

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΜΕ ΤΙΤΛΟ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ

**Ανατομικές και Φυσιολογικές διαφορές μεταξύ των
φύλλων διαφορετικής ηλικίας της χαρουπιάς
(*Ceratonia siliqua*)**

Μεταπτυχιακή ερευνητική εργασία

Αικατερίνη Α. Κοντογιώργου

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΦΑΣΣΕΑΣ

Αθήνα 2012

Μεταπτυχιακή ερευνητική εργασία

**Ανατομικές και Φυσιολογικές διαφορές μεταξύ των
φύλλων διαφορετικής ηλικίας της χαρουπιάς
(*Ceratonia siliqua*)**

Αικατερίνη Α. Αχιλλέα

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΦΑΣΣΕΑΣ

Τριμέλης Εξεταστική Επιτροπή

Καθηγητής Κωνσταντίνος Φασσέας (Επιβλέπων)

Καθηγητής Γεώργιος Καραμπουρνιώτης (Μέλος)

Λέκτορας Γεώργιος Λιακόπουλος (Μέλος)

2 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός αυτής της εργασίας είναι η μελέτη των ανατομικών, ιστοχημικών και φυσιολογικών χαρακτηριστικών σε φύλλα χαρουπιάς διαφορετικών ηλικιών. Η χαρουπιά είναι αείφυλλο σκληρόφυλλο δένδρο ή θάμνος, της μεσογειακής χλωρίδας τα οποία έχουν προσαρμοστεί στις συνθήκες του μεσογειακού περιβάλλοντος, ιδιαίτερα όσον αφορά στα άνυδρα καλοκαίρια.

Ως περιοχή δειγματοληψίας και εφαρμογής των μετρήσεων πεδίου χρησιμοποιήθηκε το δενδροκομείο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα δείγματα των πλήρως εκπτυγμένων φύλλων που συλλέχθηκαν, μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας όπου και παρήχθησαν παρασκευάσματα νωπά και μονιμοποιημένα για παρατήρηση με τα διάφορα είδη μικροσκοπίας (Οπτικό Μικροσκόπιο, Μικροσκόπιο Φθορισμού, Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης και Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης).

Για την επί τόπου μέτρηση της φωτοσύνθεσης χρησιμοποιήθηκαν πλήρως εκπτυγμένα φύλλα διαφόρων ηλικιών τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε συνθήκες άπλετου φωτισμού. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν πρωινές ώρες (9:00-11:30).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διάρκεια ζωής των φύλλων φθάνει μέχρι και τα 4 έτη. Από τα φύλλα και των τεσσάρων ηλικιών απουσιάζουν παντελώς λιγνινοποιημένα κύτταρα όπως αυτά συνήθως εμφανίζονται στις επεκτάσεις του δεσμικού κολεού ή υπό μορφή σκληρεγχύματος. Η σκληρότητα των φύλλων φαίνεται να οφείλεται στην πυκνή δομή του μεσόφυλλου και στους ελάχιστους μεσοκυττάρους χώρου τόσο στο πασσαλώδες όσο και στο σπογγώδες παρέγχυμα καθώς επίσης στην ύπαρξη πολλών πηκτινικών ινών μεταξύ των κυττάρων του σπογγώδους παρεγχύματος. Τα αποτελέσματα της ιστοχημείας έδειξαν την ύπαρξη πολυφαινολών, ταννινών αλλά και φλαβονοειδών.

Διαφορές παρατηρήθηκαν στους χλωροπλάστες των νεαρών και των γηραιότερων φύλλων, με τα τελευταία να εμφανίζουν κυστίδια στο εσωτερικό

τους, περιβαλλόμενα από μοναδιαία μεμβράνη. Όσον αφορά στη μέτρηση των φυσιολογικών παραμέτρων, αυτά έδειξαν να συμβαδίζουν με αυτά των μορφολογικών, παρουσιάζοντας τυπικές τιμές των παραμέτρων της φωτοσυνθετικής συσκευής με εξαίρεση αυτών της διαπνευστικής ταχύτητας και της στοματικής αγωγιμότητας.

Τα φύλλα και των τεσσάρων ηλικιών είναι σε μεγάλο βαθμό λειτουργικά και συμβάλλουν στο κέρδος σε άνθρακα του φυτού γεγονός το οποίο είναι συμβατό με τη μεγάλη διάρκεια ζωής των φύλλων του συγκεκριμένου φυτού. Τα αποτελέσματα μας χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

3 SUMMARY

The purpose of this thesis is the study of some anatomical, histochemical and physiological characteristics of the carob tree (*Ceratonia siliqua*) leaves of different ages. Carob tree is an evergreen, sclerophyllous tree or shrub characteristic to the Mediterranean flora which has been adapted to the Mediterranean climate with especially dry summers.

Samples were collected from the Agricultural University of Athens campus. Fully developed leaves were collected and transferred to the Electron Microscopy Laboratory where these were processed for the various microscopy methods (Light microscopy, Fluorescence microscopy, Scanning electron microscopy and Transmission electron microscopy).

Fully expanded leaves of different ages were also used for the *in situ* measurement of photosynthesis. All measurements were recorded in the morning between 09:00 and 11:30pm.

The results showed that the average lifespan of the leaves is 4 years. From leaves of all ages, sclerified cells were absent, like those normally found in the vascular bundles extensions as sclerenchyma. Leaf hardness seems to be due to the compact structure of the mesophyll and the minimal intercellular spaces in the palisade and spongy parenchyma cells as well as the presence of pectin strands between the mesophyll cells. Histochemistry showed the presence of polyphenols, tannins and flavonoids.

The differences between chloroplasts of first year leaves and older leaves showed the presence of vesicles in the chloroplasts surrounded by a unit membrane. The measurements of the physiological parameters show that these are in accordance with the morpho-anatomical characteristics with typical values of photosynthesis with the exception of the transpiration rate and the stomatal conductance.

Leaves of all ages are to a great extent fully functional and contribute to the carbon gain of the plant which seems to contribute to their long leaf lifespan.

The results, however, show that there is need for further research.

Στους Γονείς μου

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Το ενδιαφέρον μου για τον κόσμο των φυτών και η περιέργεια να παρατηρώ αλλά και να μελετώ τη δομή τους, αποτέλεσαν τους λόγους για τους οποίους από την αρχή των σπουδών μου ήθελα να ασχοληθώ με την μικροσκοπία. Ο παιδικός, αρχικά ενθουσιασμός μου να παρατηρώ διάφορες «εικόνες» από το Οπτικό Μικροσκόπιο, κατά τη διάρκεια της πρακτικής μου άσκησης στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, εξελίχθηκε σε αγάπη για την έρευνα. Προς αυτή την κατεύθυνση συνέβαλε ο καθηγητής μου κ. Κωνσταντίνος Φασσέας, ο οποίος με γενναιοδωρία μου μεταλαμπάδευσε τις πολύτιμες γνώσεις και την εμπειρία του για την επιστήμη της μικροσκοπίας.

Η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας δε θα ήταν εφικτή χωρίς τη συμβολή και συμπαράσταση των καθηγητών και των συναδέλφων μου. Ως εκ τούτου θεωρώ υποχρέωσή μου να αναφέρω τους ανθρώπους οι οποίοι συνέβαλαν να πραγματοποιηθεί η παρούσα εργασία. Ειδικότερα:

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον καθηγητή μου κ. Κωνσταντίνο Φασσέα για το πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε, το ενδιαφέρον του, την υπομονή και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος. Πάνω απ' όλα θα ήθελα να τον ευχαριστήσω από καρδιάς για την στήριξη του όλα αυτά τα χρόνια.

Τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου θα ήθελα να δώσω στο Λέκτορα κ. Γεώργιο Λιακόπουλο, μέλος της εξεταστικής επιτροπής και συνεργάτη στην παρούσα εργασία. Η συμμετοχή και πολύτιμη καθοδήγησή του στην εκπόνηση της εργασίας ήταν αναντικατάστατη. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Γεώργιο Καραμπουρνιώτη, μέλος της εξεταστικής επιτροπής.

Ευχαριστώ πολύ τον κ. Γιάννη Ψαροκωστόπουλο, Ε.Τ.Ε.Π. του Εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας για τις παρατηρήσεις του, την υπομονή του και τις πολύτιμες συμβουλές του όλα αυτά τα χρόνια.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τη φίλη μου και συνάδελφο, Υποψήφια Διδάκτορα κα Παναγιώτα Μπρέστα για τη πολύτιμη βοήθειά της στην επεξεργασία των

αποτελεσμάτων της εργασίας μου. Οι συμβουλές της υπήρξαν πολύ σημαντικές.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την αγαπημένη μου φίλη και πολύτιμη συνεργάτη, την Διδάκτορα κα Σμαράγδα Κόλλια, η οποία στάθηκε κοντά μου σε όλα τα στάδια εκπόνησης της εργασίας μου, με παρότρυνε και με συμβούλευε. Η αγάπη της για τη γνώση, με έκανε να προχωρήσω στην πραγματοποίηση αυτής της εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την ενθάρρυνση, την ανοχή και τη συμπαράστασή τους .

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

2	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
3	SUMMARY	5
4	Εισαγωγή.....	12
4.1	Γενικά - Ιστορικά δεδομένα	12
4.2	Τόποι Καλλιέργειας	13
4.3	Χημική Σύσταση- Χρήσεις.....	14
4.4	Συστηματική Ταξινόμηση του φυτού <i>Ceratonia siliqua</i> L.	16
4.5	Χαρακτηριστικά του είδους <i>C. siliqua</i>	17
4.6	Ποικιλίες.....	19
4.7	Εχθροί και ασθένειες.....	22
4.8	Οικονομική και Οικολογική Σημασία	22
4.9	Κλιματολογικές απαιτήσεις	23
4.10	Αείφυλλα Σκληρόφυλλα.....	24
4.11	Μεσογειακά Φυτά και αντιμετώπιση αντίξωων συνθηκών	28
4.12	ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ.....	32
4.12.1	Γενικά.....	32
4.12.2	Φωτεινές Αντιδράσεις.....	33
4.12.3	Σκοτεινές Αντιδράσεις	35
4.13	Σκοπός της Εργασίας	37
5	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	38
5.1	Μορφολογικά - Ανατομικά Χαρακτηριστικά	38
5.1.1	Συλλογή του φυτικού υλικού	38
5.1.2	Προετοιμασία παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (Η.Μ.Δ.) και ημιλεπτών τομών με το Οπτικό (Ο.Μ.)	38
5.1.3	Τμήση τομών και χρώση μονιμοποιημένων παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το Ο.Μ.	40
5.1.4	Τμήση τομών και χρώση μονιμοποιημένων παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το Η.Μ.Δ.	40
5.1.5	Διπλή Χρώση Reynolds	41
5.1.6	Προετοιμασία παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Η.Μ.Σ.).....	42
5.1.7	Παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων στο Η.Μ.Σ	43

5.1.8	Προετοιμασία νωπών παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το Ο.Μ.	43
5.1.9	Μικροσκοπία Φθορισμού.....	44
5.1.10	Αυτοφθορισμός	44
5.2.1	Ιστοχημεία.....	45
5.2.2	Σύσταση Διαλυμάτων.....	48
5.2.3	Μικροσκόπια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τις μορφολογικές ανατομικές και ιστοχημικές παρατηρήσεις.....	50
5.2.4	Φωτογράφιση.....	50
5.3	Μέτρηση Φωτοσύνθεσης, Διαπνοής και Στοματικής Αγωγιμότητας στο CO ₂	51
5.3.1	Μέτρηση Παραμέτρων Φθορισμού Χλωροφύλλης	51
6	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	53
6.1	Μορφολογία - Ανατομία των φύλλων	53
	Πίνακας 1 : Συγκεντρωτικός Πίνακας Αποτελεσμάτων Ιστοχημικών Μεθόδων	58
6.2	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ.....	59
6.2.1	Ανταλλαγή Αερίων.....	59
6.2.2	Φθορισμός χλωροφύλλης.....	60
7	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	87
8	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	94
9	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	97

4 Εισαγωγή

4.1 Γενικά - Ιστορικά δεδομένα

Το όνομα *Ceratonia siliqua* προέρχεται από την αρχαία ελληνική λέξη κέρας και τη λατινική *siliqua*, αναφερόμενο στο κερατόμορφο σχήμα του καρπού. Το όνομα του St. John's bread (στα αγγλικά) ή *Johannisbrothbaum* (στα γερμανικά) δηλαδή το «ψωμί του Αγίου Ιωάννου» προκύπτει από την αναφορά του Ευαγγελιστή Λουκά ότι ο Ιωάννης ο Βαπτιστής το χρησιμοποιούσε ως τροφή μαζί με ακρίδες στην έρημο. Η χαρουπιά ήταν γνωστή κατά την αρχαιότητα στους Έλληνες, οι οποίοι την καλλιεργούσαν για τους καρπούς της. Είναι επιπλέον γνωστή με το όνομα ξυλοκερατιά, ενώ στην Κύπρο ως "τερατσιά" από την αρχαιοελληνική λέξη κεράτιον. Από τη λέξη κεράτιον προέρχεται και η λέξη καράτι, η οποία χρησιμοποιείται έως τις μέρες μας στην κοσμηματοποιία. Κατά την αρχαιότητα βρέθηκε ότι οι σπόροι της χαρουπιάς, ανεξάρτητα από το σχήμα και το μέγεθός τους εμφανίζουν ένα σταθερό βάρος που κυμαίνεται μεταξύ 189 mg και 205 mg, και γι' αυτό το λόγω ορίστηκε ως η πιο μικρή μονάδα μέτρησης για χρυσό και πολύτιμους λίθους (το σημερινό «καρατί» έχει επίσημα καθοριστεί στα 200 mg) (Ελμουτ Μπάουμαν, 1999).

Πολλές είναι οι αναφορές που έχουμε από τους αρχαίους συγγραφείς, σχετικά με το δένδρο της χαρουπιάς. Ο Πλίνιος, συγγραφέας Φυσικής Ιστορίας στο Λατινικό κόσμο, περιγράφει τα γλυκά φασόλια της χαρουπιάς ως τροφή για τα γουρούνια. Επίσης οι Ρωμαίοι έτρωγαν τις φλούδες του χαρουπιού για τη φυσική γλυκύτητά τους όταν ήταν ακόμα πράσινες και φρέσκιες. Από τον Θεόφραστο μαθαίνουμε ότι το δέντρο, οι Ίωνες το αποκαλούσαν κερωνία ενώ ο καρπός ονομαζόταν και αιγυπτιακό σόκο (Ελμουτ Μπάουμαν, 1999). Ο τελευταίος περιέγραψε τη χαρουπιά με μεγάλη ακρίβεια και παρατήρησε πως οι καρποί της βγαίνουν από τον κορμό του δένδρου, κι αυτό γιατί τα λουλούδια φυτρώνουν πάντοτε στις μασχάλες των

φύλλων ή απ' ευθείας από τα παλιά κλαδιά. Η χαρουπιά είχε εισαχθεί στην Ελλάδα στην αρχαιότητα, ίσως όμως να ήταν και ιθαγενές της Κρήτης και της Ρόδου. Το δένδρο ήταν πολύ γνωστό στη Συρία και στην Ιουδαία την εποχή του Χριστού, καθώς αναφέρεται και στην παραβολή του Ασώτου. Υπάρχουν στοιχεία ότι οι αρχαίοι Αιγύπτιοι χρησιμοποιούσαν το χαρούπι στη διατροφή τους αλλά και ως γλυκαντική ουσία για το γλυκό «νεντζέμ». Λοβοί αλλά και σπόροι χαρουπιού έχουν βρεθεί σε Αιγυπτιακούς Τάφους. Αναφέρεται επίσης σε έθιμα διαφόρων θρησκειών όπως στο Ισραήλ όπου έτρωγαν τα χαρούπια κατά τη διάρκεια των εβραϊκών διακοπών του Μπισβάτ ενώ στο μουσουλμανικό κόσμο κατά τη διάρκεια του Ραμαζανιού έπιναν χυμό χαρουπιού. Τέλος χιλιάδες παιδιά επέζησαν κατά τη διάρκεια του Β' Παγκόσμιου Πολέμου καταναλώνοντας ως κύρια τροφή το χαρούπι.

4.2 Τόποι Καλλιέργειας

Η χαρουπιά από την αρχαιότητα καλλιεργείται στις περισσότερες χώρες της Μεσογείου, συνήθως σε περιοχές με ήπιο και ξηρό κλίμα και φτωχό υπέδαφος. Η αξία της αναγνωρίστηκε από τους Έλληνες, οι οποίοι έφεραν την καλλιέργειά της από την γηγενή Μέση Ανατολή (Συρία, Παλαιστίνη) στην Ελλάδα και την Ιταλία καθώς και από τους Άραβες οι οποίοι τη διέδωσαν κατά μήκος των παραλίων της Βόρειας Αφρικής στην Ισπανία και την Πορτογαλία. Τα τελευταία χρόνια η καλλιέργειά της εξαπλώθηκε και σε άλλες εύκρατες περιοχές όπως στην Καλιφόρνια, την Αριζόνα, τη Χιλή, το Μεξικό και την Αργεντινή από τους Ισπανούς, στην Αυστραλία από μετανάστες της Μεσογείου και στην Νότια Αφρική και την Ινδία από τους Άγγλους. Στην Ελλάδα βρίσκεται αυτοφυής σε πολλές νησιώτικες περιοχές και κυρίως στη Κρήτη αλλά καλλιεργείται και σε φυτώρια για τον καλλωπισμό δρόμων και πάρκων. Η χαρουπιά αποτελεί ένα σημαντικό κομμάτι της Μεσογειακής βλάστησης και η καλλιέργειά της σε ασβεστώδη εδάφη θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική οικονομικά αλλά και περιβαλλοντικά.

Παραδοσιακά, εμβολιασμένα δένδρα χαρουπιάς έχουν μεταφυτευτεί με ελαιόδενδρα, αμπέλια, αμυγδαλιές και κριθάρι σε χαμηλής έντασης γεωργικά συστήματα στις περισσότερες παραγωγικές χώρες. Οι καρποί χαρουπιάς χάρη στον πλούσιο διατροφικά σακχαρώδη πολτό τους αποτελούν βασικό συστατικό στη διατροφή των εκτρεφόμενων ζώων, καθώς επίσης και στην ανθρώπινη διατροφή κυρίως κατά τη διάρκεια πολέμων, λιμών και μειωμένης παραγωγής σιτηρών, τότε που η τροφή είναι λιγοστή και δυσεύρετη.

Λόγω των χαμηλών απαιτήσεων σε καλλιεργητικές φροντίδες του οπωρώνα, η χαρουπιιά ενδείκνυται για μερικής απασχόλησης γεωργία και εμφανίζει να έχει δυνατότητες καλλιέργειας σε ημι-άνυδρες μεσογειακές και υποτροπικές περιοχές. Τα δένδρα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καλλωπιστικά, ως ανεμοφράκτες, στον εξωραϊσμό φυσικών τοπίων και σε αναδασώσεις. Η παγκόσμια παραγωγή χαρουπιών εκτιμάται σε περίπου 315.000 τόνους/ έτος προερχόμενη από 200.000 στρέμματα συνολικής καλλιεργήσιμης γης, με πολύ μεταβλητές αποδόσεις εξαρτώμενες από την ποικιλία, την περιοχή και την καλλιεργητική πρακτική. Οι χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή χαρουπιών είναι η Ισπανία (42%), με τη μέση παραγωγή να αγγίζει τους 150.000 τόνους/ έτος και ακολουθούν η Ιταλία, η Πορτογαλία, το Μαρόκο, η Ελλάδα, η Κύπρος, η Τουρκία, η Αλγερία και ορισμένες άλλες χώρες. Η ετήσια ελληνική παραγωγή καρπών χαρουπιάς, για το έτος 2005, ανήλθε στους 14.816 τόνους και προήλθαν από 1.511.620 παραγωγικά δένδρα, με μέση απόδοση 9,8 kg/δένδρο (Ε.Σ.Υ.Ε, 2005*).

* Εθνική Στατιστική Υπηρεσία Ελλάδος

4.3 Χημική Σύσταση- Χρήσεις

Η χαρουπιιά είναι είδος δασικό, γεωργικό, βιομηχανικό και καλλωπιστικό. Η καλλιέργειά της είναι σημαντική για τους καρπούς της, οι οποίοι είναι πλούσιοι σε σάκχαρα και χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφή στην κτηνοτροφία, στην παρασκευή οινοπνευματωδών ποτών αλλά και στην ανθρώπινη διατροφή κυρίως ως γλυκαντική ουσία καθώς και ως υποκατάστατο του

κακάου στη σοκολατοβιομηχανία. Μετά από αλευροποίηση των εμβρύων των σπερμάτων παρασκευάζεται ένα θρεπτικό αλεύρι κατάλληλο για βρεφικούς κοιλόπονους και παιδικές γαστρεντερίτιδες.

Τα χαρούπια είναι γλυκά και θρεπτικά. Γενικά τα χαρούπια έχουν 40-60% περιεκτικότητα σε σάκχαρα, 2-6% σε ολικές αζωτούχες ενώσεις και 0,4-0,6% σε λιπαρές ουσίες. Συγκεκριμένα περιέχουν 27-40% σακχαρόζη, 3-8% φρουκτόζη και 3-5% γλυκόζη. Επιπλέον φαίνεται να περικλείουν μία ασυνήθιστα μεγάλη ποσότητα ταννινών από τις οποίες το 16-20% είναι πολυφαινόλες και συνδέονται με την κυτταρίνη. Τα σπέρματα του χαρουπιού περιέχουν υψηλό ποσοστό πρωτεϊνών, αργινίνη, γλουταμινικό και ασπαρτικό οξύ. Είναι σχετικά πλούσια σε ασβέστιο, ενώ περιέχουν αξιόλογες ποσότητες προβιταμίνης Α και βιταμινών της ομάδας Β και μικρότερες ποσότητες σιδήρου, νατρίου και καλίου. Τέλος αξίζει να επισημανθεί ότι η έντονα χαρακτηριστική τους οσμή οφείλεται στην περιεκτικότητά τους σε ισοβουτυρικό οξύ (1,3%). Ωστόσο η χημική σύσταση ενδέχεται να διαφέρει από την ποικιλία και τις κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν στην κάθε περιοχή (Battle and Tous, 1996).

