- Τα στόματα ανήκουν στο ανισοκυτικό τύπο, τα οποία περιβάλλονται από τρία παραστοματικά κύτταρα, το ένα εκ των οποίων είναι συνήθως μικρότερο από τα άλλα δύο.

Άλλο χαρακτηριστικό που πρέπει να αναφερθεί είναι η θέση των στομάτων σε σχέση με τα επιδερμικά κύτταρα. Όπως φαίνεται στις εικόνες 21γ και 23, τα στόματα είναι κυρίως ελαφρώς υπερυψωμένα σε σχέση με τα επιδερμικά κύτταρα, ενώ υπάρχουν και στόματα των οποίων τα καταφρακτικά κύτταρα βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο με τα επιδερμικά κύτταρα (Εικόνα 21α).

Σύμφωνα με αδημοσίευτα αποτελέσματα του Καθηγητή Κώστα Φασσέα, η διάταξη των στομάτων στα φύλλα της Αχίλλειους είναι παρόμοια με την αντίστοιχη στα φύλλα του *Juniperus phoenicea* L, το οποίο χαρακτηρίζεται εξίσου από λεπιοειδή φύλλα.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα κυριότερα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω:

- Το είδος *Achillea millefolium*, είναι ένα πολυετές ποώδες φυτό. Η ταξιανθία του είναι σκιάδιο και χαρακτηρίζεται από σύνθετα λεπιοειδή φύλλα που του προσδίδουν μια γκρίζο-πράσινη απόχρωση.
- Η Αχίλλειος είναι ένα φυτό της ελληνικής χλωρίδας με πολλαπλές θεραπευτικές-φαρμακευτικές ιδιότητες. Μνημονεύεται τόσο για την ανθεκτικότητα της στην ξηρασία όσο και για την ευρεία προσαρμοστικότητα στις εδαφοκλιματικές απαιτήσεις.
- Από την ανατομική μελέτη των φύλλων της Αχίλλειους, διαπιστώνεται το πυκνό δίκτυο των μη αδενώδων τριχωμάτων στη μέση πλευρά, όπου υπάρχει αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των φυλλαρίων.
- Τα αδενώδη τριχώματα είναι πολυάριθμα στην προσαξονική επιφάνεια των φύλλων.
- Τα στόματα εμφανίζονται και στις δυο πλευρές των φύλλων και είναι ανισοκυτικού τύπου.
- Χαρακτηριστικές είναι οι αιχμηρές απολήξεις στα κράσπεδα των φύλλων, οι οποίες όμως δεν έχουν κάποιο ιδιαίτερο λειτουργικό ρόλο.
- Όσον αφορά στα αποτελέσματα των ιστοχημικών αναλύσεων, τα εξεταζόμενα φυτικά δείγματα της Αχίλλειους αντέδρασαν θετικά σε όλες τις χρώσεις εκτός του Drangedorff. Η αρνητική χρώση στο αντιδραστήριο αυτό είναι μη αναμενόμενη, λαμβανομένου υπόψη ότι η Αχίλλειος είναι ιδιαίτερα γνωστή για τις θεραπευτικές ιδιότητες του κυριότερου αλκαλοειδούς της, την Αχιλλειΐνη.
- Σχετικά με τα παράγωγα της 2-φαινυλοχρωμόνης, φλαβονοειδή ταυτοποιήθηκαν στα στόματα, στο δρυφρακτοειδές παρέγχυμα, στην εφυμενίδα καθώς και στα ελαιοσταγονίδια των κυττάρων του μεσόφυλλου.
- Έντονη χαρακτηρίζεται και η παρουσία των τερπενοειδών. Η μπλε χρώση ως αποτέλεσμα της επαφής των φυτικών ιστών με το αντιδραστήριο Nadi ήταν εμφανής στην εφυμενίδα, στα επιδερμικά κύτταρα της προσαξονικής και της



αποαξονικής επιφάνειας των φύλλων, στα αδενώδη τριχώματα καθώς και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες.