Τα σπέρματα των χαρουπιών έχουν ποικίλες χρήσεις στη βιομηχανία. Από τα σπέρματα των χαρουπιών εξάγεται μία κολλώδης ουσία (κόμμι) χρήσιμη στη χαρτοβιομηχανία, στην υφαντουργία καθώς και ως πηκτική ουσία στην παρασκευή κάποιων τροφίμων. Το ξύλο της δίνει ξυλάνθρακες αρίστης ποιότητας, το «καρδιόξυλο» της χρησιμοποιείται στην επιλοποιία, την ξυλογλυπτική, την τورνευτική και την βαρελοποιία ενώ ο φλοιός και τα φύλλα της στη βυρσοδεψία και στη βαφική.

Τα φύλλα της χρησιμοποιούνται ακόμη για την παρασκευή ηδύποτων και φαρμάκων κατά του βήχα και της χρόνιας βρογχίτιδας. Τα σπέρματα των χαρουπιών αποτελούν πολύτιμο βιομηχανικό υλικό και από αυτά παρασκευάζεται κυτταρίνη που παλαιότερα χρησιμοποιούνταν για την κατασκευή φωτογραφικών πλακών και άλλων αντικειμένων. Επίσης από τα άγουρα χαρούπια παρασκευάζονται βαφικές και κολλητικές ουσίες κατάλληλες για τη βυρσοδεψία, τη βαφική και τη στίλβωση διαφόρων

ουσιών. Αξίζει να σημειωθεί ότι μετά από έκθλιψη του καρπού λαμβάνεται έλαιο το οποίο χρησιμοποιείται στη σαπωνοποιία, αλλά και στη βιομηχανία καλλυντικών.



Εικόνα 1: Σχέδιο των φύλλων, του άνθους και του καρπού της χαρουπιάς (Πηγή http://en.wikipedia.org/wiki/Ceratonia_siliqua)

4.4 Συστηματική Ταξινόμηση του φυτού *Ceratonia siliqua* L.

- Βασίλειο** : Plantae
Φύλο : Angiospermae
Κλάση : Magnoliophyta
Τάξη : Fabales
Οικογένεια : Fabaceae ή Leguminosae
Γένος : *Ceratonia*
Είδος : *C. siliqua*

Η οικογένεια Fabaceae περιλαμβάνει φυτά που εξαπλώνονται κυρίως στις τροπικές χώρες και ποώδη φυτά που εξαπλώνονται κυρίως στις

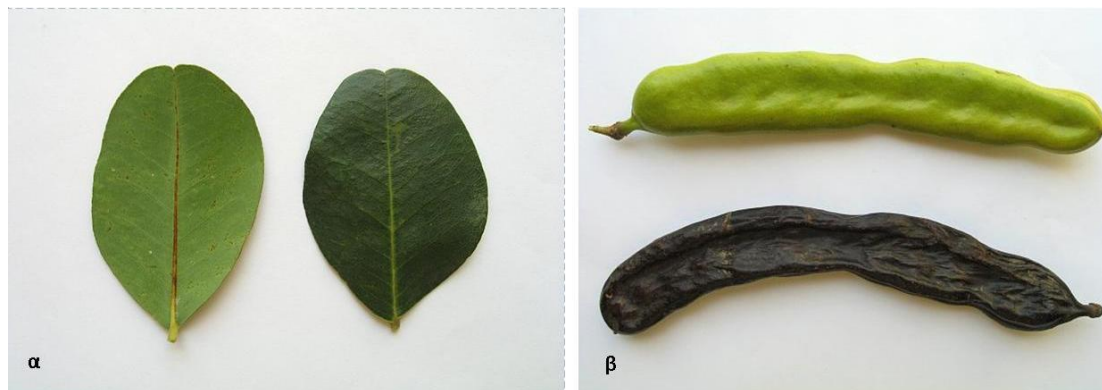
υποτροπικές. Τα είδη της οικογένειας Fabaceae ταξινομούνται σε τρεις υποοικογένειες, σύμφωνα με τους Cronquist (1981), Elias (1974) και Robertson και Lee (1976): Caesalpinioideae, Mimosoideae και την Faboideae. Στην υποοικογένεια Caesalpinioideae στην οποία ανήκει και η χαρουπιά, περιλαμβάνονται ξυλώδη φυτά, θάμνοι ή σπανίως ποώδη φυτά, με φύλλα απλά ή σύνθετα, εναλλασσόμενα, αρτιόληκτα ή περιτόληκτα (Σαρλής, 1999). Τα άνθη τους είναι διγενή, ζυγόμορφα, με διπλό πενταμελές ή ελλειμματικό περιάνθιο. Αποτελούνται από δέκα στήμονες, ελεύθερους, σπάνια πολυάριθμοι ή ένας. Συχνά απαντούν και στημονώδη (στείοι στήμονες). Περιλαμβάνει περίπου 150 γένη και 2.200 είδη των τροπικών και υποτροπικών περιοχών. Στην Ελλάδα αντιπροσωπεύεται από τα γένη *Cercis* και *Ceratonia*. Ταξινομικά το γένος *Ceratonia* είναι εντελώς απομονωμένο από τα άλλα γένη της οικογένειας.

4.5 Χαρακτηριστικά του είδους *C. siliqua*

Η χαρουπιά είναι δένδρο αείφυλλο, μακρόβιο, πολύγαμο μόνικο ή διοικο, ιθαγενές των περιοχών της ανατολικής Μεσογείου. Φύεται στις όχθες των ποταμών και σε παράκτιες περιοχές (<http://en.wikipedia.org>). Η ξυλοκερατιά είναι διπλοειδής ($2n = 24$) και το ύψος της κυμαίνεται στα 8 με 12 m, μπορεί όμως σε σπανιότερες περιπτώσεις να φτάσει τα 30 m και το πλάτος της τα 7 με 10 m. Έχει πυκνό φύλλωμα, αποτελούμενο από σύνθετα πτερωτά, ωοειδή φύλλα με 2-5 ζεύγη φυλλαρίων, δερματώδη βαθυπράσινα και γυαλιστερά από πάνω, ωχροπράσινα από κάτω (Εικόνα 2.α). Οι ετήσιοι βλαστοί της είναι ανοιχτού πράσινου χρώματος, ενώ οι πολυετείς πρασινοκάστανου. Ο φλοιός της είναι καστανόφαιος, λεπτός και η κόμη του πυκνή συνήθως σφαιρική. Τα άνθη είναι μικρά, με δυσάρεστη οσμή, χωρίς πέταλα, σε μασχαλιαίους ή πλευρικούς κοκκινωπούς βότρυες δίκλινα συνήθως, με κάλυκα μικρό πρασινωπό πεντάλοβο, πέντε στήμονες, μακριούς στα αρσενικά άνθη, κοντούς και κατά κανόνα άγονους στα θηλυκά ή

ερμαφρόδιτα. Ο καρπός της χαρουπιάς, το χαρούπι ή ξυλοκέρατο, είναι λοβός (χέδρωπας), μήκους 10-30 cm και πλάτους 2-3 cm με εξωκάρπιο καστανόχρωμο και δερματώδες και μεσοκάρπιο σαρκώδες και χυμώδες, μέσα στο οποίο περικλείονται 8-16 σπέρματα ωοειδή, πεπλατυσμένα, κεραμόχρωμα, γυαλιστερά και σκληρά (Εικόνα 1, 2.β).

Η χαρουπιά ως δένδρο βραδείας ανάπτυξης, μπαίνει όψιμα σε πλήρης καρποφορία, περίπου από τον 8^ο έως τον 10^ο χρόνο της ηλικίας της, ενώ η παραγωγική της ζωή υπολογίζεται σε 80 έως 100 χρόνια (Ποντίκης, 1996). Αναφορικά η απόδοση ενός παραγωγικού δένδρου 6 ετών μπορεί να φτάσει τα 2,25 kg, ενώ στα 12 έτη μπορεί να αγγίξει τα 45 kg ή και περισσότερο. Η ξυλοκερατιά είναι το μόνο μεσογειακό δένδρο το οποίο ανθίζει το φθινόπωρο (τέλη Αυγούστου μέχρι Νοέμβριο), όπως και πολλά από τα τροπικά φυτά. Ωστόσο ο χρόνος και η διάρκεια της περιόδου ανθοφορίας εξαρτάται από τις τοπικές κλιματικές συνθήκες, όπως στα περισσότερα καρποφόρα δένδρα (<http://www.worldagroforestry.org>). Σε πολύ θερμές περιοχές έχουν παρατηρηθεί δένδρα χαρουπιάς σε πλήρη άνθιση κατά τους θερινούς μήνες (Ιούνιο- Ιούλιο) σύμφωνα με τους Leshem και Ophir (1977). Η παρατεταμένη περίοδος άνθησης, αντισταθμίζει τις ασταθείς καιρικές συνθήκες που ενδεχομένως να επικρατούσαν εκείνο το έτος και εξασφαλίζει ότι τουλάχιστον ορισμένα άνθη θα γονιμοποιηθούν. Οι καρποί της ωριμάζουν από τα τέλη Αυγούστου του επόμενου από της ανθήσεως χρόνου. Καρποφορεί από απλούς ανθοφόρους οφθαλμούς σε ξύλο ηλικίας 2 έως 15 χρόνων. Η μεταφορά της γύρης από τους στήμονες στα θηλυκά άνθη πραγματοποιείται από τα έντομα, κυρίως τις μέλισσες, τις μύγες, τις σφήκες και νυκτόβιες πεταλούδες (moths), αλλά και από τον άνεμο. Το μάζεμα των καρπών επιβάλλεται να γίνεται πριν τις χειμερινές βροχές. Τα χαρούπια αποσπώνται μόνα τους από τα δένδρα ή μετά από ραβδισμό και αφού συγκεντρωθούν και ξηρανθούν σε ειδικούς κλιβάνους ή σε υπόστεγα, αποθηκεύονται σε κατάλληλους χώρους. Το δένδρο παρουσιάζει τάση για παρεννιαυτοφορία (Battle and Tous , 1997).



Εικόνα 2: α. Η αποαξονική και η προσαξονική επιφάνεια των φύλλων της χαρουπιάς, β. Οι καρποί της χαρουπιάς.

4.6 Ποικιλίες

Οι δημοφιλέστερες ποικιλίες χαρουπιών ανά τον κόσμο σύμφωνα με τον Ποντική (1996) είναι οι εξής :

ελληνικές: Αγρία, Κρητικά (Κονδυλάτα, Μπαντούρια, Ξανθά), Κύπρου (Βακλωτά, Κουμπωτά, Κούντουρα), Χιώτικα, Σαμιώτικα.

ισπανικές: Matalafan, Matalafera, Roya, Casuda, Costelates.

ιταλικές: Cipriana, Saccarata, Racemosa.

Ποικιλίες Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής: Santa Feu, Bolsor, Conejo, Excelsior, Gabriel, Grantham, Molino, Sykea, Tyllivia, White, Amele, Sfax, Clifford, Tantillo.

Οι σημαντικότερες ισπανικές ποικιλίες χαρουπιάς και η εκτιμώμενη παραγωγή τους κατά τους *Tous et al.* (1996) παραθέτονται στον Πίνακα 1 ενώ οι τελευταίοι αναφέρουν ως κύριες καλλιεργήσιμες ποικιλίες ανά τον κόσμο τις εξής :

Ιταλία: Gibiliana, Racemosa, Saccarata Amele di Bari

Πορτογαλία: Mulata, Galhosa, Canela, AIDA

Μαρόκο: Αυτοφυή Άγρια δένδρα

Ελλάδα: Hemere, Tylliria

Κύπρος: Tylliria

Τουρκία: Αγρίου Τύπου και Sisam δένδρα

Τυνησία: Sfax

Ισραήλ: Tylliria, Sandalawi, Habati, Aaronsohn nos.

Η.Π.Α: Santa Fe, Clifford, Bolser, Grantham

Αυστραλία: Bath, Irlam, Maitllan KP-1, Princess, Marshall no. 1

Πηγή : Tous *et al.* 1996

Ποικιλίες	Εκτιμώμενη Παραγωγή (Τόνοι)	Εκτιμώμενη Παραγωγή (%)
Negra	24.726	18.31
Matalafera	13.110	9.70
Duraio	9.062	6.71
Rojal	5.820	4.31
Bugadera	4.600	3.40
Costella d'Ase	3.750	2.80
Mollar	3.200	2.40
Lindar	2.072	1.53
Melera	2.053	1.50
Sayalonga	1.650	1.20
Comuna	1.647	1.20
Boval	1.250	0.92
Del Pom	0.988	0.73
Banyeta	0.710	0.52
Borrera	0.693	0.51
Cacha	0.490	0.40
Banya de Cabra	0.400	0.30
Casuda	0.354	0.26
Άλλες Ποικιλίες	58.425	43.30
Συνολικά	135.000	100.0

Πίνακας 1: Οι σημαντικότερες ισπανικές ποικιλίες χαρουπιάς και η εκτιμώμενη παραγωγή τους κατά τους Tous *et al.*, 1996.

4.7 Εχθροί και ασθένειες

Η καλλιέργεια της χαρουπιάς φαίνεται να παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. Συγκεκριμένα μεγάλες εκτάσεις καλλιεργήσιμες με *C. siliqua*, στις οποίες δεν παρέχονται καλλιεργητικές περιποιήσεις εμφανίζονται υγιείς και απαλλαγμένες από παθογόνα έντομα ή μικροοργανισμούς. Αυτός φαίνεται να είναι και ο πιο σημαντικός λόγος για τον οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στις αναδασώσεις, αλλά και ως καλλωπιστικό σε πάρκα και στην άκρη δρόμων. Ωστόσο τη βιβλιογραφία προκρίπτει ότι ο σημαντικότερος εχθρός της καλλιέργειας είναι το *Myelois ceratoniae* Zell, (Lepidoptera Pyralidae) το οποίο θεωρείται και η μεγαλύτερη μαστίγα. Κάποια άλλα από τα έντομα που μπορούν να προκαλέσουν ζημιές στην καλλιέργεια της χαρουπιάς είναι έντομα της οικογένειας Cicadellidae, όπως τα τζιτζίκια, ο αλευρώδης (*Dialeurodes citri*) και το λεκάνιο (*Lecanius elongatus*).

4.8 Οικονομική και Οικολογική Σημασία

Η χαρουπιά θεωρείται φυτό ανθεκτικό στη ξηρασία και στην αλατότητα, παρουσιάζει καλή προσαρμογή σε άγονα εδάφη και έχει μικρές απαιτήσεις σε καλλιεργητικές φροντίδες (Battle and Tous, 1997). Επομένως, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε προγράμματα αναδασώσεων, ιδιαίτερα σε περιοχές που χαρακτηρίζονται από φαινόμενα ερημοποίησης, ενώ η καλλιέργειά της σε εδάφη ξηρά, πετρώδη και ασβεστολιθικά πραγματοποιείται με επιτυχία, καθιστώντας δυνατή την οικονομική τους εκμετάλλευση. Επίσης αποτελεί σημαντικό μελισσοκομικό φυτό, καθώς κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου που λαμβάνει χώρα η ανθοφορία, παράγεται νέκταρ και γύρη υψηλής θρεπτικής αξίας τα οποία αποτελούν την πρώτη ύλη για την παραγωγή μελιού. Μη επιστημονικά τεκμηριωμένες αγροτικές δοκιμές, φέρνουν στο προσκήνιο την χρήση της χαρουπιάς ως φυσικό

παρεμποδιστή έναντι φυτοφάγων εντόμων και παθογόνων μικροοργανισμών σε γειτονικές καλλιέργειες. Συγκεκριμένα στην περίπτωση συγκαλλιέργειας ελιάς με χαρουπιά αναφέρεται ότι ευνοείται ο πολλαπλασιασμός παρασίτων του δάκου της ελιάς (*Bactrocera oleae*) και μεγάλου αριθμού ωφέλιμων υμενόπτερων εντόμων (*Eulophidae*, *Eupelmidae*, *Eurytomidae*, *Pteromalidae*, *Torymidae*), τα οποία δρουν προστατευτικά στην καλλιέργεια της ελιάς. Επιπλέον υπάρχουν αναφορές ότι το *Eupelmus urozonus* δρα προστατευτικά όχι μόνο ως προς το δάκο της ελιάς αλλά και ως προς την κηκιδόμυγα (*Dasynевра oleae* Loew) και τη μύγα της Μεσογείου (*Ceratitis capitata*). Τα παραπάνω μπορούν να θεωρηθούν πιθανές ενδείξεις βιολογικής φυτοπροστασίας, χωρίς όμως να είμαστε 100% σίγουροι για την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων εφαρμογής της αντίστοιχης τεχνικής. Η μοναδική επιστημονική αναφορά που σχετίζεται με τις προαναφερθείσες παρατηρήσεις είναι του Αναγνωστόπουλου (1935) ο οποίος παρατήρησε την απουσία προσβολών από δάκο σε ελαιώνα και την απέδωσε στο μεγάλο αριθμό χαρουπιών, χωρίς όμως να εξηγεί το γιατί. Περαιτέρω έρευνα της συγκεκριμένης εφαρμογής θα μπορούσε να δημιουργήσει ένα νέο τρόπο “βιολογικής καταπολέμησης” των καλλιεργειών ευνοώντας παράλληλα μέσω της συγκαλλιέργειας την βιολογική- οικολογική ισορροπία και τη μείωση στη χρήση εντομοκτόνων και αγροχημικών.

4.9 Κλιματολογικές απαιτήσεις

Η *C. siliqua* είναι δένδρο των θερμών και ξηρών κλιμάτων, όπως προδίδει και η ανατολική του προέλευση αλλά και εγκατάσταση σε μεσογειακά οικοσυστήματα. Ευδοκμεί σε παραθαλάσσιες περιοχές και στην Ελλάδα συναντάται στην Κρήτη, στα νησιά και στα νότια Ηπειρωτικά. Καλλιεργείται μέχρι τα 600 m υψόμετρο και θεωρείται ανθεκτική στους παγετούς καθώς οι καρποί της ζημιώνονται στους -4 °C

έως -5 °C. Επιθυμητός προσανατολισμός φύτευσης θα πρέπει να επιλέγεται αυτός με ανατολική ή μεσημβρινή τοποθεσία. Όσον αφορά στην καταλληλότητα του εδάφους καλλιέργειας, η χαρουπιά έχει περιορισμένες εδαφικές απαιτήσεις και συγκεκριμένα ευδοκίμει σε διάφορα είδη εδαφών, εκτός από τα πολύ αργιλώδη ή υγρά εδάφη. Η καλλιέργειά της είναι δυνατή ακόμα και σε βραχώδη και επικλινή εδάφη, με την μόνη προϋπόθεση να είναι ελαφρά γόνιμα και να διαπερνώνται από το ριζικό της σύστημα (Ποντικής, 1996).

4.10 Αείφυλλα Σκληρόφυλλα

Η σκληροφυλλία ως μέθοδος προστασίας των φυτών από τις αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες και τα φυτοφάγα ζώα έχει γίνει αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητών. Οι αείφυλλοι σκληρόφυλλοι θάμνοι ή δένδρα (μακκία βλάστηση- maquis), θεωρείται ο αντιπροσωπευτικότερος τύπος μεσογειακής βλάστησης στη χώρα μας και καλύπτει μεγάλες εκτάσεις στα παράλια της κεντρικής και κυρίως της Νοτίου Ελλάδος. Στην Ελλάδα η διάπλαση αυτή φέρει την ονομασία αείφυλλα πλατύφυλλα ή αείφυλλα σκληρόφυλλα και κατέχει το 20% περίπου της δασικής βλάστησης σχηματίζοντας χαρακτηριστική ζώνη βλάστησης που ανέρχεται μέχρι τα 700 m υψόμετρο. Η ζώνη αυτή διακρίνεται σε δύο υποζώνες, μία κατώτερη (θερμότερη και ξηρότερη) με χαρακτηριστικά είδη τη χαρουπιά, το σχοίνο και την αγριελιά και μία ανώτερη (ψυχρότερη και υγρότερη) με χαρακτηριστικά είδη την αριά, το ρείκι και το φυλλίκι (Πάπυρος Larousse, 2007). Τα αείφυλλα είδη διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την ανατομία των φύλλων και αυτή η διαφοροποίηση οφείλεται στις κλιματολογικές συνθήκες του ενδιαίτηματος. Κάποια από αυτά έχουν μεγάλα δερματώδη φύλλα (*Viburnum tinus*), άλλα εμφανίζονται με λειποειδή (*Cupressus sempervirens*) ή βελονοειδή φύλλα (*Pinus nigra*) και άλλα με επιμήκη ή ωοειδή φύλλα και κυματώδεις παρυφές (*Quercus coccifera*). Χαρακτηριστικό όλων των ειδών αποτελεί το

κηρώδες επίστρωμα στην προσαξονική κυρίως επιφάνεια των φύλλων, το οποίο υποδηλώνει την προσαρμοστικότητά τους στην ξηρασία. Τα περισσότερα αείφυλλα σκληρόφυλλα είδη διαθέτουν μηχανισμούς με τους οποίους εξασφαλίζουν ένα ελάχιστο δυναμικό νερού για τα κύτταρα και τους ιστούς τους και ταυτόχρονα περιορίζουν τις απώλειες νερού στο ελάχιστο δυνατό. Η ανατομική οργάνωση των φύλλων τους παρουσιάζει ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά, τα οποία περιγράφονται ακολούθως: Τα φύλλα τους είναι συνήθως μικρών διαστάσεων, σκληρά, συμπαγή και με μεγάλο πάχος, εξυπηρετώντας με αυτό τον τρόπο τον περιορισμό των διαπνευστικών απωλειών. Τα χαρακτηριστικά αυτά αντανακλώνται σε δύο παραμέτρους: Διαθέτουν σημαντικά χαμηλότερο λόγο επιφάνειας προς όγκο και υψηλότερη ειδική μάζα φύλλου (leaf mass per area, LMA ή leaf specific mass, LSM) έναντι φύλλων ποωδών φυτών. Τα κύτταρα του μεσοφύλλου είναι μικρών διαστάσεων, με περιορισμένους μεσοκυττάριους χώρους, ενώ το πασσαλώδες παρέγχυμα οργάνωνεται σε περισσότερες από μία στρώσεις. Η συμπαγής κατασκευή και το μεγάλο πάχος τους, δημιουργούν προβλήματα στον φωτισμό των εσωτερικών στρώσεων των φωτοσυνθετικών κυττάρων του μεσοφύλλου. Η φωτοπενία των εσωτερικών στρώσεων αντιμετωπίζεται επιτυχώς με τη μεταφορά φωτισμού από κατάλληλα διατεταγμένους σκληρεγχευματικούς ιστούς. Οι σκληρεΐδες (όπως π.χ. στην περίπτωση των φύλλων της ελιάς) παίζουν το ρόλο οπτικών ινών (Karabourniotis *et al.*, 1993), ενώ οι προεκτάσεις των σκληρεγχευματικών κολεών στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες του πουρναριού, της κουμαριάς κ.ά. παίζουν το ρόλο των διαφανών παραθύρων τα οποία μεταφέρουν φωτισμό στις κατώτερες στρώσεις των φωτοσυνθετικών κυττάρων. Με τον τρόπο αυτόν επιτυγχάνεται αύξηση του πάχους του φύλλου χωρίς σημαντικό περιορισμό στην φωτοσυνθετική ικανότητα ανά μονάδα όγκου του φωτοσυνθετικού παρεγχύματος. Το τελικό όφελος είναι ότι ο μειωμένος λόγος της εξωτερικής επιφάνειας ως προς τον όγκο του οργάνου οδηγεί σε περιορισμό των διαπνευστικών απωλειών (Karabourniotis and Liakopoulos, 2009). Οι προστατευτικοί ιστοί (εφυμενίδα, επιδερμίδα, σκληρέγχυμα) είναι ιδιαίτερα ανεπτυγμένοι. Η έντονη παρουσία

σκληρεγχοματικών ιστών (εκτός από τον οπτικό τους ρόλο) φαίνεται ότι συνδέεται με την εξοικονόμηση και αποθήκευση νερού και την προστασία από τη μηχανική κατάρρευση του ελάσματος σε συνθήκες αφυδάτωσης. Οι ιστοί αυτοί θωρακίζουν επίσης τα φύλλα από τα φυτοφάγα ζώα, ενώ η δημιουργία τους οδηγεί ένα μεγάλο ποσοστό των φωτοσυνθετικών προϊόντων προς τη σύνθεση δομικών πολυσακχαριτών ή άλλων ενώσεων το μόριο των οποίων αποτελείται αποκλειστικά από άνθρακα. Παράλληλα λόγω της χαμηλής τους περιεκτικότητας σε άζωτο αυτοί οι ιστοί δεν είναι ελκυστικοί για τα φυτοφάγα. Η επιδερμίδα και τα επιδερμικά εξαρτήματα στα περισσότερα αείφυλλα σκληρόφυλλα είναι ιδιαίτερα ανεπτυγμένοι ιστοί. Τα επιδερμικά εξαρτήματα (αδενώδεις και μη αδενώδεις τρίχες) εμφανίζουν υψηλή πυκνότητα κυρίως κατά τα αρχικά, ευαίσθητα στάδια ανάπτυξης των οργάνων. Το πυκνό τρίχωμα που καλύπτει τα φύλλα της ελιάς, της αριάς και άλλων αείφυλλων σκληρόφυλλων προστατεύει τα φωτοσυνθετικά κύτταρα από τις υψηλές εντάσεις φωτεινής και υπεριώδους ακτινοβολίας και αυξάνει την ανακλαστικότητα της επιφάνειας που καλύπτει βελτιώνοντας το θερμικό της ισοζύγιο. Επιπλέον τα επιδερμικά εξαρτήματα (και κυρίως οι αδενώδεις τρίχες) συσσωρεύουν δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι προστατεύουν τα όργανα έναντι παθογόνων και φυτοφάγων εχθρών. Τα στόματα εμφανίζονται μόνο στην αποαξονική επιφάνεια και είναι πολλά αλλά μικρού μεγέθους. Σε ορισμένες περιπτώσεις τοποθετούνται σε κρύπτες ή καλύπτονται από πυκνό στρώμα τριχών, ενώ το κλείσιμό τους γίνεται κατά τις θερμές ώρες της ημέρας (μεσημβρινό κλείσιμο των στομάτων). Τέλος, το ριζικό σύστημα στα αείφυλλα σκληρόφυλλα εμφανίζεται αρκετά ανεπτυγμένο, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η αποτελεσματική άντληση νερού από το έδαφος. Η στρατηγική αντιμετώπισης της έλλειψης νερού των αείφυλλων σκληρόφυλλων στηρίζεται στον αυστηρό έλεγχο της διαπνοής μέσω των κινήσεων των στομάτων και των απωλειών νερού μέσω της εφυμενίδας αλλά και στην επαρκή τροφοδοσία με νερό από το έδαφος (Karabourniotis and Liakopoulos, 2009). Ωστόσο ο έλεγχος των διαπνευστικών απωλειών αναπόφευκτα οδηγεί σε ελάττωση της φωτοσυνθετικής ταχύτητας και παράλληλα επιδεινώνει το

θερμικό ισοζύγιο του ελάσματος, επειδή το φύλλο δεν ψύχεται επαρκώς μέσω της διαπνοής. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται με την ύπαρξη επιφανειών με υψηλή ανακλαστικότητα (π.χ. με την κάλυψή τους από στιλπνό στρώμα επιφυμενιδικών κηρών ή και τριχώματος), με την κατασκευή φύλλων μικρότερου μεγέθους, αλλά και με αύξηση της γωνίας των φύλλων ως προς την οριζόντιο, ώστε οι ηλιακές ακτίνες να μη προσπίπτουν κάθετα στο έλασμα. Το κρίσιμο σημείο αφορά στην ικανότητα αναπλήρωσης του χαμένου νερού και ανάκαμψης μετά από ένα επεισόδιο ξηρασίας. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι τα ανατομικά χαρακτηριστικά των φύλλων των αείφυλλων σκληρόφυλλων φυτικών ειδών, παρόλο που απαιτούν υψηλό κόστος κατασκευής, φαίνεται ότι είναι απολύτως απαραίτητα για την προσαρμογή στις συνθήκες του μεσογειακού περιβάλλοντος και επιτρέπουν την παρατεταμένη διάρκεια ζωής τους, η οποία φθάνει κατά μέσο χρόνο τα δύο χρόνια. Επιπλέον επειδή η αναπλήρωση των φύλλων τους είναι δύσκολη λόγω του υψηλού κόστους κατασκευής, των φτωχών εδαφών και των αντίξοων επικρατούσων συνθηκών, δαπανούνται πολύτιμα φωτοσυνθετικά προϊόντα για την αμυντική τους θωράκιση. Αυτός είναι και ένας από τους λόγους για τους οποίους τα αείφυλλα δένδρα επικρατούν των φυλλοβόλων στα μεσογειακά οικοσυστήματα. Οι κυριότεροι εκπρόσωποι των αείφυλλων σκληρόφυλλων είναι: *Arbutus andrachne* (γλυστροκουμαριά) *A. unedo* (κουμαριά), ***Ceratonia siliqua* (χαρουπιά)**, *Laurus nobilis* (δάφνη), *Myrtus communis* (μυρτιά), *Nerium oleander* (πικροδάφνη), *Olea europaea* (ελιά), *Phillyrea latifolia* (φυλλίκι), *Pistacia lentiscus* (σχίνος), *Quercus coccifera* (πουρνάρι), *Q. Ilex* (αρία). Ο μηχανισμός μέσω του οποίου τα περισσότερα από αυτά τα φυτά καταφέρνουν να ανταπεξέλθουν στις αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες είναι η στρατηγική της αποφυγής.

4.11 Μεσογειακά Φυτά και αντιμετώπιση αντίξωων συνθηκών

Με τον όρο μεσογειακό κλίμα νοούνται οι κλιματολογικές εκείνες συνθήκες που επικρατούν στις περιοχές των ακτών της Μεσογείου καθώς και άλλων περιοχών που εξομοιώνουν τις συνθήκες αυτού του τύπου κλίματος, όπως η Καλιφόρνια, περιοχές του Μεξικού, της Αυστραλίας, της Νότιας Αφρικής, της Χιλής και της Αργεντινής. Το μεσογειακό κλίμα χαρακτηρίζεται σε γενικές γραμμές από σύντομους αλλά κρύους χειμώνες με έντονες βροχοπτώσεις και ανέμους και από ζεστά, ξηρά καλοκαίρια με σχετική νηνεμία και παρουσία πυρκαγιών.

Σε όλα τα μεσογειακού τύπου οικοσυστήματα η μακροχρόνια επίδραση παρόμοιων κλιματικών παραγόντων πάνω στους φυτικούς οργανισμούς έχει διαμορφώσει φυσιολογικά όμοιους τύπους βλάστησης, με μία διαδικασία που ονομάζεται συγκλίνουσα εξέλιξη. Η συγκλίνουσα εξέλιξη ή αλλιώς σύγκλιση είναι μια μορφή εξέλιξης κατά την οποία οργανισμοί οι οποίοι ζουν σε εξαιρετικά απομακρυσμένες μεταξύ τους περιοχές και ανήκουν σε τελείως διαφορετικές ταξινομικές ομάδες, τείνουν να μοιάζουν σημαντικά.

Η Ελλάδα ανήκει στο μεσογειακό τύπο κλίματος και παρουσιάζει ποικίλες διαφοροποιήσεις στις κλιματολογικές συνθήκες από περιοχή σε περιοχή, οι οποίες οφείλονται στη συνδυασμένη δράση που ασκούν στον ελληνικό χώρο φυσικογεωγραφικοί και δυναμικοί παράγοντες (Χρονοπούλου *et. al.*, 1996). Το κύριο χαρακτηριστικό των περιοχών με μεσογειακό κλίμα είναι το ελάχιστο των βροχοπτώσεων σε συνδυασμό με το μέγιστο των θερμοκρασιών που παρατηρείται κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Αυτή η καλοκαιρινή ξηρασία θεωρείται ο κυριότερος περιοριστικός παράγοντας για την παρουσία, εξάπλωση και ανάπτυξη της φυτικής βλάστησης και των καλλιεργειών. Επιπροσθέτως σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών, διαδραματίζει η βροχομετρική ετήσια και μηνιαία μεταβλητότητα από έτος σε έτος. Οι βροχές πέφτουν κυρίως το χειμώνα και είναι συχνά έντονες καταιγίδες, γεγονός που μειώνει την αποτελεσματικότητά τους για τη βλάστηση (Φλοκάς, 2007). Στα πλαίσια του συγκεκριμένου κλιματολογικού

υπόβαθρου τα φυτά καλούνται να προσαρμοστούν στις συνθήκες παρατεταμένης ξηρασίας, για να επιβιώσουν.

Τα φυτά διαθέτουν τρεις κυρίως στρατηγικές στην αντιμετώπιση της υδατικής καταπόνησης και αυτές είναι η στρατηγική της διαφυγής, της ανθεκτικότητας και της αποφυγής (Karabourniotis, 2003). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν ετήσια είδη φυτών τα οποία ολοκληρώνουν τον βιολογικό τους κύκλο μέσα στα στενά όρια της ευνοϊκής περιόδου με επάρκεια νερού. Στη διάρκεια της δυσμενούς περιόδου είτε απαντούν σε ληθαργικές μορφές (σπέρματα), είτε διατηρούν ζωντανό και λειτουργικό μόνο το υπόγειο τμήμα τους (γεώφυτα), ενώ σε κάποιες άλλες περιπτώσεις αποβάλλουν τα φύλλα τους για την επιβίωση τους (θάμνοι). Τα φυτά της δεύτερης κατηγορίας, διαθέτουν την ικανότητα να διατηρούν στοιχειώδη μεταβολική δραστηριότητα ακόμη και αν το δυναμικό νερού του κυτοπλάσματος πέσει σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Αυτό επιτυγχάνεται με την οσμωτική εξισορρόπηση, η οποία ρυθμίζει το οσμωτικό δυναμικό των ιστών σε χαμηλότερα επίπεδα μέσω της συσσώρευσης οσμωτικά ενεργών μεταβολιτών. Η οσμωτική εξισορρόπηση έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία χαμηλότερου δυναμικού στους ιστούς, έτσι ώστε να διευκολύνεται η πρόσληψη νερού και να διατηρείται ανεκτή πίεση σπαργής. (Karabourniotis, 2003). Τα φυτά της τελευταίας κατηγορίας έχουν το χαρακτηριστικό να διατηρούν το δυναμικό νερού των κυττάρων τους σε σχετικά υψηλά επίπεδα και επομένως δεν αντιλαμβάνονται την εμπειρία της αφυδάτωσης. Σ' αυτή τη στρατηγική απαντώνται δύο κύριες παραλλαγές, η αποφυγή με οικονομία νερού (φυτά CAM) και η αποφυγή με κατανάλωση νερού. Στην πρώτη περίπτωση τα φυτά μέσω μία σειρά μορφολογικών και φυσιολογικών χαρακτηριστικών περιορίζουν τις διαπνευστικές απώλειες διατηρώντας ταυτόχρονα την ικανότητα αφομοίωσης του CO₂ από την ατμόσφαιρα. Ορισμένα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά συμβάλλουν στην επιτυχία της στρατηγικής αυτής :

- Κλείσιμο των στομάτων στη διάρκεια της περιόδου η οποία εννοεί σημαντικές απώλειες νερού.
- Ύπαρξη μορφολογικών χαρακτήρων οι οποίοι παρεμβάλουν ισχυρή αντίσταση στις απώλειες νερού.
- Αποθήκευση του νερού σε κατάλληλους ιστούς.
- Περιορισμός στο ελάχιστο των επιφανειών που έρχονται σε επαφή με την ατμόσφαιρα.
- Ύπαρξη βλαστών οι οποίοι συνεισφέρουν σημαντικά στη φωτοσυνθετική δραστηριότητα του οργανισμού.
- Περιορισμένος αριθμός στομάτων ανά μονάδα επιφάνειας.
- Ιδιόμορφη μεταβολική δραστηριότητα, άνοιγμα στομάτων κατά τη διάρκεια της νύκτας (φυτά τύπου CAM).

Σε αντιδιαστολή τα φυτά της δεύτερης κατηγορίας δίνουν προτεραιότητα στην εξεύρεση και αποτελεσματική άντληση του νερού του περιβάλλοντος, αδιαφορώντας για την εξοικονόμηση νερού. Η αποτελεσματικότητα της στρατηγικής αυτής συνδέεται με τα εξής χαρακτηριστικά :

- Δυνατότητα επίτευξης χαμηλών δυναμικού νερού στη ρίζα, με στόχο την ταχεία άντληση νερού από το έδαφος.
- Μεταβολή του λόγου υπέργειο/υπόγειο τμήμα του φυτού, με προτεραιότητα στην ανάπτυξη εκτεταμένου ριζικού συστήματος, το οποίο θα εισχωρεί προς βαθύτερα και συνεπώς υγρότερα εδαφικά στρώματα.
- Αύξηση της αγωγιμότητας στη μεταφορά νερού.
- Δυνατότητα άντλησης νερού από ορισμένα υπέργεια όργανα (φύλλα, βλαστούς, εναέριες ρίζες επιφύτων).

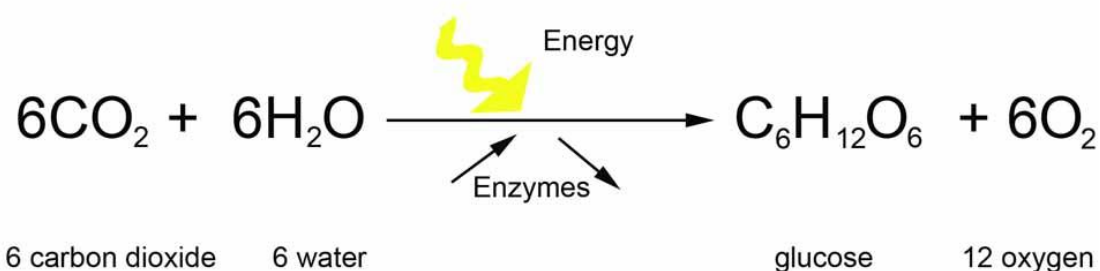
Οι σχετικά ήπιες κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν στα μεσογειακά οικοσυστήματα εννοούν την ανάπτυξη και εξάπλωση των αειφύλλων σκληρόφυλλων ειδών έναντι άλλων ομάδων φυτών (όπως π. χ τα φυλλοβόλα). Αυτό συμβαίνει καθώς η διατήρηση του φυλλώματος των

δένδρων καθ' όλη τη διάρκεια του έτους επιτρέπει την αδιάκοπη φωτοσυνθετική δραστηριότητα και επομένως την παραγωγή βιομάζας. Παρόλα αυτά η επικράτηση ακραίων τιμών θερμοκρασίας για σύντομα σχετικά διαστήματα δεν αποτελεί σπάνιο φαινόμενο και μπορεί με ευκολία να συμπεριληφθεί στους παράγοντες καταπόνησης των φυτών. Έτσι κατά τη διάρκεια του χειμώνα οι χαμηλές θερμοκρασίες μειώνουν την φωτοσυνθετική ικανότητα και προκαλούν φωτοπαρεμπόδιση (πτώση της φωτοχημικής απόδοσης), λόγω συσσώρευσης βλαβών στα φωτοσυστήματα. Ενώ κατά τη διάρκεια της θερινής περιόδου επικρατούν σχετικά υψηλές θερμοκρασίες και δεν απουσιάζουν τα επεισόδια καύσωνα (Karabourniotis, 2003).

4.12 ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ

4.12.1 Γενικά

Οι αυτότροφοι οργανισμοί παίρνουν την απαραίτητη γι' αυτούς ενέργεια μέσω της φωτοσύνθεσης. Πρόκειται για μία διαδικασία κατά την οποία, με χρήση διοξειδίου του άνθρακα και νερού και απελευθέρωση οξυγόνου, η φωτεινή από το φως του ηλίου ενέργεια μετατρέπεται σε χημική, με τη μορφή σταθερών οργανικών ενώσεων. Αποτελεί τη πρωταρχική διαδικασία μέσω της οποίας η ενέργεια εισέρχεται στη βιόσφαιρα και από την οποία αποκτούν τελικά την απαραίτητη γι' αυτούς ενέργεια όλοι οι φυτικοί και ζωικοί οργανισμοί. Στην εικόνα 3 παρουσιάζεται η απλουστευμένη αντίδραση της φωτοσύνθεσης. Η όλη διαδικασία, ωστόσο, είναι εξαιρετικά πολύπλοκη. Περιλαμβάνει πολυάριθμες, στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους φωτοευαίσθητες και θερμοευαίσθητες αντιδράσεις και αφορά στην απορρόφηση πρωτονίων, τη μεταφορά ηλεκτρονίων και το μεταβολισμό του άνθρακα. (Ridge, 2002; Rost *et al.*, 1998).



Εικόνα 3: Η Απλουστευμένη Αντίδραση της Φωτοσύνθεσης

Η φωτοσύνθεση αποτελεί μια διαδικασία ζωτικής σημασίας σε πλανητικό επίπεδο διότι από τα οργανικά μόρια που προκύπτουν παρέχεται χημική ενέργεια και σκελετοί άνθρακα σε όλα τα στάδια της τροφικής αλυσίδας (Δροσόπουλος, 1998). Επιπροσθέτως με τη φωτοσύνθεση εμπλουτίζεται η

ατμόσφαιρα με το απαραίτητο μοριακό οξυγόνο για την αναπνοή όλων των αερόβιων οργανισμών ενώ τα αρχέγονα προϊόντα με τη μορφή κοιτασμάτων υδρογονανθράκων αποτελούν τα σημαντικότερα ενεργειακά αποθέματα της γης (Hall and Rao, 1999). Η φωτοσυνθετική λειτουργία πραγματοποιείται σε ειδικευμένα υποκυτταρικά οργανίδια, τους χλωροπλάστες. Στη μεμβράνη των θυλακοειδών των χλωροπλαστών απαντώνται μόρια χλωροφύλλης, τα οποία σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες. Η φωτοσύνθεση ολοκληρώνεται σε δύο φάσεις. Η πρώτη που χαρακτηρίζεται ως φωτεινή φάση περιλαμβάνει αντιδράσεις στις οποίες είναι απαραίτητη η παρουσία φωτός (φωτοχημικές αντιδράσεις). Σε αυτές η ενέργεια ακτινοβολίας μετατρέπεται σε χημική υπό τη μορφή σταθερών χημικών ενώσεων με υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο, του NADPH και του ATP. Σε αυτή τη φάση φωτολύονται μόρια νερού και παρέχουν πρωτόνια, ηλεκτρόνια και μοριακό οξυγόνο (Aivalakis *et al.*, 2003). Η δεύτερη φάση χαρακτηρίζεται ως σκοτεινή, καθώς δεν εξαρτάται άμεσα από την ύπαρξη φωτισμού (Taiz and Zeiger, 1998). Στη σκοτεινή φάση λαμβάνουν χώρα καθαρά βιοχημικές αντιδράσεις (σκοτεινές αντιδράσεις), στις οποίες η απαιτούμενη ενέργεια για τη σύνθεση τριοζών από άτομα άνθρακα, οξυγόνου και υδρογόνου προσφέρεται από το ATP. Παράλληλα καταναλώνεται NADPH προσφέροντας πρωτόνια και ηλεκτρόνια για την αναγωγή του CO₂ στο επίπεδο του υδατάνθρακα. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες λαμβάνουν χώρα στα φύλλα τα οποία διαθέτουν συγκεκριμένα μορφολογικά και ανατομικά χαρακτηριστικά ώστε να επιτυγχάνονται μέγιστες αποδόσεις σε επίπεδο οργάνου (Aivalakis *et al.*, 2003).