- Η αμυντική δράση των φυτικών ιστών έναντι αντίξων περιβαλλοντικών συνθηκών, ενισχύεται και από την ταυτοποίηση των τανινών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μικρές ποσότητες στο υπό μελέτη είδος.
- Η παρουσία των λιπιδίων δεν είναι ευδιάκριτα εμφανής, αφού παρατηρείται ασθενής ερυθρός χρωματισμός της εφυμενίδας, των ελαιοσταγονιδίων, της κεφαλής του αδενώδους τριχώματος καθώς και της βάσης του μη αδενώδους τριχώματος.
- Με το  $\text{FeSO}_4$  και το Sudan IV το ανιχνεύθηκαν τα εκκρίματα των μη αδενωδών τριχωμάτων.
- Στα αδενώδη τριχώματα εντοπίστηκαν τερπενοειδή καθώς και λιπίδια στα κύτταρα της κεφαλής τους.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ελληνική βιβλιογραφία

- Ακουμιανάκη, Α., Ευθυμιάδου Ε. και Τσιγκριστάρης, Κ. (2009): Φυτά Κηποτεχνίας.
- Καραμπουρνιώτης, Γ.Α (2003): Φυσιολογία καταπονήσεων των φυτών. Οι λειτουργίες των φυτών κάτω από αντίξοες συνθήκες. Εκδόσεις Έμβρυο.
- Κατσιώτης, Σ. και Χατζοπούλου, Π. (2010): Αρωματικά Φαρμακευτικά φυτά και Αιθέρια Έλαια. Θεσσαλονίκη, Εκδόσεις Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε.
- Κουτσός, Θ. (2012) Το Βασίλειο των φυτών (από τον Linnaeus στον Woese) Συστηματική Βοτανική Αγγειοσπέρμων (APG III vs Cronquist). <http://plantsoftheworld.files.wordpress.com/2012/02/to-vasileio-ton-fiton1.pdf>. (Προσπελάστηκε στις 8/10/2012).
- Μποζαμπαλίδης, Α.Μ. (2008): Δομή και λειτουργία των αδενικών τριχών που παράγουν αιθέριο έλαιο στα φύλλα του δίκταμου. Εργαστήριο Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Μποζαμπαλίδης, Α.Μ. (2008): Οι αδένες των φυτών. Θεσσαλονίκη.
- Στεφανάκη, Μ. (1999): Συστηματική Βοτανική Αγγειόσπερμα. Τόμος Α. Εκδόσεις Σταμούλης.
- Φασσέας, Κ. (1999): Λεπτή δομή κυττάρου-Μικροσκοπία Εφαρμοσμένη στην Γεωπονία. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις.

### Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Abu-Niaaj, L., Abu-Zarga, M., and Abdalla, S.S. (1996): Isolation and inhibitory effects of eupatilin, a flavone isolated from *Artemisia monosperma* Del., on rat isolated smooth muscle. *Pharmaceutical Biology*.34:134-140.
- Babaei, M., Abarghoei, M.E., Akhavan, M.M., Ansari, R., Vafaei, A.A., Taherian, A.A., Mousavi, S., and Toussy, J. (2007): Antimotility effect of hydroalcoholic extract of yarrow (*Achillea millefolium*) on the guinea-pig ileum. *Pak Journal of Biology Science*.10:3673-3677.

- Baggio, C.H., Freitas, C.S., Nhaducue, P.F., Rieck, L., Marques, M.C.A. (2002): Action of crude aqueous extract of leaves of *Achillea millefolium* L. (Compositae) on gastrointestinal tract. *Revista Brasileira De Farmacognosia* 12:31-33.
- Bandyukova, V.A. and Sergeeva, N. V. (1974): Polyphenols of Compounds in Several Plants of the family Compositae. *Aktual'nye Voprosy Farmatsii.* 2:79-81.
- Benedek, B. and Kopp, B. (2007). *Achillea millefolium* L. s.l. revisited: Recent findings confirm the traditional use. *Wiener Medizinische Wochenschrift.*157:312–314.
- Blumenthal, M., Goldberg, A., and Brinckmann, J. (2000): *Herbal Medicine, expanded commission E monographs* (pp. 419–423). Austin: American Botanical Council.
- Bombo, A. B., de Oliveira, T.S., da Silva, A., de Oliveira, S., Rehder, V.L.G., Magenta, M.A.G., and da-Glória B. A. (2012) : Anatomy and essential oils from aerial organs in three species of *Aldama* (Asteraceae–Heliantheae) that have a difficult delimitation. *Australian Journal of Botany* 60: 632-642
- Bosabilidis, A.M. and Tsekos, I. (1982): Glandular scale development and essential oil secretion in *Origanum dictamnus* L. *Planta.* 156: 496-504.
- Bourdot, G.W. (1980): A study of the growth and development of yarrow (*Achillea millefolium* L.). Doctoral thesis. University of the Canterbury New Zealand.
- Bourdot, G.W., White, J.G.H., and Field, R.J. (1979): Seasonality of growth and development in yarrow. *Proceedings of the New Zealand Weed and Pest Control Conference.* 32:49-54.
- Bremer, K. (1989): Les Asteracées. *La Recherche.* 20: 864-874.
- Buchanan, B., Gruissem, W., and Jones, R.L. (2000): *Biochemistry and Molecular Biology of Plants.* American Society of Plant Physiologists, Rockville, M.L.
- Cavalcanti, A.M., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Rieck, L., de Sousa R.S., Da Silva-Santos, J.E., Mesia-Vela, S., and Marques, M.C.A.(2006): Safety and antiulcer