4.12.2 Φωτεινές Αντιδράσεις

Οι φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης πραγματοποιούνται στα θυλακοειδή των grana και στα θυλακοειδή του στρώματος των χλωροπλαστών. Πρόκειται για δομές που αποτελούνται από επάλληλες σειρές θυλακοειδών μεμβρανών, που περιέχουν φωτοσυνθετικές χρωστικές. Οι χρωστικές αυτές δημιουργούν σύμπλοκα με πρωτεΐνες και οργανώνονται σε

μια μακρομοριακή δομή, το φωτοσυλλεκτικό μηχανισμό ή αντένα φωτοσυλλογής. Για την ολοκλήρωση των φωτεινών αντιδράσεων λειτουργούν και συνεργάζονται μεταξύ τους δύο φωτοσυστήματα, το φωτοσύστημα I και το φωτοσύστημα II. Κάθε φωτοσύστημα διαθέτει ένα φωτοχημικό κέντρο αντίδρασης το οποίο συνεργάζεται με τον αντίστοιχο φωτοσυλλεκτικό μηχανισμό. Οι φωτεινές αντιδράσεις περιλαμβάνουν την απορρόφηση φωτονίων από τα μόρια των χρωστικών που βρίσκονται στο φωτοσυλλεκτικό μηχανισμό. Το quantum ενέργειας που απορροφάται από τις χρωστικές μεταφέρεται σε ένα ειδικό μόριο χλωροφύλλης *a*, το οποίο εντοπίζεται στο φωτοχημικό κέντρο αντίδρασης του φωτοσυστήματος II (PSII). Αυτό προκαλεί διέγερση των ηλεκτρονίων στο μόριο της χλωροφύλλης *a* και τελικώς διαχωρισμό φορτίου (δηλ. απόσπαση ηλεκτρονίων από το μόριο της χρωστικής). Τα ηλεκτρόνια που αποσπώνται από τη Chl_a, μεταφέρονται από το φωτοσύστημα II (PSII) στο φωτοσύστημα I (PSI) μέσω ενδιάμεσων φορέων, όπως το σύμπλοκο κυτοχρωμάτων *b_f6* (cyt *b_f6*). Για κάθε φωτόνιο που απορροφάται, μετακινείται ένα ηλεκτρόνιο. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται μέσω οξειδοαναγωγικών ζευγών αποτελούμενων από αναγωγικούς παράγοντες (δότες ηλεκτρονίων) και οξειδωτικούς παράγοντες (δέκτες ηλεκτρονίων). Το φωτοχημικό κέντρο αντίδρασης του PSI διαθέτει ένα ειδικό μόριο χλωροφύλλης *a*, το οποίο παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στην κόκκινη περιοχή του φάσματος, στα 700 nm. Για το λόγο αυτό το φωτοχημικό κέντρο αντίδρασης του PSI αναφέρεται ως P700. Αντίστοιχα το φωτοχημικό κέντρο του PSII αναφέρεται ως P680 καθώς διαθέτει ένα ειδικό μόριο χλωροφύλλης *a*, το οποίο παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 680 nm. Το ηλεκτρόνιο που αποσπάται από το μόριο της χλωροφύλλης *a* του PSII αντικαθίσταται από ένα άλλο ηλεκτρόνιο, το οποίο παρέχεται από το νερό. Η διάσπαση του νερού καταλήγει στην απελευθέρωση μοριακού οξυγόνου και συμβάλλει στη διαμόρφωση συγκέντρωσης πρωτονίων μεταξύ στρώματος και lumen των θυλακοειδών. Στο PSI, η απορρόφηση του φωτός προκαλεί διέγερση και μεταφορά ηλεκτρονίων προς έναν ενδιάμεσο φορέα, τη φερρεδοξίνη και κατόπιν τη ρεδοκτάση του NADP⁺, το ένζυμο το οποίο

είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση του NADPH. Το ηλεκτρόνιο που αποσπάστηκε από το φωτοχημικό κέντρο αντίδρασης του PSI αναπληρώνεται από ένα άλλο ηλεκτρόνιο, το οποίο παρέχεται από το PSII. Η φωτοχημική αλυσίδα αναφέρεται ως μεταφορά ηλεκτρονίων με τη βοήθεια ενδιάμεσων φορέων με δότη το νερό και τελικό δέκτη το NADP μέσω του PSII, PSI. Συνοψίζοντας, η απορρόφηση φωτεινής ενέργειας και η μεταφορά ηλεκτρονίων προς το NADP+ έχει δύο σημαντικές επιπτώσεις : μόρια νερού διασπώνται μέσω της διαδικασίας της φωτόλυσης, απελευθερώνοντας ηλεκτρόνια, H⁺ στα lumen των θυλακοειδών και οξυγόνο και παράγεται NADPH. Το οξυγόνο απελευθερώνεται από το φύλλο και στην ατμόσφαιρα ως παραπροϊόν και χρησιμοποιείται από αερόβιους οργανισμούς για αναπνοή. Η διαφορά στη συγκέντρωση πρωτονίων, η οποία δημιουργείται κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων (με τη συσσώρευση στα lumen των θυλακοειδών) προκαλεί τη σύνθεση ATP από τη συνθάση του ATP. Συνεπώς η ενέργεια η οποία απορροφάται από το φως του ηλίου αποθηκεύεται τελικά στο NADPH (ως αναγωγική δύναμη) και στο μόριο του ATP, μέσω της διαδικασίας της φωσφορυλίωσης. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ATP και NADPH, τα οποία παρέχουν στο φυτό την ενέργεια που είναι απαραίτητη για τις βιοχημικές του αντιδράσεις (Bjorkman and Demmig, 1987; Lawlor, 2001; Ridge, 2002; Northington and Schneider, 1996; Schulze and Cadwell, 1995).

4.12.3 Σκοτεινές Αντιδράσεις

Ο χαρακτηρισμός σκοτεινές αντιδράσεις δικαιολογείται από το γεγονός ότι η ολοκλήρωσή τους δεν εξαρτάται άμεσα από τη φωτεινή ενέργεια. Συνεπώς οι αντιδράσεις αυτές μπορούν να πραγματοποιηθούν και να ολοκληρωθούν και στο σκοτάδι υπό την προϋπόθεση ότι είναι διαθέσιμα τα ATP και NADPH. Για το λόγο αυτό ονομάζονται και φωτοανεξάρτητες αντιδράσεις, καθώς η φωτεινή ενέργεια δεν είναι απαραίτητη σε όλες τις φάσεις της διαδικασίας (Northington and Schneider, 1996). Μέχρι σήμερα έχει διαπιστωθεί ότι

υπάρχουν τέσσερις κύριες βιοχημικές παραλλαγές των σκοτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης (Taiz and Zeiger, 2006) :

- Ο C3 κύκλος ή κύκλος του Calvin
- Η C2 οδός (φωτοαναπνοή)
- Η C4 οδός ή κύκλος του Hatch και Slack
- Ο μεταβολισμός οξέων τύπου Crassulaceae (CAM)

4.13 Σκοπός της Εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των μορφολογικών, ιστοχημικών και φυσιολογικών διαφορών μεταξύ των φύλλων των διαφόρων ηλικιών (1^ο έως 4^ο έτους) του δένδρου της χαρουπιάς (*Ceratonia siliqua*) και το πώς αυτές συμβάλλουν στην προστασία του φυτού από αβιοτικές καταπονήσεις (ξηρασία, υψηλές θερμοκρασίες). Καθώς επίσης ο ρόλος της διατήρησης του φυλλώματος του δένδρου ως απόκριση στις αντίξοες περιβαλλοντικές και κλιματολογικές συνθήκες διαβίωσής του.

5 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Μορφολογικά - Ανατομικά Χαρακτηριστικά

5.1.1 Συλλογή του φυτικού υλικού

Η συλλογή των φύλλων διαφόρων ηλικιών που χρησιμοποιήθηκαν στις παρατηρήσεις με το οπτικό, ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, έγινε από φυτά *Ceratonia siliqua*, από το δενδροκομείο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Μετά τη συλλογή του φυτικού υλικού, γινόταν μεταφορά του στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, όπου και δεχόταν τους κατάλληλους χειρισμούς για την παρατήρηση με τα διάφορα είδη μικροσκοπίας.

5.1.2 Προετοιμασία παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (Η.Μ.Δ.) και ημιλεπτών τομών με το Οπτικό (Ο.Μ.)

Τα στάδια της διαδικασίας που ακολουθήθηκε είναι:

- Φυτικοί ιστοί μεγέθους 1x5 mm κόπηκαν, από το μέσον του φύλλου με ξυραφάκι, από φύλλα 4 διαφορετικών ηλικιών (φύλλα τρέχοντος έτους, 2^{ης} χρονιάς, 3^{ης} χρονιάς και 4^{ης} χρονιάς). Η διαδικασία αυτή έγινε μέσα σε τρυβλίο με μονιμοποιητικό στους 4 °C .
- Μονιμοποίηση (στερέωση, καθήλωση, προσήλωση, fixation) με εμβαπτιση των δειγμάτων σε μονιμοποιητικό διάλυμα γλουταρικής αλδεΐδης (CHOCH₂CH₂CH₂CHO) 2,5% χρησιμοποιώντας ως ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικό 0.1M (Sörensen), σε φιαλίδια των 5 ml για 2-3 h στους 4 °C.
- Δημιουργία ήπιου κενού αέρος με αντλία βρύσης, για να αφαιρεθεί ο αέρας από τους μεσοκυττάριους χώρους και να διευκολυνθεί η διάχυση- διείσδυση του μονιμοποιητικού, στο εσωτερικό των ιστών.

- Έκπλυση των δειγμάτων με ρυθμιστικό διάλυμα 3 φορές από 30 min κάθε φορά.
- Μεταστερέωση με OsO₄ 1% σε νερό για 2 h.
- Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα 3 φορές από 30 min κάθε φορά.
- Αφυδάτωση με αιθυλική αλκοόλη 30% για 30 min.
- Αφυδάτωση με αιθυλική αλκοόλη 50% για 30 min.
- Αφυδάτωση με 1% οξικό ουρανύλιο σε αιθυλική αλκοόλη 50%, όπου τα δείγματα παραμένουν όλη τη νύχτα για παράλληλη χρώση en block.
- Αφυδάτωση με αιθυλική αλκοόλη 90% για 30 min και 100%, 3 φορές από 30 min.
- Αλλαγή διαλύτη από αιθυλική αλκοόλη σε προπυλενοξείδιο για 1 h. Πρόκειται για ενδιάμεσο διαλύτη μεταξύ της αιθυλικής αλκοόλης και των εποξικών ρητινών που θα χρησιμοποιηθούν στο επόμενο στάδιο.
- Εμποτισμός με ρητίνη. Στα φιαλίδια προστίθενται ίση ποσότητα ρητίνης Spurr με το προπυλενοξείδιο και αφήνονται στον απαγωγό ανοιχτά, υπό συνεχή αργή ανάδευση για 18 h, ώστε να εξατμιστεί το προπυλενοξείδιο και να παραμείνουν τα δείγματα σε ρητίνη 100%.
- Έγκλειση των δειγμάτων σε καθαρή εποξική ρητίνη, σε καλούπια σιλικόνης και πολυμερισμός στον κλίβανο, στους 68 °C για 48-72 h.

5.1.3 Τμήση τομών και χρώση μονιμοποιημένων παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το Ο.Μ.

Η τμήση τομών έγινε με τον υπερμικροτόμο, τύπου REICHERT OMU-III.

Για το οπτικό μικροσκόπιο κόπηκαν 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 τοποθετήθηκαν σε σταγόνα αποσταγμένου νερού πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες, που ήταν καλυμμένες με ζελατίνα (Grimstone and Skaer, 1972), ώστε οι τομές να απλώνονται και να επικollώνται καλύτερα πάνω στην αντικειμενοφόρο.

Οι αντικειμενοφόροι με τις τομές, τοποθετούνταν στη συνέχεια σε θερμαινόμενη πλάκα στους 80 °C και μόλις στέγνωσε η σταγόνα νερού, γινότανε χρώση των τομών με κυανούν της τολουιδίνης 1% σε βόρακα 1%. Ακολούθησε έκπλυση με αποσταγμένο νερό και στέγνωμα της αντικειμενοφόρου στη θερμαινόμενη πλάκα. Στη συνέχεια έγινε επικόλληση της καλυπτρίδας χρησιμοποιώντας είτε μια σταγόνα από την ίδια την εποξική ρητίνη, είτε Eukitt (Agar Scientific Ltd.), προκρινόμενου να μονιμοποιηθούν οι τομές. Τμήση τομών για παρατήρηση με το οπτικό μικροσκόπιο έγινε και την εφαρμογή ιστοχημικών μεθόδων έγινε με κρυοστάτη (ψυκτικό μικροτόμο) Leica CM 1850.

5.1.4 Τμήση τομών και χρώση μονιμοποιημένων παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το Η.Μ.Δ.

Τα μονιμοποιημένα δείγματα, τα οποία έχουν προετοιμαστεί και τα οποία είναι εγκλεισμένα σε εποξική ρητίνη, κόβονται σε υπέρλεπτες τομές, πάχους περίπου 60-80 nm, με υπερμικροτόμο τύπου REICHERT OMU-III, με γυάλινα μαχαίρια, τα οποία κατασκευάστηκαν με την ειδική συσκευή (knife-maker της εταιρείας Reichert-Taab). Στην περίπτωση αυτή, στα μαχαίρια τοποθετείται ειδική αυτοκόλλητη ταινία (Silver tape της εταιρείας 3M), η οποία

στεγανοποιείται με οδοντιατρικό κερί για να σχηματιστεί ένα μικρό δοχείο, το οποίο γεμίζεται με αποσταγμένο νερό, έτσι ώστε οι τομές που κόβονται να επιπλέουν στην ελεύθερη επιφάνεια του νερού, από όπου και συλλέγονται. Με τον τρόπο αυτό, είναι εύκολο να γίνει και μία εκτίμηση του πάχους των τομών, λόγω του φαινομένου της συμβολής του φωτός, εξαιτίας του οποίου οι τομές έχουν διαφορετικό χρώμα, ανάλογα με το πάχος τους. Οι τομές με πάχος 60-80 nm, που είναι και οι πλέον κατάλληλες για παρατήρηση στο Η.Μ.Δ., εμφανίζουν χρώμα ασημί. Οι διαδοχικές τομές, σχηματίζουν πάνω στο νερό, μία ταινία, η οποία στη συνέχεια, συλλέγεται πάνω σε ειδικά πλέγματα χαλκού (grids), διαμέτρου 3 mm και τύπου ATHENA, hexagonal G75. Τα πλέγματα έχουν προηγουμένως επικαλυφθεί με λεπτή μεμβράνη πυροξυλίνης 2% σε οξικό αμυλεστέρα ή Piodoform 0,5% σε χλωροφόρμιο 0,5% (Φασσέας, 2005).

5.1.5 Διπλή Χρώση Reynolds

Την τοποθέτηση των τομών επάνω στα grids, ακολουθεί η διπλή χρώση Reynolds, με οξικό ουρανύλιο 5% σε νερό και κιτρικό μόλυβδο. Η διαδικασία η οποία ακολουθείται είναι:

- Σταγόνες χρωστικής (40-50 μl) τοποθετούνται πάνω σε τρυβλία Petri, επιστρωμένα με σιλκόνη (Silastic της Dow Corning). Για το οξικό ουρανύλιο, τα grids, επιπλεύσθηκαν, ένα ανά σταγόνα χρωστικής, στο σκοτάδι για 45 min, ενώ για τον κιτρικό μόλυβδο, τα grids, επιπλεύσθηκαν, ένα ανά σταγόνα χρωστικής, για 15 min. Για τη χρώση με κιτρικό μόλυβδο, στο τρυβλίο, τοποθετούνται επίσης, 5-6 κρύσταλλοι NaOH, για την απορρόφηση του CO₂ και την αποφυγή σχηματισμού κρυστάλλων ανθρακικού μολύβδου.
- Τα grids ξεπλένονται με 10-15 σταγόνες απεσταγμένου νερού. Αυτό γίνεται δύο φορές, μία πριν τη μεταφορά στον κιτρικό μόλυβδο και μία στο τέλος. Τα grids τοποθετούνται πάνω σε διηθητικό χαρτί, με τις

τομές προς τα επάνω, για να στεγνώσουν. Τα δείγματα είναι πλέον έτοιμα για παρατήρηση.

5.1.6 Προετοιμασία παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Η.Μ.Σ.)

Τα στάδια της διαδικασίας που ακολουθήθηκε είναι τα εξής:

- Έκπλυση των δειγμάτων με αποσταγμένο νερό και σαπούνι για απομάκρυνση του κεριού από την επιφάνεια των φύλλων.
- Κόψιμο των δειγμάτων μεγέθους 5x5 mm, από το μέσον του φύλλου, φύλλων 4 διαφορετικών ηλικιών (φύλλα τρέχοντος έτους, 2^{ης} χρονιάς, 3^{ης} χρονιάς και 4^{ης} χρονιάς) του *C. siliqua*, με ξυραφάκι.
- Μονιμοποίηση- Στερέωση με γλουταρική αλδεΐδη 2,5% σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M (Sörensen) με p H =7,2, σε φιαλίδια των 5ml για 2-3 h στους 4 °C.
- Έκπλυση των δειγμάτων με ρυθμιστικό διάλυμα 3 φορές από 30 min.
- Σταδιακή αφυδάτωση με σειρά ανιούσης συγκέντρωσης ακετόνης 30%, 50%, 70%, 90% για 30 min η κάθε μία και 100%, 3 φορές από 30 min. Στο τελευταίο διάλυμα ακετόνης 100%, τα δείγματα παραμένουν για 24 h. Όλα τα διαλύματα παρασκευάστηκαν από καθαρή ακετόνη.
- Έκπλυση των δειγμάτων με ακετόνη 100% 2 φορές από 30 min.
- Ξήρανση στη συσκευή κρίσιμου σημείου (Critical Point Dryer, POLARON 3000). Στη συσκευή αυτή, γίνεται αντικατάσταση της ακετόνης με υγρό CO₂, το οποίο στη συνέχεια απομακρύνεται, αφού μετατραπεί σε αέριο αδιαβατικά (κρίσιμο σημείο). Διάρκεια ξήρανσης 2 h.
- Επικόλληση των δειγμάτων, την επόμενη ημέρα, σε υποδοχείς (stubs) είτε με αυτοκόλλητους δίσκους άνθρακα (Carbon tabs, Agar Scientific L.t.d.) διπλής όψης, είτε με κόλλα τύπου UHU.
- Επικάλυψη των δειγμάτων με καθαρό χρυσό, με εκκένωση αίγλης σε ατμόσφαιρα αργού (Ar). Η διαδικασία, πραγματοποιείται σε

εξαχνωτή Denton-Vacuum DV-502, εφοδιασμένο με τα κατάλληλα εξαρτήματα.

Μετά το πέρας των παραπάνω διαδικασιών, τα παρασκευάσματα, είναι πλέον έτοιμα για παρατήρηση στο Η.Μ.Σ.. Η φύλαξη των δειγμάτων πρέπει να γίνει προσεκτικά σε κλειστά κουτιά, προστατευμένα από σκόνες και υγρασία που ενδέχεται να τα αλλοιώσουν.

5.1.7 Παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων στο Η.Μ.Σ

Η παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων έγινε με την απευθείας τοποθέτηση των δειγμάτων σε δειγματοφορείς (stubs) του μικροσκοπίου, επικαλυμμένα με ειδικά αγωγίμα αυτοκόλλητα δισκία άνθρακα (Carbon tabs, Agar Scientific L.t.d.), γρήγορη δημιουργία κενού και άμεση παρατήρηση και φωτογράφιση των δειγμάτων, σε τάση επιτάχυνσης 2-2,5 KV, πριν αρχίσει η συρρίκνωση των ιστών, λόγω αφυδάτωσης.

5.1.8 Προετοιμασία νωπών παρασκευασμάτων για παρατήρηση με το Ο.Μ.

Η κοπή των τομών για απλή παρατήρηση με το οπτικό μικροσκόπιο και τις ιστοχημικές δοκιμές έγινε σε ψυκτικό μικροτόμο (κρυστόμο, κρυοστάτη) τύπου Leica CM1850 Germany. Γι' αυτό το σκοπό τμήματα από το μέσον του φύλλου τοποθετήθηκαν στον ειδικό δειγματοφορέα μέσα σε ειδικό υγρό ψύξης - έγκλεισης Jung Tissue Freezing Medium, κατάλληλο για τον κρυστόμο, ώστε να συγκρατεί τους ιστούς κατά την κοπή. Εφόσον το μονιμοποιητικό υλικό και οι ιστοί παγώσουν στους -17 °C κόβονται τομές από τα φύλλα, πάχους 25 μm, και συλλέγονται σε απεσταγμένο νερό όπου και ξεπλένονται για να απομακρυνθεί το ειδικό υγρό ψύξης. Οι τομές είναι πλέον έτοιμες για την εφαρμογή ιστοχημικών μεθόδων ή την απευθείας παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο και στο μικροσκόπιο φθορισμού.

5.1.9 Μικροσκοπία Φθορισμού

Το μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε για την παρατήρηση αλλά και φωτογράφιση των δειγμάτων (OLYMPUS BX40) του Εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας είναι εφοδιασμένο με τα κατάλληλα εξαρτήματα , ώστε να μπορεί να γίνει παρατήρηση με φίλτρα UV. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν:

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

Οι τομές τοποθετούνται σε σταγόνα νερού (αυτοφθορισμός) ή σε επαγωγέα φθορισμού (AlCl₃) όταν πρόκειται για την παρατήρηση φλαβονοειδών και παρατηρούνται άμεσα. Με το μικροσκόπιο φθορισμού παρατηρήθηκαν μόνο νωπά παρασκευάσματα.

5.1.10 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

5.2.1 Ιστοχημεία

Οι ιστοχημικές μέθοδοι εφαρμόζονται σε τομές νωπών φύλλων κομμένων με το χέρι, μερικά λεπτά από την συλλογή τους από το φυτό, ή σε μονιμοποιημένα παρασκευάσματα, για παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο, στο μικροσκόπιο φθορισμού ή στο στερεοσκόπιο. Για την παρατήρηση των δειγμάτων μας με το Ο.Μ. (Φθορισμού και φωτεινού πεδίου μετά από εφαρμογή ιστοχημικών μεθόδων), κόπηκαν εγκάρσιες τομές από νωπά φύλλα με τον κρυτόμο (κρυοστάτη) τύπου Leica CM1850 σε θερμοκρασία -17 °C και με χρήση υγρού ψύξης - έγκλεισης Jung Tissue Freezing Medium ρυθμισμένο να κόβει τομές πάχους 25 μm.

5.2.1.1 Αντιδραστήριο Nadi

Το αντιδραστήριο Nadi χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό τερπενοειδών, τα οποία χρωματίζονται ιώδη/βιολετί. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγη ώρα προτού χρησιμοποιηθεί. Επειδή το αντιδραστήριο αυτό είναι ιδιαίτερα φωτοευαίσθητο, διατηρείται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο, ενώ οι τομές οι οποίες τοποθετούνται στη χρώση αυτή, καλύπτονται προκειμένου να μην εκτίθενται στο φως (Pasqua *et al.*, 2003).

- Για την παρασκευή του διαλύματος αναμιγνύονται 1,5 ml από 1% *n*-naphthol σε 40% αλκοόλη, με 0,5 ml από 1% N,N-dimethyl-p-phenylenediamine monohydrochloride σε απεσταγμένο νερό, και με 49 ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος 0,05 M (p H 7,2).
- Οι τομές παραμένουν στο αντιδραστήριο για 1 h. Η παρατήρηση γίνεται σε σταγόνα γλυκερόλης στο Ο.Μ.

5.2.1.2 Βανιλίνη

Κορεσμένο διάλυμα αλκοολικής βανιλίνης μπορεί να εντοπίσει συμπυκνωμένες ταννίνες σε νωπές τομές. Σε περίπτωση παρουσίας ταννινών,

αυτές χρωματίζονται σε χρώμα έντονο κόκκινο. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται με τα ξυραφάκια με τα οποία γίνονται οι τομές, ώστε να είναι καθαρά, διότι σε περίπτωση που είναι από σίδηρο, μπορεί το υλικό να αντιδράσει με τις φαινόλες του δείγματος και να αναπτυχθεί χρώμα κατά τη διάρκεια των τομών (Gardner 1975). Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται προσθέτοντας 2 όγκους 10% (w/v) βανιλίνης - αιθυλικής αλκοόλης σε 1 όγκο πυκνού HCL και απευθείας τοποθέτηση των τομών (Sarkar and Howarth 1976). Εναλλακτικά, παρασκευάζεται κορεσμένο διάλυμα βανιλίνης σε αιθυλική αλκοόλη (Gardner 1975). Οι τομές τοποθετούνται αμέσως σε μία σταγόνα του διαλύματος. Στη συνέχεια προστίθενται αρκετές σταγόνες πυκνού HCL. Τέλος η παρατήρηση γίνεται σε γλυκερόλη στο Ο.Μ.

5.2.1.3 *Sudan IV*

Το αντιδραστήριο χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό λιπιδίων, κοχτίνης και σουβερίνης, εκτός των φωσφολιπιδίων, τα οποία και χρωματίζονται κόκκινα. Η αντίδραση στηρίζεται στην επιλεκτική διαλυτότητα της χρωστικής στα λιπίδια. Πιο συγκεκριμένα η χρωστική είναι πιο διαλυτή στα λιπίδια του ιστού από ότι στον διαλύτη, στον οποίο αρχικά διαλύθηκε (αλκοόλη) και έτσι με την απλή τοποθέτηση του ιστού στην 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). Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται στην διατήρηση των χρόνων, διότι η αλκοόλη, που χρησιμοποιείται είναι διαλύτης των λιπών και μπορεί να δημιουργηθούν προβλήματα από την μεγάλη παραμονή τους στο διάλυμα (Johansen, 1940).

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί κορεσμένο διάλυμα σε αλκοόλη:

- Οι τομές εμβαπτίζονται στο διάλυμα για 5 min.
- Ακολουθεί γρήγορη έκπλυση με απόλυτη αλκοόλη.

- Η παρατήρηση γίνεται με το Ο.Μ. σε σταγόνα γλυκερόλης.
- Είτε μπορεί να χρησιμοποιηθεί 0,5% Sudan IV σε 85% αλκοόλη:
- Οι τομές εμβαπτιζονται στο διάλυμα για 2-5 min.
- Ακολουθεί γρήγορη έκπλυση σε 50% αλκοόλη.

Η παρατήρηση γίνεται με το Ο.Μ. σε σταγόνα γλυκερόλης.

5.2.1.4 *Θεικός Σίδηρος (FeSO₄)*

Για τον εντοπισμό ταννινών μπορεί να χρησιμοποιηθεί διάλυμα FeSO₄, με το οποίο οι ταννίνες 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 FeSO₄ σε 89 ml απεσταγμένου νερού.
- Οι τομές κόβονται σε νερό.
- Στη συνέχεια τοποθετούνται στο αντιδραστήριο όπου και παραμένουν 2-4 h ή και 18 h.
- Η παρατήρηση γίνεται σε σταγόνα γλυκερόλης στο Ο.Μ.

5.2.1.5 *Τριχλωριούχο Αργίλιο/Aluminium Trichloride (AlCl₃)*

Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό φλαβονών (flavones), φλαβονολών (flavonols) και φλαβονονών (flavanones) στο μικροσκόπιο φθορισμού. Ο φθορισμός που προκύπτει είναι πρασινοκίτρινος για τις φλαβόνες, κίτρινος για τις φλαβονόλες και μπλε για τις φλαβονόνες. 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.

5.2.1.6 Φλωρογλοκίνη (*Phloroglucinol*)

Χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό της λιγνίνης. Η αντίδραση είναι ειδική αλλά εμφανίζεται θετική και για πεντοζάνες (ημικυτταρίνες) (Davidson *et al* 1995. Feder and O'Brien 1968). Τα λιγνινοποιημένα κυτταρικά τοιχώματα χρωματίζονται βυссινί - κόκκινα - ροζ. Τοποθετούμε την τομή νωπή ή μονιμοποιημένη, σε φλωρογλοκίνη (1% σε 95% αιθανόλη). Στο πλάι της καλυπτρίδας βάζουμε μία σταγόνα 25% HCl. Η διάχυση του HCl, διευκολύνεται, τοποθετώντας ένα κομμάτι διηθητικού χαρτιού από την απέναντι πλευρά της καλυπτρίδας.

5.2.1.7 Ερυθρό του ρουθηνίου/*Ruthenium Red*

Χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό πολυσακχαριτών, πλην της κυτταρίνης, οι οποίοι εμφανίζονται ροζ έως κόκκινοι (Jensen 1962). Παρασκευάζεται διάλυμα 0,05% ερυθρού του ρουθηνίου σε νερό, στο οποίο τοποθετούνται οι τομές. Οι τομές από νωπά και μονιμοποιημένα δείγματα παραμένουν στο διάλυμα για 1-5 min. Ακολουθεί παρατήρηση σε νερό με το O.M.

5.2.1.8 Διχρωμικό κάλιο ($K_2Cr_2O_7$)

Το διχρωμικό κάλιο εντοπίζει φαινολικές ενώσεις οι οποίες και χρωματίζονται σκούρο καφέ. Τομές νωπών δειγμάτων τοποθετούνται σε διάλυμα διχρωμικού καλίου 10% σε νερό, για 10 min. Ακολουθεί γρήγορο ξέπλυμα με νερό και παρατήρηση σε σταγόνα νερού στο O.M.

5.2.2 Σύσταση Διαλυμάτων

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M (Sørensen)

Διάλυμα stock A: $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 35,61 g/l

Διάλυμα stock B: $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 27,60 g/l

Τα διαλύματα Α και Β μπορούν να διατηρηθούν στους 4 °C για μερικές εβδομάδες. Για να φτιάξουμε ρυθμιστικό διάλυμα με $pH = 7,2$, ανακατεύουμε 36 ml από το Α και 14 ml από το Β και συμπληρώνουμε μέχρι τα 100 ml με αποσταγμένο νερό.

- **Συστατικά ρητίνης Spurr**

Αναδεύουμε για αρκετή ώρα σε μαγνητικό αναδευτήρα τα παρακάτω συστατικά:

1. 10 g ERL
2. 7 g DER
3. 26 g NSA
4. 0,4 g S-1 (πολυμεριστής)

- **Επικάλυψη αντικειμενοφόρων με ζελατίνα (Grimstone and Skaer 1972)**

Προσθέτουμε 1 g ζελατίνης/ 1 lt χλιαρού αποσταγμένου νερού σε 0,1 g $CrKSO_4$. Σχολαστικά πλυμένες και στεγνωμένες αντικειμενοφόροι, εμβαπτιζονται στο παραπάνω διάλυμα, όταν αυτό κρυώσει και αφήνονται να στεγνώσουν σε κατακόρυφη θέση, σε χώρο όσο το δυνατόν απαλλαγμένο από σκόνη.

- **Κιτρικός μολύβδος**

Διαλύουμε 0,1-0,2 g NaOH σε 50 ml αποσταγμένου νερού. Στο ίδιο διάλυμα διαλύουμε 0,25 g κιτρικού μολύβδου.

5.2.3 Μικροσκόπια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τις μορφολογικές ανατομικές και ιστοχημικές παρατηρήσεις

- **Οπτικό Μικροσκόπιο (Ο.Μ.):** Τύπου OLYMPUS BX40 του Εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, εφοδιασμένο με τα κατάλληλα εξαρτήματα για παρατηρήσεις σε φωτεινό ή σκοτεινό πεδίο, αντίθετης φάσης και επιφθορισμό. Για το φθορισμό, το φίλτρο διέγερσης που χρησιμοποιήθηκε είναι το BP 330-385, και το φίλτρο εκπομπής είναι το BA 420.
- **Στερεοσκόπιο:** Τύπου OLYMPUS SZX12 του Εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας.
- **Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (Η.Μ.Δ.):** Τύπου Jeol 100S του Εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας.
- **Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Η.Μ.Σ.):** Τύπου Jeol 6360 του Εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας.

5.2.4 Φωτογράφιση

Για το Ο.Μ. και το Στερεοσκόπιο η λήψη φωτογραφιών έγινε με ψηφιακή μηχανή camera DP71 Olympus 12.5 Mp. Το Η.Μ.Σ. Jeol 6360 είναι εφοδιασμένο με σύστημα ψηφιακής φωτογράφισης.

5.3 Μέτρηση Φωτοσύνθεσης, Διαπνοής και Στοματικής Αγωγιμότητας στο CO₂

Για τη επί τόπου μέτρηση της φωτοσύνθεσης χρησιμοποιήθηκαν πλήρως εκπτυγμένα φύλλα διαφόρων ηλικιών τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε συνθήκες άπλετου φωτισμού. Η μέτρηση της φωτοσύνθεσης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φορητού οργάνου μέτρησης LCpro+ (ADC Bioscientific Ltd, England) εξοπλισμένο με ένα μικρο-αναλυτή αερίων υπερύθρου. Ο φωτισμός του φύλλου στο θάλαμο του οργάνου, εμβαδού 6,25 cm² πραγματοποιήθηκε με πηγή LED. Οι μετρήσεις διεξήχθησαν πρωινές ώρες (9:00-11:30 π.μ). Εκτός από τη φωτοσύνθεση (A) υπολογίστηκε η διαπνοή (Tr) και η στοματική αγωγιμότητα στο CO₂ (g_s). Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν μέσω καμπυλών απόκρισης στο φως από 0 έως 1840 μmol φωτονίων m⁻² s⁻¹.

5.3.1 Μέτρηση Παραμέτρων Φθορισμού Χλωροφύλλης

Οι παράμετροι του φθορισμού χλωροφύλλης μετρήθηκαν *in vivo* σε φύλλα εγκλιματισμένα στο σκοτάδι (ώστε να ληφθεί η θεμελιώδης φωτοχημική ικανότητα) και σε φύλλα εγκλιματισμένα σε λευκό ακτινικό φως διαφόρων εντάσεων (ώστε να ληφθούν καμπύλες απόκρισης των φωτοχημικών παραμέτρων στις διάφορες εντάσεις προσπίπτουσας ακτινοβολίας) κατά τη διάρκεια της φωτοπεριόδου (συγκεκριμένα μεταξύ 8 και 11:30 π.μ) με τη χρήση φορητού φθορισμομέτρου παλμικής διαμόρφωσης σήματος (PAM-2100, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). Κάθε φύλλο εγκλιματιζόταν για τουλάχιστον 20 min πριν την διεξαγωγή των μετρήσεων με τη χρήση ειδικών υποδοχέων. Οι μετρήσεις του φθορισμού λαμβάνονταν την ίδια περίοδο στα ίδια φύλλα στα οποία είχαν ληφθεί και οι μετρήσεις της φωτοσύνθεσης. Οι μετρήσεις λαμβάνονταν στο κέντρο του ημίσεως του φύλλου μεταξύ της κεντρικής νεύρωσης και του επάρματος του ελάσματος ώριμων φύλλων. Κατά την εφαρμογή της ακτινοβολίας μέτρησης (655 nm, PPFD<0.15 μmole quanta m⁻² s⁻¹) καταγραφόταν ο φθορισμός βάσης (F₀,

ακριβώς πριν την εφαρμογή του παλμού κορεσμού (λευκού φωτός, περίπου 10,000 $\mu\text{mole quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ και διάρκειας 0.8 s). Κατά τη διάρκεια του παλμού κορεσμού, λαμβανόταν ο μέγιστος φθορισμός (F_m). Στην περίπτωση των φύλλων εγκλιματισμένων στο φως, λαμβάνονταν οι παράμετροι της απόδοσης φθορισμού F_s και F_m και η τρέχουσα φωτονιακή απόδοση της φωτοχημείας του PS II (Φ_{PSII}) η οποία υπολογίστηκε ως $(F_m - F_s) / F_m$. Επιπρόσθετα, τα ακόλουθα δεδομένα καταγράφονταν αυτόματα από το όργανο: η θερμοκρασία του ελάσματος και η φωτονιακή πυκνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (PAR) μέσω της οποίας υπολογίστηκε η παράμετρος του φαινόμενου ρυθμού ροής των ηλεκτρονίων (ETR) σύμφωνα με την εξίσωση $\text{ETR} = \Phi_{\text{PSII}} * \text{PAR} * 0,84 * 0,5$ (όπου 0,84 είναι η υποτιθέμενη απορροφητικότητα του φύλλου ενώ ο συντελεστής 0,5 αφορά στην κατά 50% επί της προσπίπτουσας ακτινοβολίας κατανομή των απορροφώμενων φωτονίων στο PS II). Η ανάλυση της απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης (όπως περιγράφεται από τους συντελεστές απόσβεσης qP για την φωτοχημική απόσβεση και qN για την μη-φωτοχημική απόσβεση) διενεργήθηκε αυτόματα χρησιμοποιώντας την ρουτίνα ανάλυσης του οργάνου (συνεπώς δεν ελήφθηκε υπ' όψη η απόσβεση του φθορισμού βάσης (F_0) υπό συνθήκες φωτισμού).

6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Μορφολογία - Ανατομία των φύλλων

Τα φύλλα της χαρουπιάς είναι ετεροβαρή, ετερόπλευρα και υποστοματικά. Ο αριθμός των στομάτων μετρήθηκε να είναι 145 ± 6 στ/mm². Το χρώμα των ώριμων φύλλων είναι χαρακτηριστικό γκριζοπράσινο στην προσαξονική τους επιφάνεια και περισσότερο πράσινο στην αποαξονική τους. Το γκριζοπράσινο χρώμα οφείλεται στα φυλλίδια του επιεφυμενιδικού κηρού. Η διάρκεια ζωής των φύλλων παρατηρήθηκε να φτάνει μέχρι και τα τέσσερα έτη. Νέα φύλλα μπορεί να αναπτυχθούν όλες τις εποχές του έτους εφόσον οι συνθήκες είναι κατάλληλες, όπως για παράδειγμα μερικές ημέρες καλοκαιρίας κατά τη διάρκεια του χειμώνα ή βροχοπτώσεις κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. Η μέγιστη όμως ανάπτυξη παρατηρείται στα ανοιξιάτικα φύλλα, ενώ τα φύλλα τα οποία αναπτύσσονται περιστασιακά κατά τις άλλες εποχές, το τελικό τους μέγεθος είναι συνήθως περιορισμένο. Τα νεαρά φύλλα αρχικά είναι μαλακά με ανοιχτό πράσινο χρώμα ενώ όταν ωριμάσουν γίνονται σκληρά, δερματώδη και με σκούρο πράσινο χρώμα.

Το πάχος του ελάσματος των φύλλων του πρώτου έτους μετρήθηκε να είναι 406 μm ενώ τα φύλλα 2, 3 & 4 ετών βρέθηκαν να είναι κατά 100 μm παχύτερα (Πίνακας 1)

Η προσαξονική επιφάνεια των φύλλων καλύπτεται από παχύ στρώμα επιεφυμενιδικών κηρών οι οποίοι αποτελούνται από φυλλίδια τα οποία είναι ορατά με το ΗΜΣ (Εικόνα 22.γ, δ) σε νωπά παρασκευάσματα χωρίς καμιά επεξεργασία σε σχετικά χαμηλή τάση επιτάχυνσης των ηλεκτρονίων (2.5 - 3.0 kV). Οι επιεφυμενιδικοί κηροί καλύπτουν εντελώς την επιφάνεια και καθιστούν τα στόματα ελάχιστα ορατά, μόνο υπό τη μορφή σχισμών στην επιφάνεια του φύλλου (Εικόνα 21.β, 22.β). Τα στόματα γίνονται ορατά όταν οι κηροί απομακρυνθούν με χλωροφόρμιο (Εικόνα 21.α, γ, 24.α).

Σε εγκάρσια τομή τα φύλλα εμφανίζονται να έχουν προσαξονικά μονόστρωμη επιδερμίδα της οποίας τα κύτταρα έχουν ύψος 62-73 μm με τα εξωτερικά κυτταρικά τοιχώματα να έχουν πάχος 5 μm . Η επιδερμίδα

καλύπτεται εξωτερικά από εφυμενίδα πάχους 6-7 μm η οποία γίνεται εμφανής με τη χρωστική Sudan IV (Εικόνα 14.ε, 15.ε, 16.ε, 17.ε) και η οποία διεισδύει μεταξύ των αντικλινών τοιχωμάτων των επιδερμικών κυττάρων μέχρι βάθους 15-20 μm (Εικόνα 18.γ, δ). Χαρακτηριστική είναι επίσης η ύπαρξη λεπτής στρώσης κουτινης υπό μορφή εσωτερικής εφυμενίδας, μεταξύ των επιδερμικών και των κυττάρων του μεσόφυλλου και των δυο επιφανειών (Εικόνα 18.γ, δ).

Τα κύτταρα της προσαξονικής επιδερμίδας και στις τέσσερις ηλικίες περιέχουν μεγάλη ποσότητα ταννινών, όπως αυτό φαίνεται κυρίως με το μαύρο χρωματισμό που προσλαμβάνουν με την επίδραση του αντιδραστηρίου FeSO_4 (Εικόνα 14.δ, 15.δ, 16.δ, 17.δ, 18.α, β). Οι ταννίνες είναι επίσης ορατές με το ΗΜΔ λόγω της οσμόφιλης σύστασής τους (Εικόνα 27.β). Η υψηλή συγκέντρωση φαινολικών φαίνεται με την επίδραση του αντιδραστηρίου $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (καφέ χρωματισμός) (Εικόνα 14.γ, 15.γ, 16.γ, 17.γ) και καθώς επίσης με την επίδραση βανιλίνης που τους προσδίδει έντομο κόκκινο χρώμα (Εικόνα 14.ζ, 15.ζ, 16.ζ, 17.ζ). Επιπλέον επιβεβαιώθηκε η παρουσία ελάχιστων τερπενοειδών στην εφυμενίδα και στο εσωτερικό των κυττάρων του μεσόφυλλου, έπειτα από επίδραση του αντιδραστηρίου Nadi και χρωματισμό τους με το χαρακτηριστικό μπλε-ιώδες χρώμα (Εικόνα 14.β, 15.β, 16.β, 17.β). Το μεσόφυλλο αποτελείται από το πασσαλώδες και το οπογγώδες παρέγχυμα. Το πασσαλώδες παρέγχυμα αποτελείται από 4 στρώσεις κυττάρων πάχους 170-230 μm και πλάτους 7-11 μm . Τα κύτταρα αυτά είναι έντονα προσκολλημένα μεταξύ τους, με πολύ μικρούς ή και καθόλου μεσοκυττάρους χώρους. Στα δείγματα των φύλλων 1^{ου} έτους παρατηρήθηκαν χλωροπλάστες με πολλούς και μεγάλου μεγέθους αμυλόκοκκους, grana με μικρό αριθμό θυλακοειδών, περίπου 10-20/ granum και πυρήνες με ακανόνιστο πολυγωνικό σχήμα. Μικροσωμάτια (microbodies) παρεμβάλλονται συχνά μεταξύ των μιτοχονδρίων και των χλωροπλάστων. Ακόμη, παρατηρήθηκαν μεταγωγικά κύτταρα (transfer cells) στα οποία παρατηρούνται κυστίδια μεταφοράς και δικτυοσώματα, παρόλο του ότι τα φύλλα είναι πλήρως ανεπτυγμένα.

Οι χλωροπλάστες των φύλλων 3ου και 4^{ου} έτους παρουσιάζουν τυπική δομή χλωροπλαστών χαμηλού φωτισμού (low light) στα grana των οποίων παρατηρήθηκαν πολλά θυλακοειδή. Σε ορισμένες περιπτώσεις μετρήθηκαν μέχρι και 240 θυλακοειδή / granum. Στους χλωροπλάστες του πασσαλώδους παρεγχύματος φύλλων αυτών των ηλικιών δεν παρατηρήθηκαν καθόλου αμυλόκοκκοι. Χαρακτηριστικές δομές που παρατηρήθηκαν μέσα στους χλωροπλάστες είναι σφαιρικά κυστίδια, μεγέθους 200-500 μm, περιβαλλόμενα από μοναδιαία μεμβράνη των οποίων το περιεχόμενο εμφανίζεται ομοιογενές και ελαφρά οσμιοφιλο (γκρι). Τα κυστίδια αυτά απουσιάζουν από τα φύλλα του 1^{ου} έτους. Όπως φαίνεται στις εικόνες 30.α, β, 31.α, 32.α, β, 33.α, β, γ, δ. τα κυστίδια βρίσκονται στο στρώμα των χλωροπλαστών και είναι σε στενή επαφή με τα θυλακοειδή των grana. Σε πολλές περιπτώσεις η μεμβράνη που περιβάλλει τα κυστίδια των χλωροπλαστών συντήκεται με το φάκελο των χλωροπλαστών και το περιεχόμενό τους εμφανίζεται να αποβάλλεται στο κυτόπλασμα (Εικόνα 33.α) ή ακόμα και απευθείας στο χυμοτόπιο (Εικόνα 30.α,) όπου πιθανό να μεταβολίζεται προς ταννίνες οι οποίες παρατηρούνται στα χυμοτόπια αυτών των κύτταρων (Εικόνα 32.β).