efficacy studies of *Achillea millefolium* L. after chronic treatment in wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*.107:277-284.

- Chalchat, J.-C., Gorunovic, M.S., and Petrovic, S.D. (1999): Aromatic Plants of Yugoslavia. I. Chemical composition of oils of *Achillea millefolium* L. ssp. *pannonica* (Scheele) Hayak, *A. crithmifolia* W. et K., *A. serbica* Nym. and *A. tanacetifolia* All. *The Journal of Essential Oil Research*.11:306–310.
- Clapham, A.R., Tutin, T.G., and Warburg, E.F. (1962): *Flora of the British Isles*. 2d ed. Cambridge: University Press.1269 p.
- Clark, G. (1981): *Staining Procedures*. 4th Edition. Williams and Wilkins.
- Clausen, J., Keck, D.O. and Hiesey, W.M. (1958): Experimental studies on the nature of species. III. Environmental responses of climatic races of *Achillea*. Carnegie Institution of Washington Publication 581. Baltimore: The Lord Baltimore Press. 129 p.
- Cuong, B.N., Eszter, G.B., Lajos, R., Jozsef, T., Kalman, U., and Gizella, V.P. (1979): Achillicin the first proazulene from *Achillea millefolium* *Phytochemistry*.18: 331.
- de Santanna, J.R., Franco, C.C., Miyamoto, C.T., Cunico, M.M., Miguel, O.G., Cocco, L.C., Yamamoto, C.I., Junior, C.C., and de Castro-Prado, M.A. (2009): Genotoxicity of *Achillea millefolium* essential oil in diploid cells of *Aspergillus nidulans*. *Phytotherapy Research*. 23:231-235.
- Evans, C. (1996): *Trease and Evans' pharmacognosy*. London: WB Saunders.
- Fahn, A and Cutler, D.F. (1992): Xerophytes. In: Braun HJ, Carlquist S, Ozenda D., Roth I. eds. *Encyclopedia of plants anatomy*. Vol XIII3. Gebruder Borntraeger. Berlin-Stuggard:58-84.
- Fahn, A. (2000): Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research*. 31: 37-75.
- Falk, A.J., Smolenski, S.J., Bauer, L. and Bell, C.L. (1975): Isolation and identification of three new flavones from *Achillea millefolium* L. *Journal of Pharmacology Science*.64:1838-1842.
- Fenner, M. (1978): Susceptibility to shade in seedlings of colonizing and closed turf species. *New Phytologist*. 81:739-744.