Σε ολόκληρο το έλασμα των φύλλων, η χρώση με φλωρογλυκίνη έδειξε ότι δεν υπάρχει σκληρέγχυμα ενώ η λιγνίνη απουσιάζει παντελώς από τα κυτταρικά τοιχώματα με μόνη εξαίρεση τα τοιχώματα των ξυλωδών αγγείων τα οποία είναι σχετικά λίγα σε αριθμό και μικρής διαμέτρου, περίπου 5-8 μm (Εικόνα 17.ι). Κάτω από το πασσαλώδες παρέγχυμα εμφανίζεται το σπογγώδες παρέγχυμα πάχους 140-190 μm. Τα κύτταρα αυτά είναι έντονα προσκολλημένα μεταξύ τους με πολύ μικρούς μεσοκυττάριους χώρους. Ανάμεσα στα κύτταρα του σπογγώδους παρεγχύματος παρεμβάλλονται πολυάριθμες πηκτινικές ίνες οι οποίες πιθανότατα να συμβάλλουν στον σκληροφυλλικό χαρακτήρα των φύλλων. Η παρουσία των πηκτινικών ινών είναι ιδιαίτερα έντονη στα φύλλα του 3^{ου} έτους (εικόνα 20.α, β, γ, 25.α, β). Παρατηρήθηκαν επίσης κρύσταλλοι πιθανόν οξαλικού ασβεστίου κυρίως στα κύτταρα των επεκτάσεων των δεσμικών κολεών των κυττάρων ηλικίας

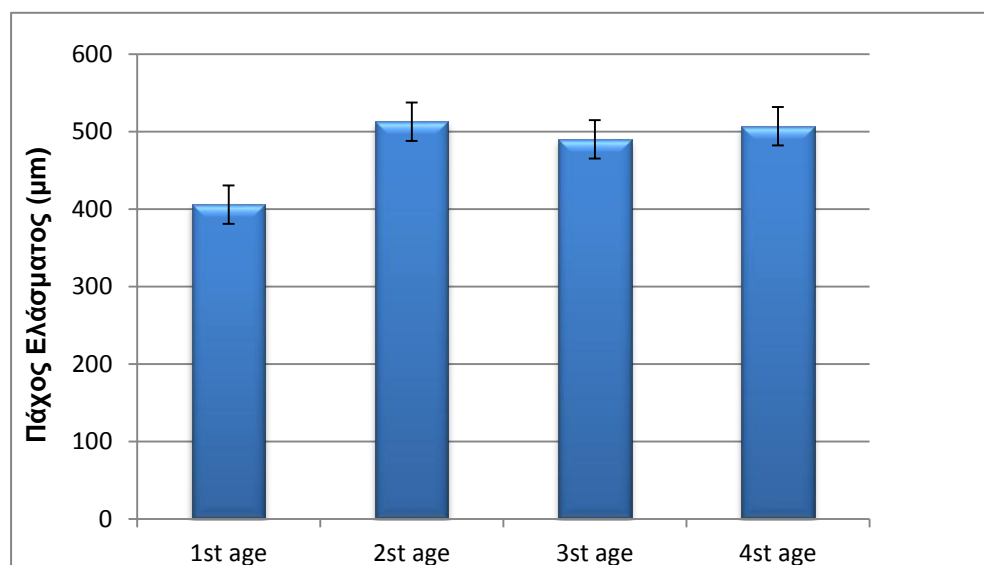
μεγαλύτερης του ενός έτους. Η παρατήρηση των κρυστάλλων έγινε κυρίως σε εφαιτομενικές τομές των φύλλων με το οπτικό μικροσκόπιο και με το ΗΜΣ (Εικόνα 18.α, β, 23.α, β).

Η αποαξονική επιδερμίδα είναι μονόστρωμη, πάχους 25-40 μm. Το πάχος των εξωτερικών κυτταρικών τοιχωμάτων των επιδερμικών κυττάρων είναι περίπου 6-8 μm και της εξωτερικής εφυμενίδας είναι 3-5 μm. Στην αποαξονική επιφάνεια η εσωτερική εφυμενίδα αποτελεί επέκταση της εφυμενίδας που καλύπτει τους υποστομάτιους χώρους. Στόματα παρατηρούνται στην αποαξονική επιφάνεια του φύλλου και είναι διακυτικού τύπου. Τα καταφρακτικά κύτταρα βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο με τα άλλα επιδερμικά ενώ όταν παρατηρούνται με το ΗΜΣ εμφανίζονται ως μικρές σχισμές της επιφάνειας του φύλλου και είναι σχεδόν καλυμμένα από τους επεφυμενιδικούς κηρούς (εικόνα 21.β, δ, 22.β).

Άλλα εξαρτήματα της επιδερμίδας αποτελούν οι μονοκύτταρες μη εκκριτικές τρίχες που βρίσκονται διάσπαρτες στην αποαξονική επιφάνεια. Οι τρίχες είναι αρκετά αραιά διαταγμένες με πυκνότητα περίπου 5 τρίχες/mm². Οι τρίχες αυτές είναι κυλινδρικές με οξύ άκρο και έχουν μήκος 135 μm και διάμετρο 10 μm και στα ώριμα φύλλα εμφανίζονται πάντα λυγισμένες με το αιχμηρό τους άκρο στραμμένο προς την αντίθετη πλευρά από το μίσχο (Εικόνες 22.α, β).

	1 ^ο Έτος	2 ^ο Έτος	3 ^ο Έτος	4 ^ο Έτος
Πάχος Ελάσματος	406	513	490	507
Πάχος Κυττάρων Πασσαλώδους Παρεγχύματος	169	223	226	221
Πάχος Κυττάρων Σπογγώδους Παρεγχύματος	142	156	157	191
Πάχος Προσαξονικής Επιδερμίδας	62	62	63	73
Πάχος Αποαξονικής Επιδερμίδας	25	25	41	29
Πάχος Προσαξονικής Εφυμενίδας	6	7	6	6
Πάχος Αποαξονικής Εφυμενίδας	4	5	3.5	3.5

Πίνακας 1: Μετρήσεις σε μm ανατομικών χαρακτηριστικών των φύλλων του φυτό



Εικόνα 4: Πάχος Ελάσματος του φύλλου στις 4 ηλικίες και τυπικό Σφάλμα

Πίνακας 1 : Συγκεντρωτικός Πίνακας Αποτελεσμάτων Ιστοχημικών Μεθόδων

Αντιδραστήριο	Υπόστρωμα Χρώμα	Αντίδραση Φύλλων 1 ^ο Έτους	Αντίδραση Φύλλων 2 ^ο Έτους	Αντίδραση Φύλλων 3 ^ο Έτους	Αντίδραση Φύλλων 4 ^ο Έτους
Potassium Dichromate	Φαινολικά Σκούρο καφέ	+	++	++	++
Τριχλωριούχο Αργίλιο	Φλαβονοειδή Πρασινοκίτρινος, κίτρινος, μπλε φθορισμός	+/-	+/-	+/-	+/-
Sudan IV	Λιπίδια, Κουτίνη, σουβερίνη Κόκκινο	+	+	+	+
Θεικός Σίδηρος	Ταννίνες Μαύρο	+	++	++	++
Φλωρογλυκίνη	Λιγνίνη Βυσσινί - κόκκινα - ροζ	-	-	-	-
Vanillin	Ταννίνες Έντονο κόκκινο	+	++	++	++
Nadi	Τερπενοειδή Μπλε	+	+	+	+
Ερυθρό του ρουθηνίου	Πολυσακχαρίτες Ροζ-κόκκινο	+/-	+/-	+/-	+/-

- ++ : Πολύ θετική Αντίδραση
- + : Θετική Αντίδραση
- +/- : Μερικώς Θετική Αντίδραση
- : Αρνητική Αντίδραση

6.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ

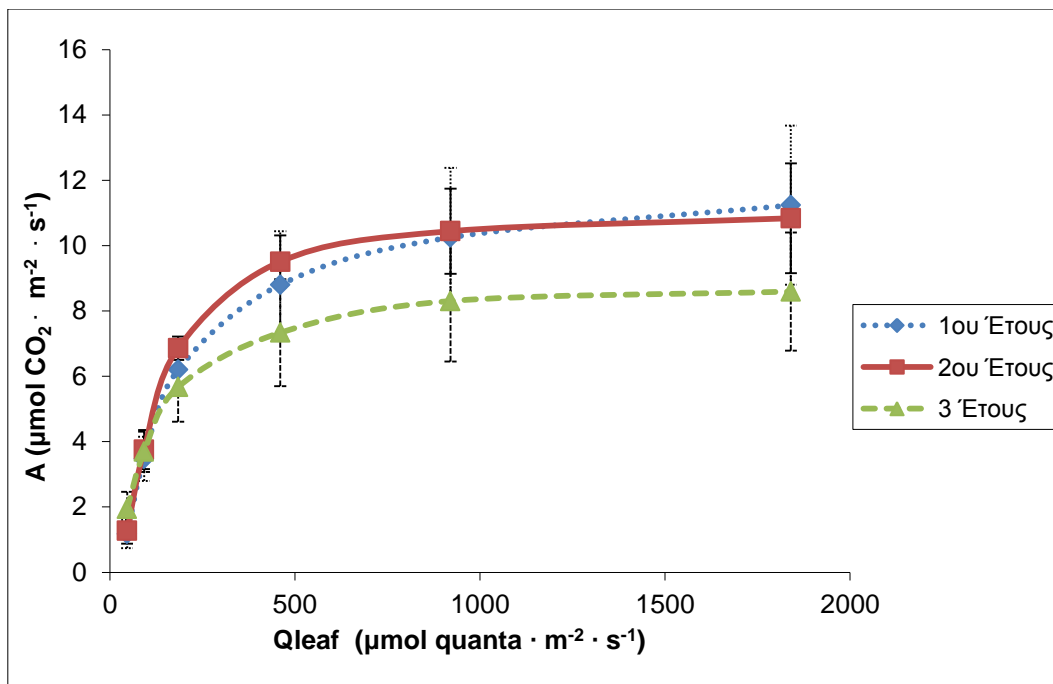
6.2.1 Ανταλλαγή Αερίων

Από τις καμπύλες απόκρισης της φωτοσυνθετικής ταχύτητας στην ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (Εικόνα 5) είναι φανερό πως τα φύλλα 1ης και 2ης ηλικίας πλεονεκτούν έναντι αυτών της 3ης ηλικίας όσον αφορά στη μέγιστη φωτοσυνθετική ταχύτητα (A_{max}). Τα φύλλα της 3ης ηλικίας παρουσιάζουν κατά 20% περίπου χαμηλότερη A_{max} με χαμηλότερο σημείο φωτοκορεσμού και χαμηλότερη φωτονιακή απόδοση (Φ_{CO_2}). Στην Εικόνα 6 παρουσιάζεται η απόκριση της ταχύτητας διαπνοής στην ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας όπου διαπιστώνεται μικρή διακύμανση αυξανόμενης της έντασης. Πρακτικά, η μέγιστη ταχύτητα διαπνοής που σημειώνεται στην μέγιστη ένταση ($1840 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), είναι παρόμοια ή λίγο χαμηλότερη αυτής που καταγράφεται στην αρχή της καμπύλης (στο σκοτάδι). Όσον αφορά στη σύγκριση μεταξύ των ηλικιών, τα φύλλα 2ης ηλικίας έχουν τις υψηλότερες τιμές ενώ αυτά της 3ης ηλικίας τις χαμηλότερες τιμές ταχύτητας διαπνοής (Εικόνα 6). Οι καμπύλες απόκρισης της στοματικής αγωγιμότητας στην ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (Εικόνα 7) εμφανίζουν αρκετά διαφορετική εικόνα από αυτές της ταχύτητας διαπνοής καθώς η στοματική αγωγιμότητα μειώνεται μέχρι τα $500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ περίπου ενώ παραμένει σταθερή στις υψηλότερες εντάσεις. Όσον αφορά στη σύγκριση μεταξύ των ηλικιών, τα φύλλα 2ης ηλικίας έχουν τις υψηλότερες τιμές ενώ αυτά της 3ης ηλικίας τις χαμηλότερες τιμές στοματικής αγωγιμότητας (Εικόνα 7). Η συσχέτιση μεταξύ φωτοσυνθετικής ταχύτητας και διαπνοής ή στοματικής αγωγιμότητας (Εικόνες 8, 9) αποκαλύπτει το παράδοξο σύμφωνα με το οποίο, σε αντίθεση με τα συνήθως παρατηρούμενα στα φαινόμενα ανταλλαγής αερίων των φύλλων των περισσότερων φυτικών ειδών, οι δύο παράμετροι συσχετίζονται αρνητικά. Δηλαδή, υψηλότερες τιμές φωτοσυνθετικής ταχύτητας συνδέονται με χαμηλότερες ταχύτητες διαπνοής ή

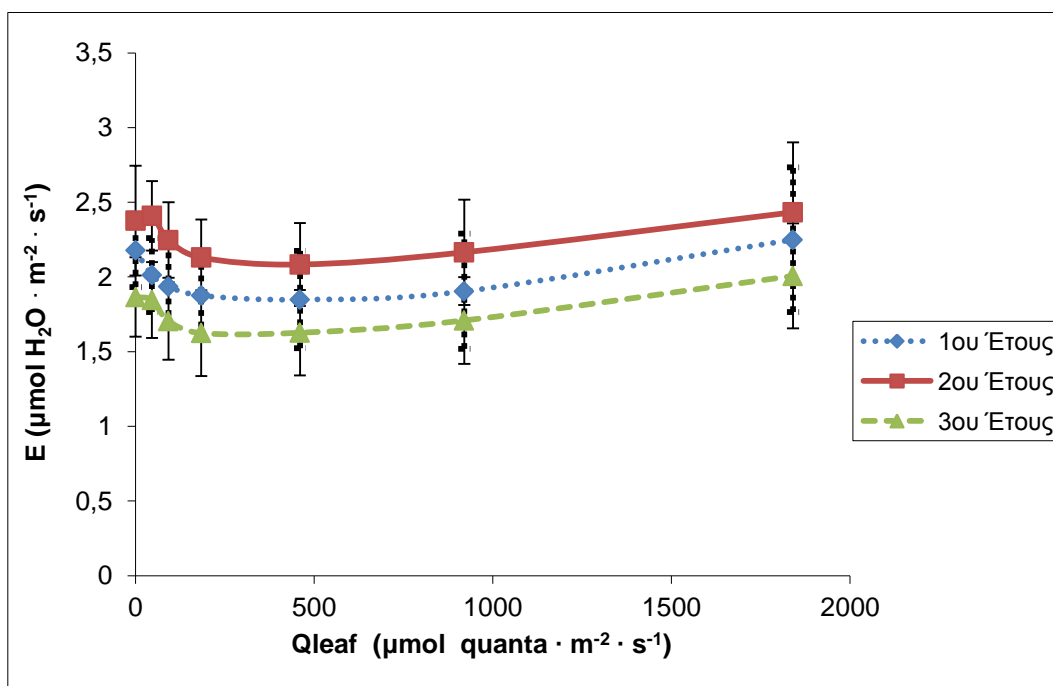
χαμηλότερες τιμές στοματικής αγωγιμότητας για όλες τις ηλικιακές κατηγορίες φύλλων.

6.2.2 Φθορισμός χλωροφύλλης

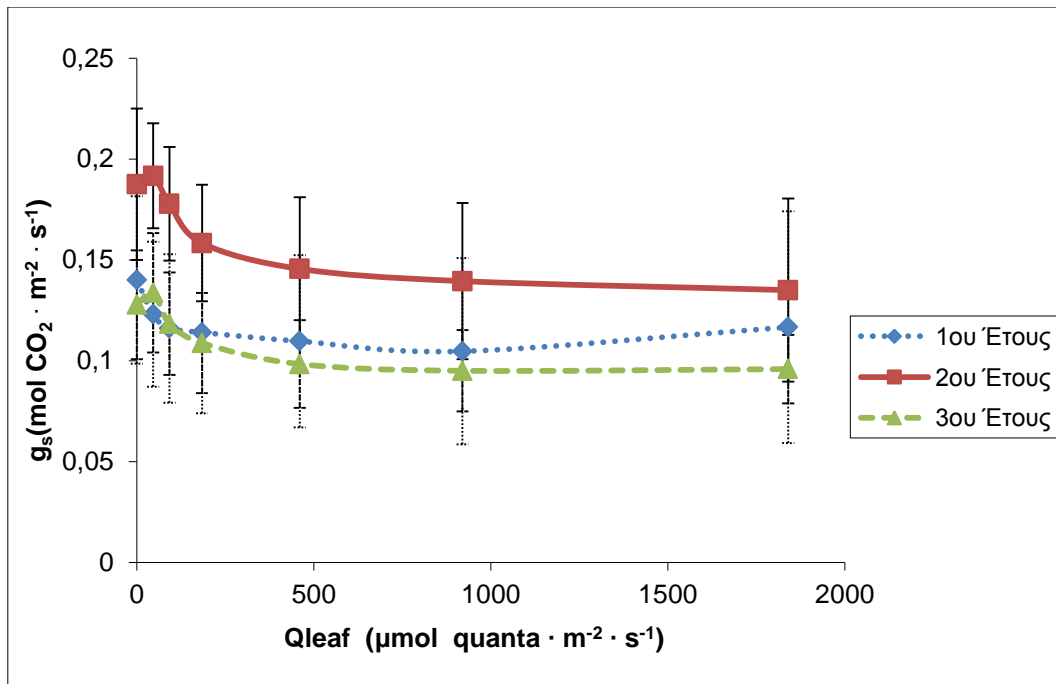
Από τη μελέτη των παραμέτρων της φωτοχημείας του PSII, διαπιστώθηκε ότι τα φύλλα 1ης και 2ης ηλικίας εμφανίζουν υψηλότερες τιμές ρυθμού ροής ηλεκτρονίων στη φωτοχημική αλυσίδα (ETR, Εικόνα 10) γεγονός το οποίο συμφωνεί γενικά με τις παρατηρούμενες τιμές της φωτοσυνθετικής ταχύτητας (εικόνα 2). Ωστόσο, τα φύλλα της 2ης ηλικίας εμφανίζουν ακόμα υψηλότερες τιμές συγκριτικά με τα φύλλα της 1ης ηλικίας γεγονός το οποίο δεν αποτυπώνεται στις μετρήσεις φωτοσύνθεσης. Παρόμοια είναι η εικόνα όταν εξετάζεται η απόκριση της λειτουργικής φωτονιακής απόδοσης στην ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (Εικόνα 11). Η εικόνα 12 παρουσιάζει την απόκριση της μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης (q_N) στην ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Φαίνεται πως τα φύλλα της 3ης ηλικίας εμφανίζουν υψηλότερες τιμές q_N ακόμα και στις πολύ χαμηλές εντάσεις γεγονός το οποίο υποδηλώνει μεγάλο ποσοστό πλεονάζουσας ενέργειας στα φύλλα αυτά. Οι υψηλές τιμές q_N σχετίζονται με αυξημένη ικανότητα μη-φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας διέγερσης αλλά και με αυξημένο ρίσκο φωτοπαραεμπόδισης και συμφωνούν με τις μετρήσεις φωτοσύνθεσης στις οποίες τα φύλλα αυτά εμφανίζουν τις χαμηλότερες τιμές (Εικόνα 5). Τέλος, η απόκριση της φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης (Εικόνα 13) δείχνει υψηλό ποσοστό κλειστών φωτοχημικών κέντρων ακόμα και στις χαμηλές εντάσεις ακτινοβολίας το οποίο ενδεχομένως σχετίζεται με εγκλιματισμό των φύλλων σε χαμηλά επίπεδα προσπίπτουσας ακτινοβολίας.



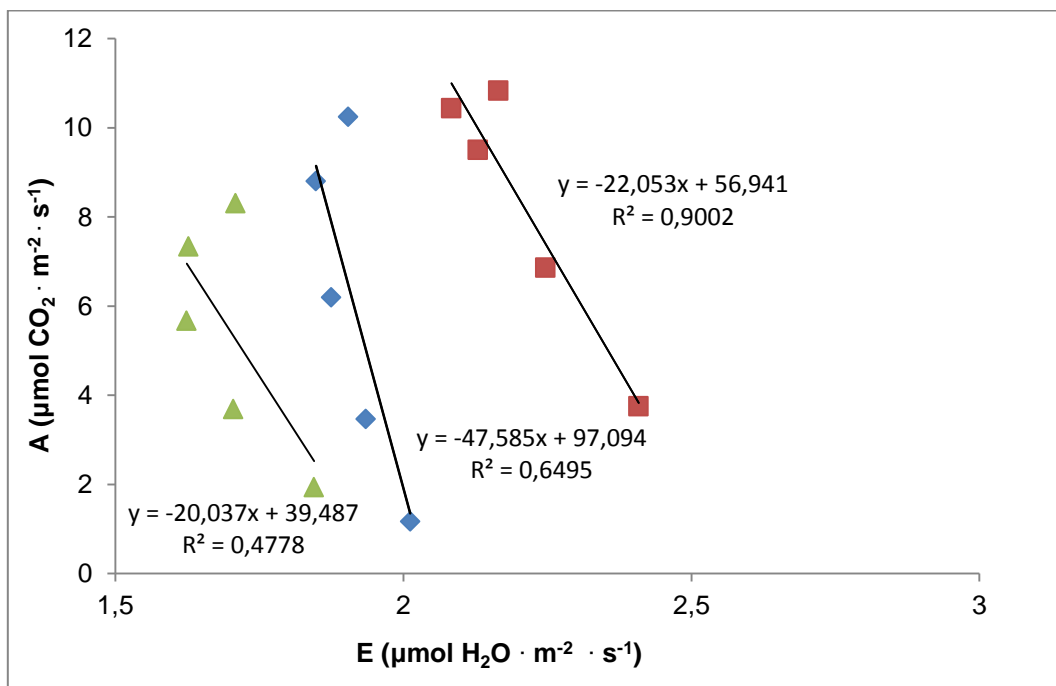
Εικόνα 5: Καμπύλη φωτοσύνθεσης (A) συναρτήσει της Q_{leaf} σε φύλλα 3^{ης} ηλικίας. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι 5 επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα.



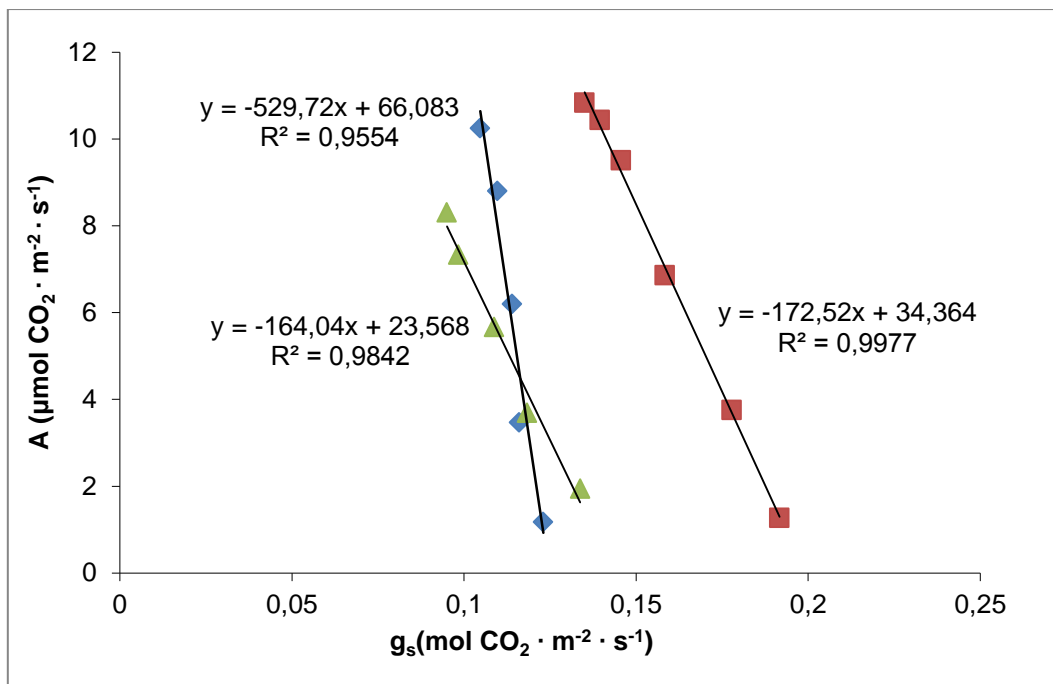
Εικόνα 6: Καμπύλη διαπνοής (E) συναρτήσει της Q_{leaf} σε φύλλα 3^{ης} ηλικίας. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι 5 επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα.



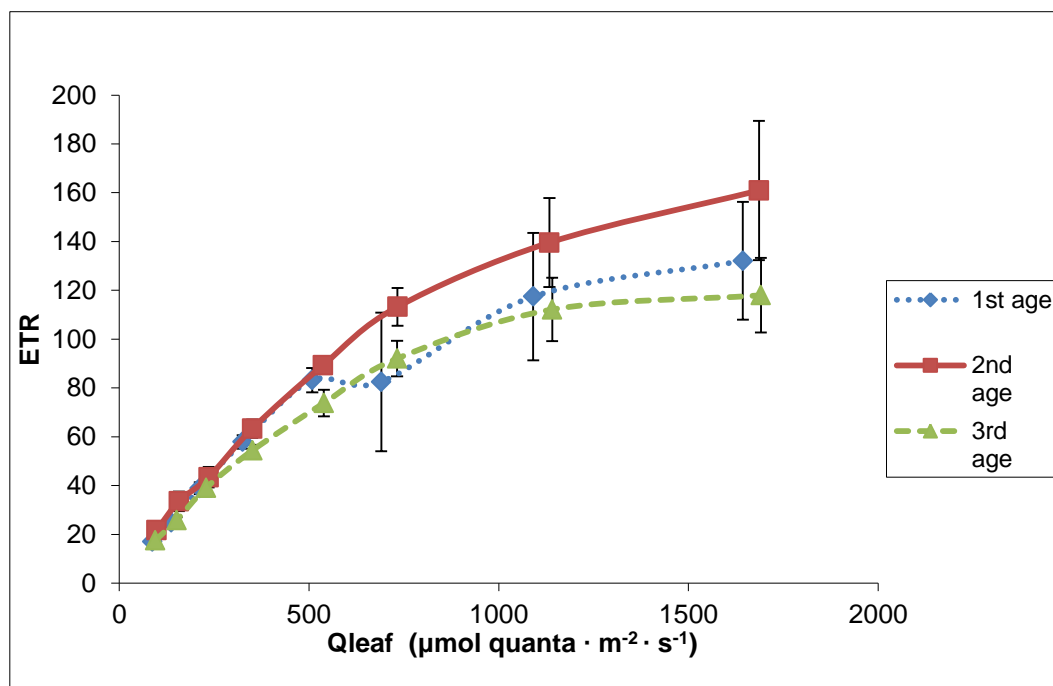
Εικόνα 7: Καμπύλη στοματικής αγωγιμότητας στο CO_2 συναρτήσει της Q_{leaf} σε φύλλα 3^{ης} ηλικίας. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι 5 επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα.



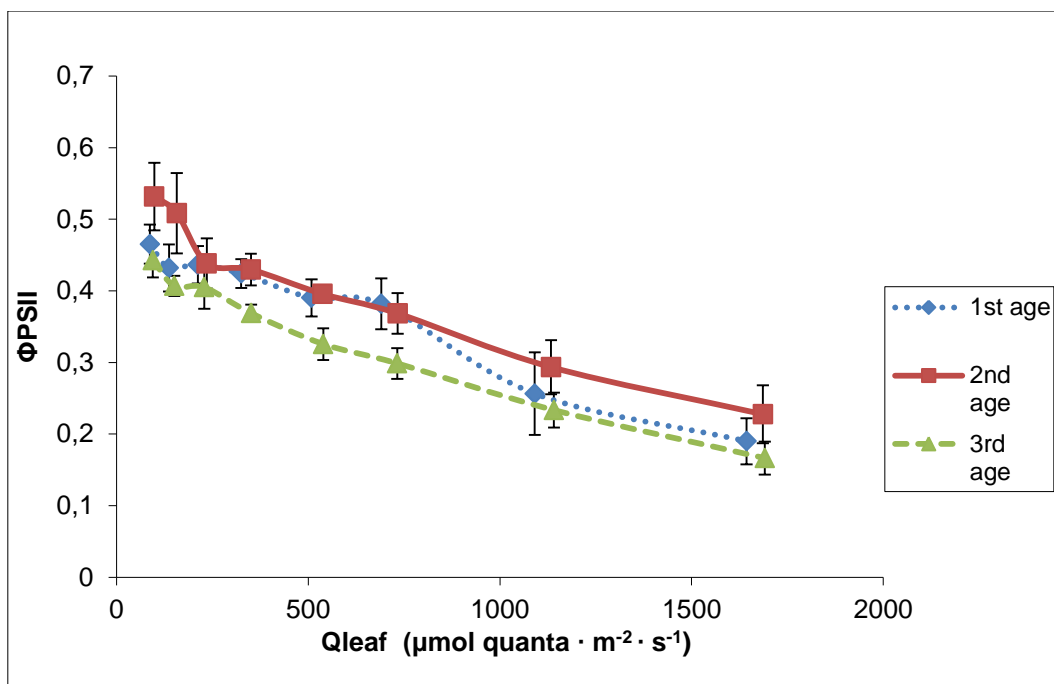
Εικόνα 8: Συσχέτιση φωτοσύνθεσης (A) και διαπνοής (E) για τα φύλλα 3^{ης} ηλικίας. Εμφανίζεται η εξίσωση που περιγράφει τη σχέση και ο συντελεστής συσχέτισης R^2 .



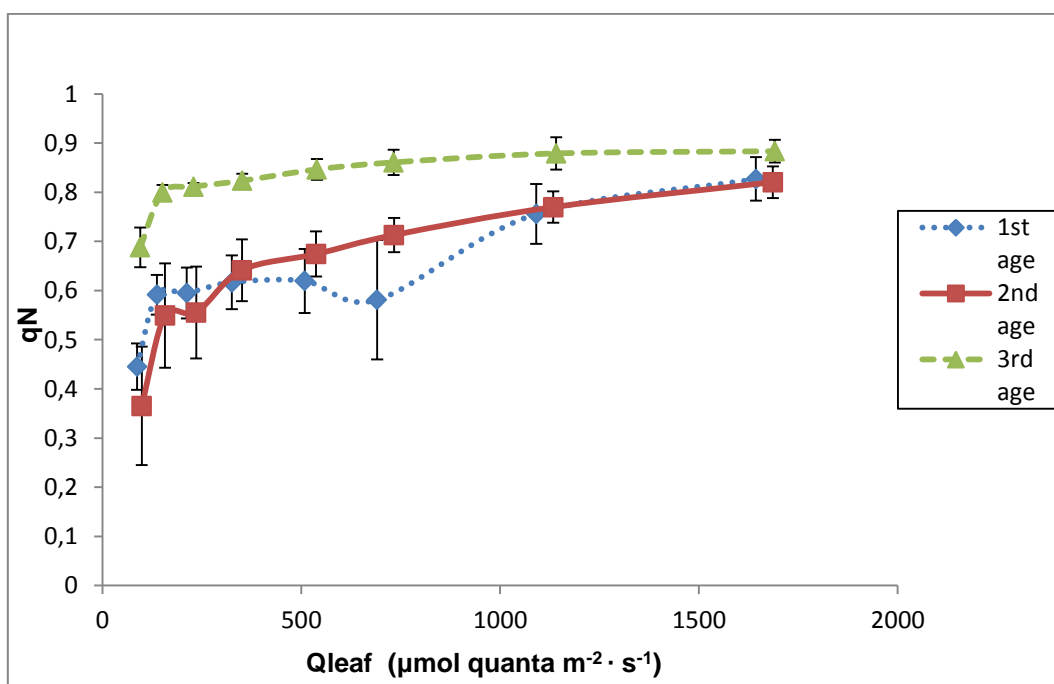
Εικόνα 9: Συσχέτιση φωτοσύνθεσης (A) και στοματικής αγωγιμότητας (g_s) για τα φύλλα 3^{ης} ηλικίας. Εμφανίζεται η εξίσωση που περιγράφει τη σχέση και ο συντελεστής συσχέτισης R².



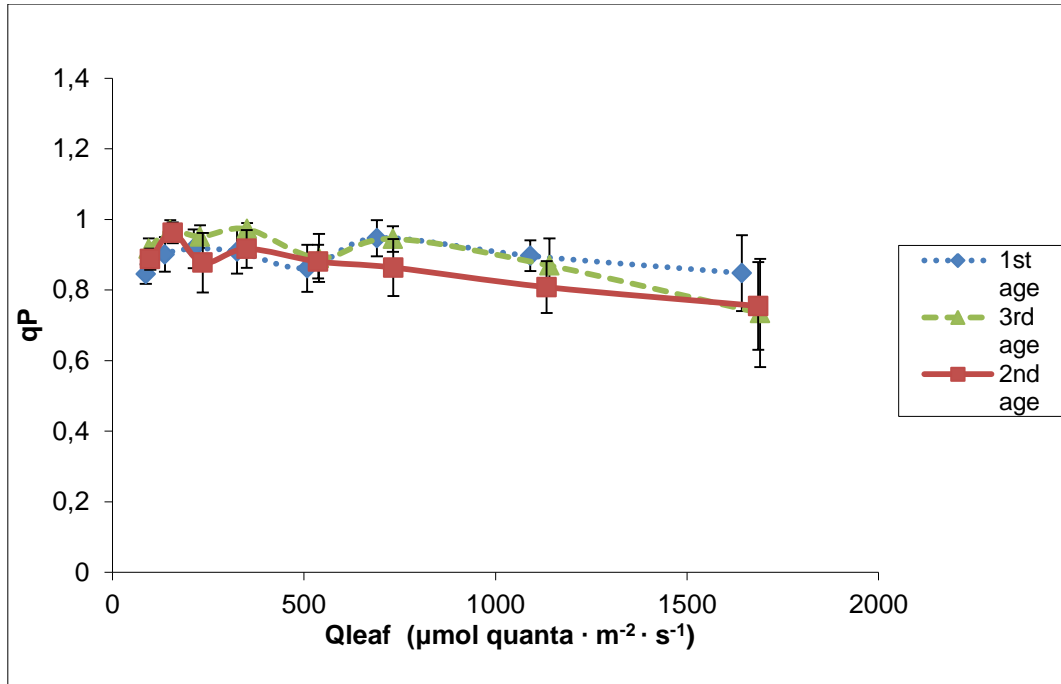
Εικόνα 10: Καμπύλη φαινόμενου ρυθμού ροής ηλεκτρονίων (ETR) συναρτήσει της Qleaf σε φύλλα 3^{ης} ηλικίας. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι 5 επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα.



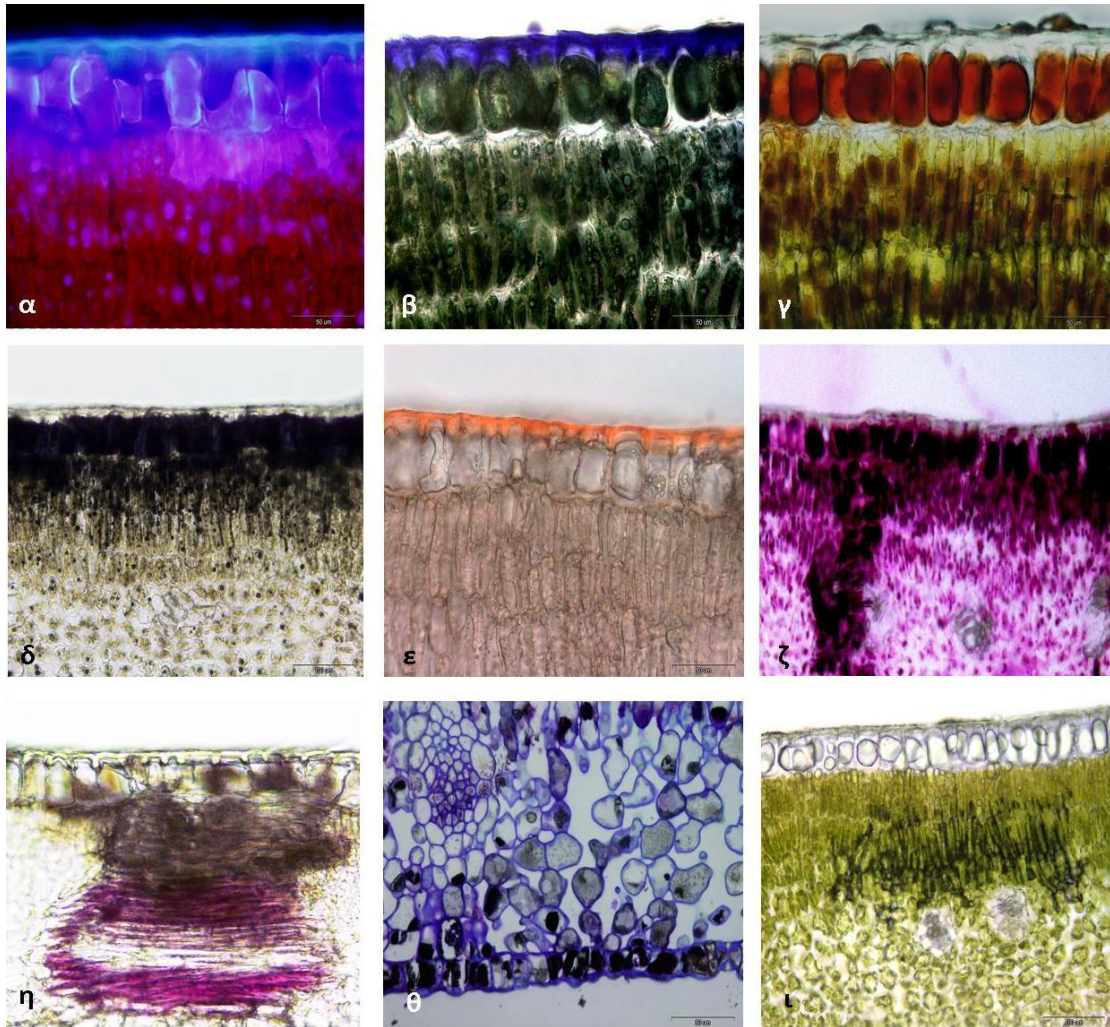
Εικόνα 11: Καμπύλη λειτουργικής φωτονιακής απόδοσης του PS II (Φ_{PSII}) και τυπικά σφάλματα των μετρήσεων συναρτήσει της Q_{leaf} σε φύλλα 3^{ης} ηλικίας. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι 5 επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα.



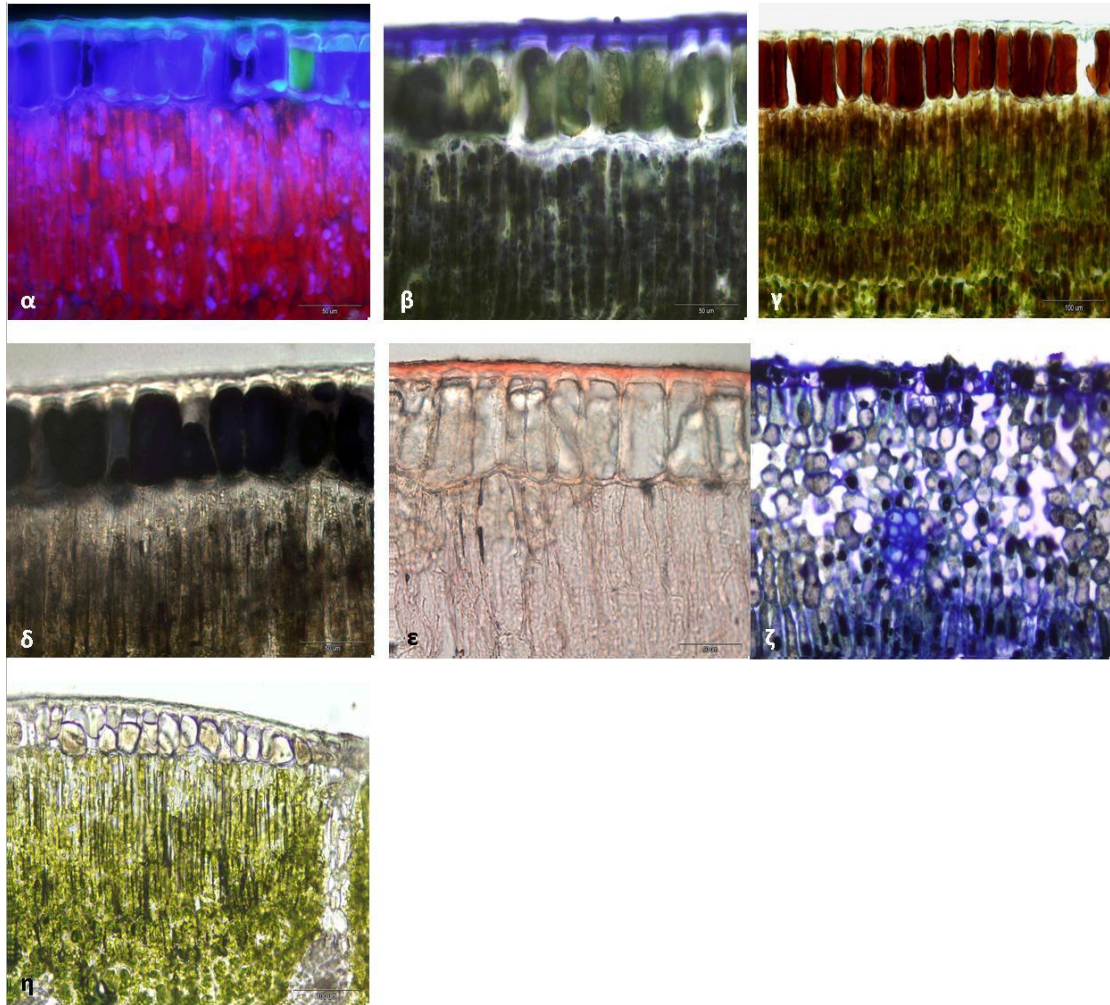
Εικόνα 12: Καμπύλη συντελεστή μη φωτοχημικής απόσβεσης (q_N) συναρτήσει της Q_{leaf} και τυπικά σφάλματα των μετρήσεων σε φύλλα 3^{ης} ηλικίας. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι 5 επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα.



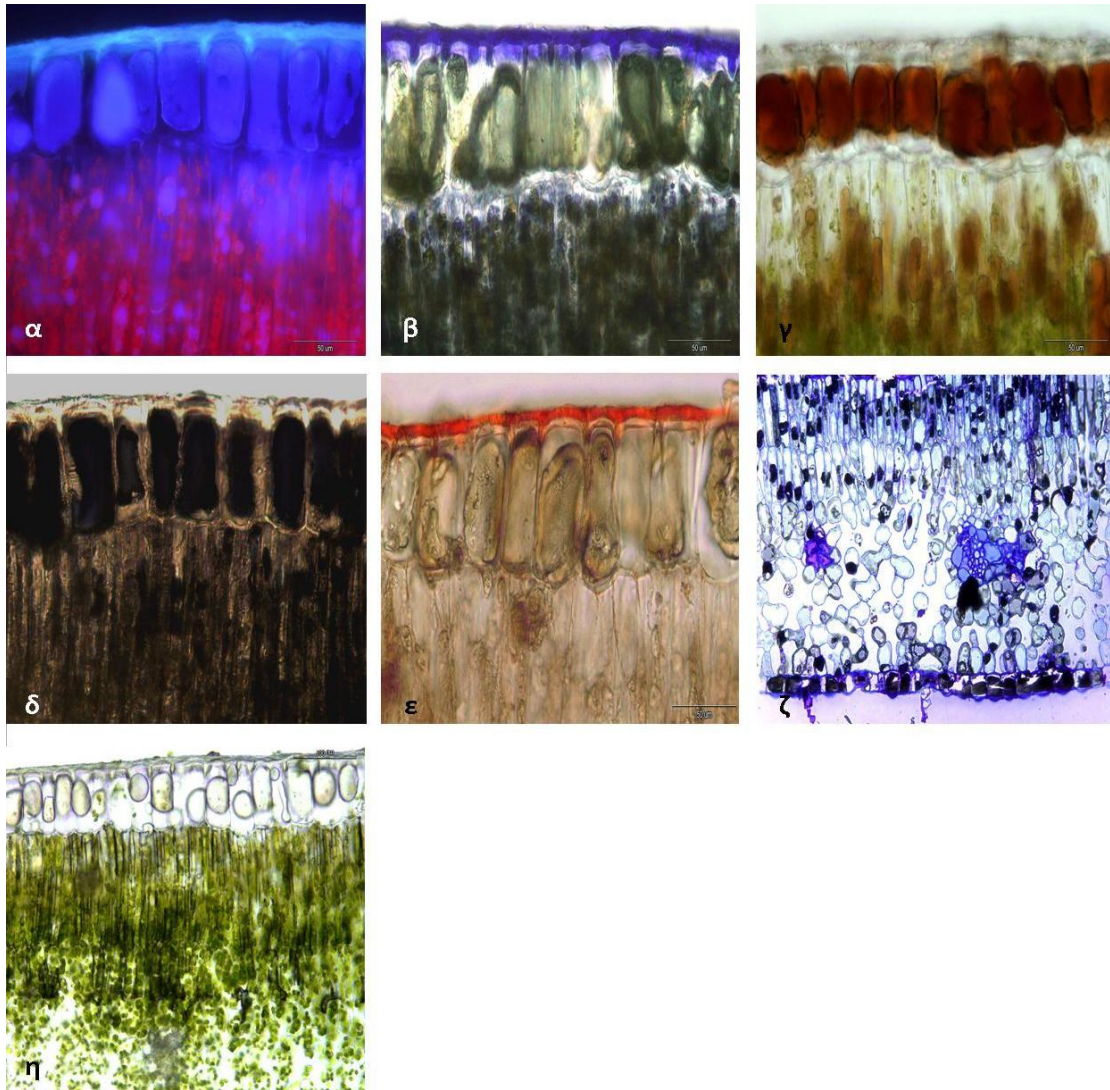
Εικόνα 13: Καμπύλη συντελεστή φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού (qP) συναρτήσει της Q_{leaf} σε φύλλα 3ης ηλικίας. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι 5 επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα.