- Figueiredo, A. and Pais, M.S. (1994): Ultrastructure aspects of the glandular cells from the secretory trichomes a from the cell suspension cultures of *Achillea millefolium* L. ssp. *millefolium*. *Annals of Botany*.74:179-190.
- Fischer, U., Vetter, S., Novak, J., Glasl, S., Saukel, J., and Franz, C. (2001): Inheritance of the sesquiterpenes longipinenone and hydroxy-longipinenone within the *Achillea millefolium* complex (Compositae). *Plant Breeding*.120: 251-254.
- Fraisse, D., Felgines, C., Texier, O., and Lamaison J.-L. (2011): Caffeoyl derivatives: Major antioxidant compounds of some wild herbs of the Asteraceae family. *Food and Nutrition Sciences*. 2:181-192.
- Garthwaite, W.T. (1930): Ridding lawn of yarrow. *New Zealand Journal of Agriculture* 40: 359.
- Gersbach, P.V. (2002): The essential oil secretory structures of *Prostanthera ovalifolia* (Lamiaceae). *Annals of Botany*. 89:255 – 260.
- Gersbach, P.V. Wyllie, S.G. and Sarafis, V. (2001): A new histochemical method for localization of the site monoterpene phenol accumulation in plant secretory structures. *Annals of Botany* 88:521-525.
- Gray, A. (1950): *Handbook of the flowering plants and ferns of the central and northeastern United States and adjacent Canada*. 8th ed. New York : D. Van Nostrand Company.
- Grimstone, A. and Skaer, R. (1972): *A guidebook to microscopical methods*. Cambridge University Press, London.
- Guedon, D. Abbe, P. and Lamaison, J. L. (1993): Leaf and Flower Head Flavonoids of *Achillea millefolium* L. Sub-species. *Biochemical Systematics and Ecology*.5:607-611.
- Hamidi, H., Jahanian, R., and Pourreza, J. (2010): Effect of dietary betaine on performance, immunocompetence and gut contents osmolarity of broilers challenged with a mixed coccidial infection. *Asian Journal of Animal and Veterinary*.5:193-201.

- Hammad, H.M., and Abdalla, S.S. (1997): Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum: Structure-activity relationship. *General Pharmacol: The Vascular System*. 28:767-771.
- Hanf, M. (1974): Weeds and their seedlings. Hadliegh, Ipswich BASF, United Kingdom. 348 p.
- Harborne, J.B. (1991): *Phytochemical methods. A guide to modern of plant analysis*. London: Chapman & Hall.
- Harborne, J.B. (1993): *Introduction to Ecological Biochememistry (Fourth Edition)*. Academic Press, London, 318pp.
- Hegazy, M-E F, Abdel-Lateff, A., Gamal-Eldeen, A.M., Turkey, F., Hirata, T., Pare, P.W., and Karchesy, J.K. (2008): Anti-inflammatory activity of new guaiane acid derivatives from *Achillea coarctata*. *Natural Product Communications*.3:851-856.
- Hilgendorf, F.W., and Calder, J.W. (1952): *Weeds of New Zealand and how to eradicate them*. 5th ed. New Zealand Whitcombe and Tombs. 260 p.
- Holm, L., Pancho, J.V., Herberger, J.P., Plucknett, D.L. (1979). *A geographical atlas of world weeds*. Canada: John Wiley. 391 p.
- Jensen, W.A. (1962). *Botanical Histochemistry\_Principles and Practice*. 1rst Edition. W.H. Freeman and Company.
- Jonhansen, D. (1940): *Plant microtechnique*. Edition I. Mc Graw-Hill.
- Kaloshina, N. A. and I. D. Neshta (1973): Flavonoids of *Achillea millefolium*. *Chemistry of Natural Compounds*. 9: 261.
- Kaminski, P. and Katz, R. (1994): *Flower Essence Repertory. A Comprehensive Guide to North American and English Flower Essences for and Spiritual Well-Being*. Nevada City, CA, Flower Essence Society (ed).
- Kastner, U., J. Jurenitsch, S. Glasl, B. Follrich, A. Gavanelli, H. Schroeder, M. Schubert-Zsilavec, W. Schmidt, E. Haslinger, and W. Kubelka (1996): Longipinen and Achillifolin derivatives from *Achillea-illefolium* Type «Dis-A» *Pharmazie*.51:503-505.

- Kiumarsi, A., Abomahboub, R., Rashedi, S.M. and Parvinzadeh, M. (2009): *Achillea millefolium*, a new source of natural dye for wool dyeing. *Progress in Color Colorants and Coatings*.2:87-93.
- Kubelka, W., U. Kastner, S. Glasl, J. Saukel, J. Jurenitsch, *Biochem. Syst. Ecol.* 1999, 27, 437.
- Lambert, J. (1963): Effect of the 1962 spring drought on the behavior of some grass swards in the Ardennes. *Revue de l'agriculture, Bruxelles* 16(11): 1593-1604. From: *Herbage Abstracts* (1964) 34:1356.
- Levy, E.B. (1931): Weeds in lawns and greens. Competition effects and control by treatment. *New Zealand Journal of Agriculture*. 42: 406.
- Lorenzi, H. and Matos, F.J.A. (2002): Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. p.129-130.
- Martins, E.R., Castro, D.M., Castellani, D.C., Dias, J.E. (2000): Plantas Medicinais. Viçosa: UFV. p. 150- 152.
- Matthews, L.J. (1975): Weed control by chemical methods. 2d. ed. Wellington: Government Printer. 710 p.
- McCaskill, L.W. (1947): Yarrow. *Lincoln College Rural Education Bulletin*. 2:13-14.
- McIntrye, M., Michael, R, Duff, G. and Stevens, J. (1999): *The complete new herbal: A Practical Guide to Herbal Living* Gaia Books, Ltd. London.
- Montanari, T, de Carvalho, J.E., and Dolder, H. (1998): Antispermatic effect of *Achillea millefolium* L. in mice. *Contraception*. 58:309-313.
- Mukula J., Raatikainen M., Lallukka, R. and Raatikainen, T. (1969): Composition of weed flora in spring cereals in Finland. *Annales Agriculturae Fenniae*. 8:59-110.
- Newall, C.A., Anderson, L.A., and Phillipson, J.D. (1996): *Herbal medicines: A guide for healthcare professionals* (pp. 271–273). London: Pharmaceutical Press.
- Nirmala, S., and Karthiyayini, T. (2010): Pharmacognostical studies on leaves of *Achillea millefolium* L. *Journal of Pharmacy Research*.3:1114-1118.

- Ody, P. (1993): The herb society's complete medicinal herbal. Dorling Kindersley limited, London.
- Panizza, S. (1997): Plantas que curam: cheiro de mato. 17ed. São Paulo: IBRASA, 1997. p.44-45.
- Pasqua, G., Monacelli, B. and Silvestrini, A. (2003): Accumulation of essential reaction to root differentiation in *Angelica archangelica* L. European Journal of Histochemistry. 47:87-90.
- Pearse, A.G.E. (1995): Histochemistry. Theoretical and applied. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Pereira, A.L., and Carrapiço, F. (2007): Histochemistry of simple hairs from the foliar cavities of *Azolla filiculoides*. Plant Biosystems.14:323 – 328
- Potrich, F.B., Allemann A., da Silva L.M., dos Santos A.C., Baggio C.H., Freitas, C.S., Mendes, D.A.G.B., Andre, E., de Paula Werner, M.F., and Marques, M.C.A. (2010): Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L. Involvement of the antioxidant system. Journal of Ethnopharmacology. 130: 85-92.
- Rahmalia, A. (2011): A qualitative and quantitative evaluation of terpenoid and alkaloid in root and stem of Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*, Jack). Journal matematika Dan Sains.16:49-52.
- Rauchensteiner, F.S., Nejati, S., Werner, I., Glasl, S., Saukel, J., Jurenitsch, J., and Kubelka, W. (2002): Determination of taxa of the *Achillea millefolium* group and *Achillea crithmifolia* by morphological and photochemical methods. I. Characterisation of Central european taxa. Scienta Pharmaceutica. 70:199-203.
- Reynolds, D.G. (1961). Yarrow as a weed and seed crop. New Zealand-Journal of Agriculture 102:257-258.
- Rice-Evans, C.A., Miler, N.J., and Pagana, G. (1997): Antioxidant properties of phenolic compounds. Trend in plant science. 2: 152-159.
- Saeidinia, S. Gohari, A.R. Mokhber –Dezfuli, N. and Kiuchi, F. (2011): A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achilles*. Daru.19:173-186.



- Saeidnia, S., Gohari, A.R., and Yassa, N.(2004): A search for betaine compounds within the Iranian Achillea. International Journal of Biology and Biotechnology. 1:719-720.
- Saeidnia, S., Yassa N., and Rezaeipoor, R. (2004): Comparative investigation of the essential oils of *A.talagonica* Boiss and *A millefolium* L, Chemical composition and immunological studies. Journal of Essent Oil Research 16:262-264.
- Sancho, G., and Katinas, L. (2002): Are the trichomes in corollas of Mutisieae (Asteraceae) really twin hairs? Journal of the Linnean Society.140:427–433.
- Scott, D., and Maunsell, L.A. (1974): Diet and mineral nutrition of sheep on undeveloped and developed tussock grassland. 2. Vegetation composition and availability. New Zealand Journal of Agricultural Research 17: 177-189.
- Si, X.T., Zhang, M.L., Shi, Q.W. and Kiyota, H. (2006): Chemical Constituents of the Plants in the Genus Achillea. Chemistry and Biodiversity.3:1163-1180
- Small, E., Brousseau, F., and Catling, P.M. (2000): Les cultures medicales canadiennes. Archives nationales du Canada, Conseil national de recherches Canada, Musée canadien de la poste.
- Smelcerovic, A., Lamshoeft, M., Radulovic, N., Ilic, D., and Palic, R. (2010): LC–MS Analysis of the Essential Oils of *Achillea millefolium* and *Achillea crithmifolia*. Chromatographia.71:113-116.
- Souza, T. M., Rangel, V. L. B. I., Pietro, R. C. L. Rr., Santos, L. E., and Moreira, R. R. D (2006): Phytochemical screening of *Achillea millefolium* harvested at Araraquara – SP. Revista Brasileira de Plantas Medicinai. 8: 151-154, 2006.
- Stojanovic, G., Radulovic, N., Hashimoto, T., and Palic, R. (2005): In vitro antimicrobial activity of extracts of four *Achillea* species. The composition of *Achillea clavennae* L. (Asteraceae) extract. Journal of Ethnopharmacology. 101:185-190.
- Strid, A., and Tan, K. (1991): Mountain Flora of Greece,vol. 2. Edinburgh University Press, Edinburgh pp. 431-455.

- Sulborska, A., and Weryszko-Chmielewska, E. (2006): Morphology, anatomy and ultrastructure of yarrow (*Achillea millefolium* L.) floral nectaries. *Acta Agrobotanica*. 59: 17-28.
- Terashima I., Hanba Y.T., Tazoe Y., Vyas P. and Yano S. (2006): Irradiance and phenotype : comparative eco-development of sun and shade leaves in relation photosynthetic CO<sub>2</sub> diffusion. *Journal of Experimental Botany* 57: 343-354.
- Turner, G.W., Gershenzon, J. and Croteau R.B. (2000b): Development of peltate glandular trichome of Peppermint. *Plant Physiology* 124. 665-679.
- Tzakou, O., Couladis, M., Verykokidou, E., and Loukis, A. (1995): Leaf flavonoids of *Achillea ligustica* and *Achillea holosericea*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 23:569-570.
- Wagner, H, and Bladt, S. (1996): *Plant drug analysis: a thin layer chromatographic atlas*, 2nd edn. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Werker, E. (2000): Trichome diversity and development. *Advances in Botanical Research*. 31. 1-35.
- Werner, I., Mucaji, P., Presser, A., and Glasl, S. (2007): Sesquiterpenes and phenolic compounds from *Achillea clypeolata*. *Zeitschrift für Naturforschung B*. 62:267-271.
- Winkel-Shirpley, B. (2001): Flavonoid biosynthesis. A colorful method for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiology*. 126: 485-493.
- Zarinkamar, F. (2007): Stomatal observations in some dicotyledons. *Pakistan Journal of Biological sciences*. 10:199-217.

#### **Ισότοποι:**

- <http://www.landcareresearch.co.nz/resources/identification/plants/weedy-daisy-key/asteraceae-in-the-south-pacific>. (Προσπελάστηκε στις 25/10/2012).
- <http://plants.usda.gov>. (Προσπελάστηκε στις 1/10/2012).

- [http://zipcodezoo.com/Plants/A/Achillea\\_millefolium](http://zipcodezoo.com/Plants/A/Achillea_millefolium) (Προσπελάστηκε στις 9/9/2012).
- <http://www.sacredearth.com/ethnobotany/plantprofiles/yarrow.php> (Προσπελάστηκε στις 21/10/2012).
- [www.briargate.org](http://www.briargate.org) (Προσπελάστηκε στις 13/2/2013)