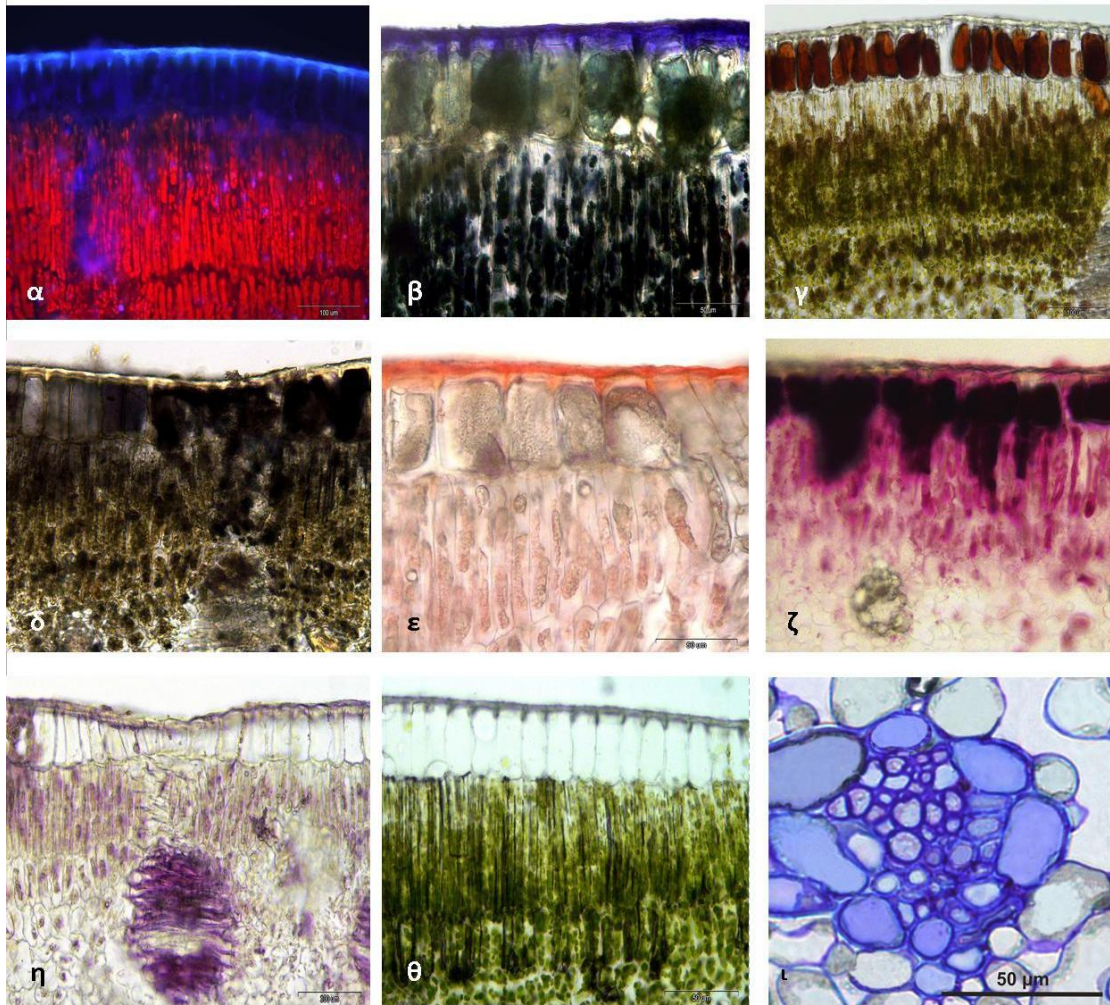
Εικόνα 14: Φωτογραφία εγκάρσιας τομής φύλλου 1^{ου} έτους στο Ο.Μ, **α.** Χρώση με $AlCl_3$ και παρατήρηση σε UV **β.** Χρώση με Nadi **γ.** Χρώση με Potassium Dichromate **δ.** Χρώση με $FeSO_4$ **ε.** Χρώση με Sudan **ζ.** Χρώση με Vanillin **η.** Χρώση με Phloroglucinol **θ.** Χρώση με Toluidine Blue σε μονιμοποιημένο δείγμα **ι.** Νωπό δείγμα.



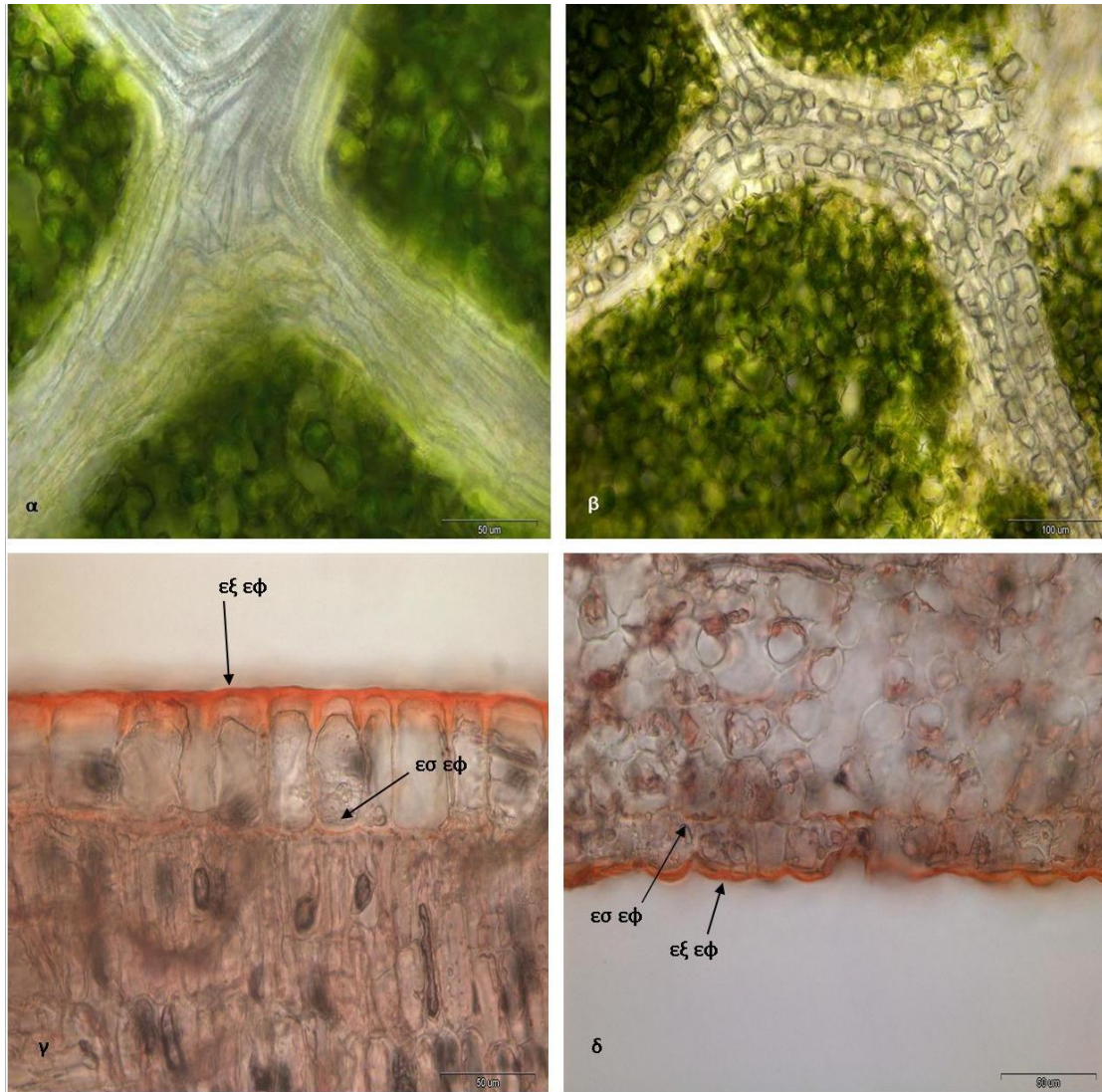
Εικόνα 15: Φωτογραφία εγκάρσιας τομής φύλλου 2ου έτους στο Ο.Μ, α. Χρώση με $AlCl_3$ και παρατήρηση σε UV β. Χρώση με Nadi γ. Χρώση με Potassium Dichromate δ. Χρώση με $FeSO_4$ ε. Χρώση με Sudan ζ. Χρώση με Toluidine Blue σε μονιμοποιημένο δείγμα η. Νωπό δείγμα.



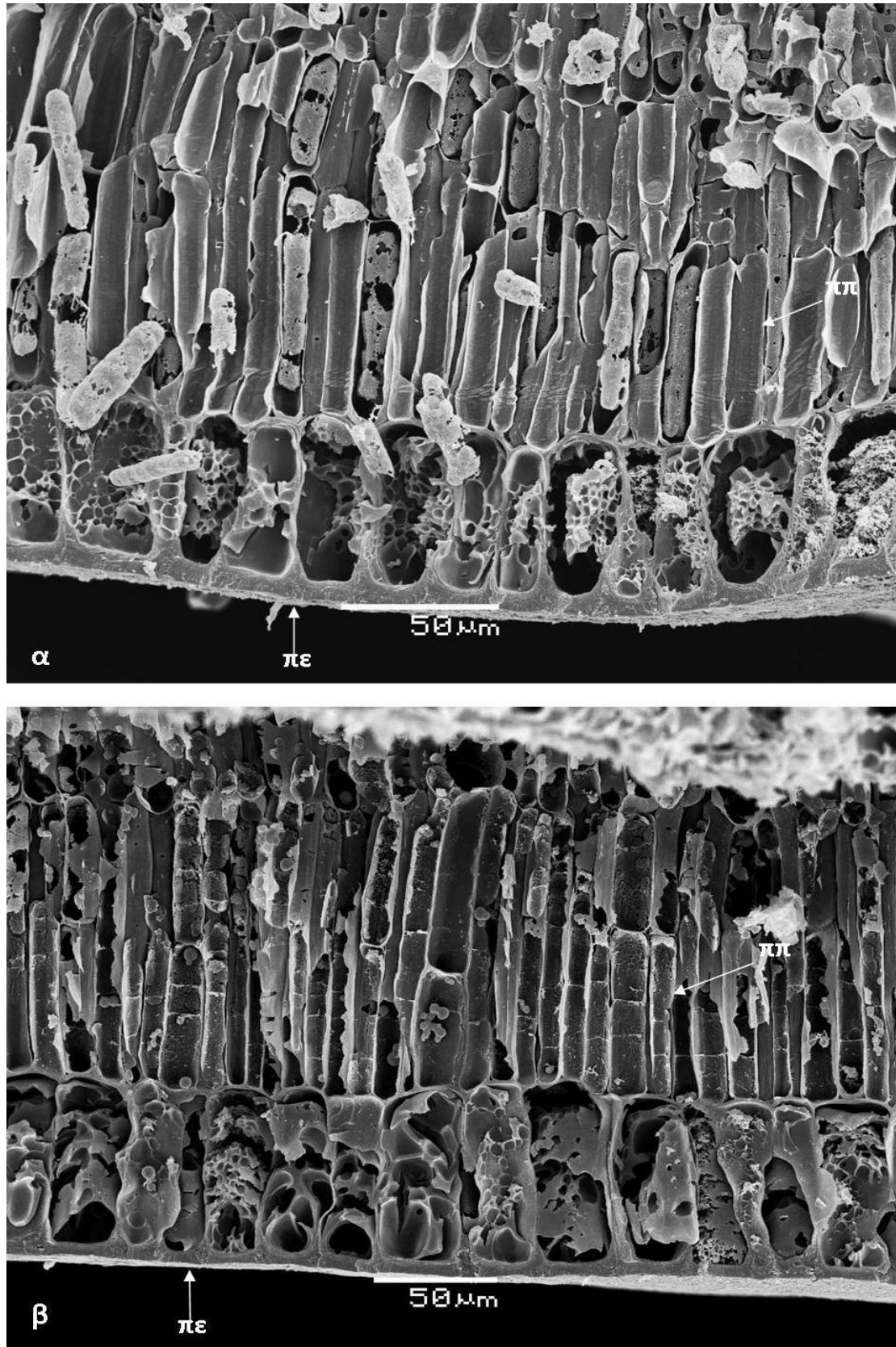
Εικόνα 16: Φωτογραφία εγκάρσιας τομής φύλλου 3ου έτους στο Ο.Μ, α. Χρώση με AlCl₃ και παρατήρηση σε UV β. Χρώση με Nadi γ. Χρώση με Potassium Dichromate δ. Χρώση με FeSO₄ ε. Χρώση με Sudan ζ. Χρώση με Toluidine Blue σε μονιμοποιημένο δείγμα η. Νωπό δείγμα.



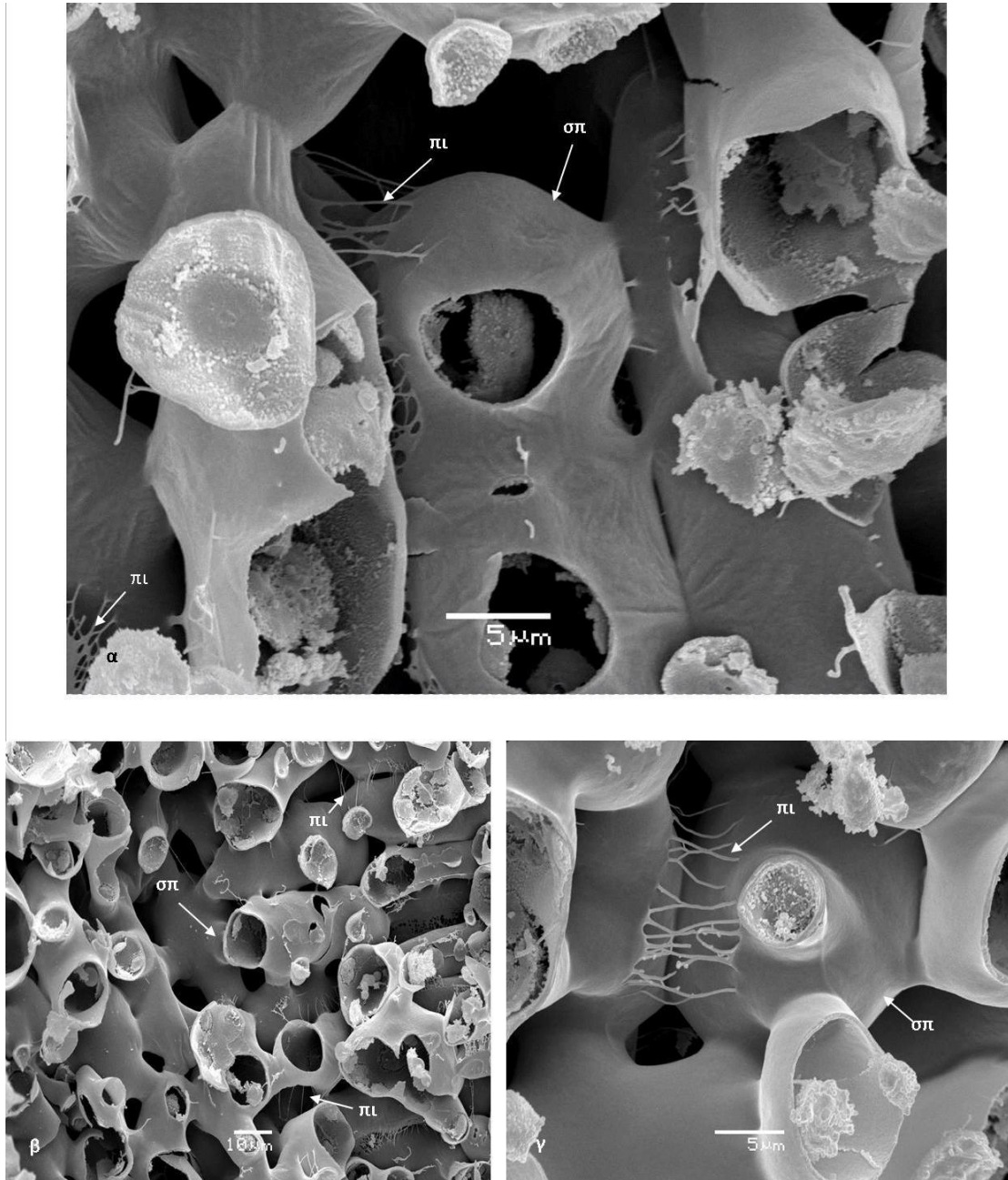
Εικόνα 17: Εγκάρσια τομή φύλλου 4^{ου} έτους στο Ο.Μ, **α.** Χρώση με $AlCl_3$ και παρατήρηση σε UV **β.** Χρώση με Nadi **γ.** Χρώση με Potassium Dichromate **δ.** Χρώση με $FeSO_4$ **ε.** Χρώση με Sudan **ζ.** Χρώση με Vanillin **η.** Χρώση με Phloroglucinol **θ.** Νωπό δείγμα **ι.** Χρώση με Toluidine Blue σε μονιμοποιημένο δείγμα, τα ξυλώδη αγγεία σε μεγέθυνση.



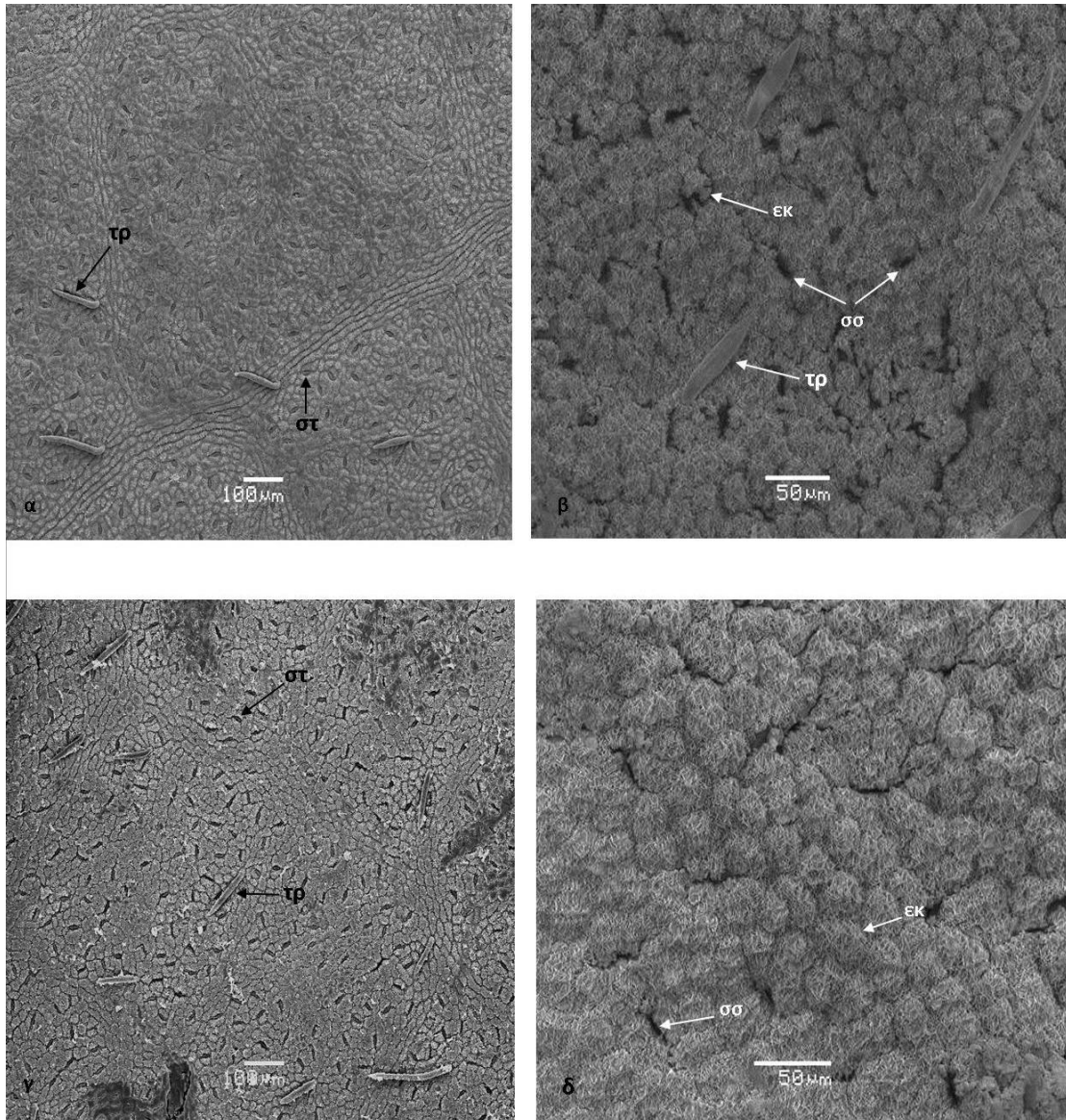
Εικόνα 18: Εφαπτομενικές τομές στις οποίες απεικονίζονται τα κύτταρα του δεσμικού κολεού καλοκαιρινών φύλλων, **α**. Σε φύλλα 1^{ου} έτους χωρίς κρυσταλλικά έγκλειστα **β**. Σε φύλλα 4^{ου} έτους με κρυστάλλους σε όλα τα κύτταρα του δεσμικού κολεού. Εγκάρσιες τομές φύλλου 1^{ου} έτους μετά από χρώση με Sudan, η εξωτερική και η εσωτερική στρώση της εφυμενίδας **γ**. Στην προσαξονική επιφάνεια **δ**. Στην αποαξονική επιφάνεια.



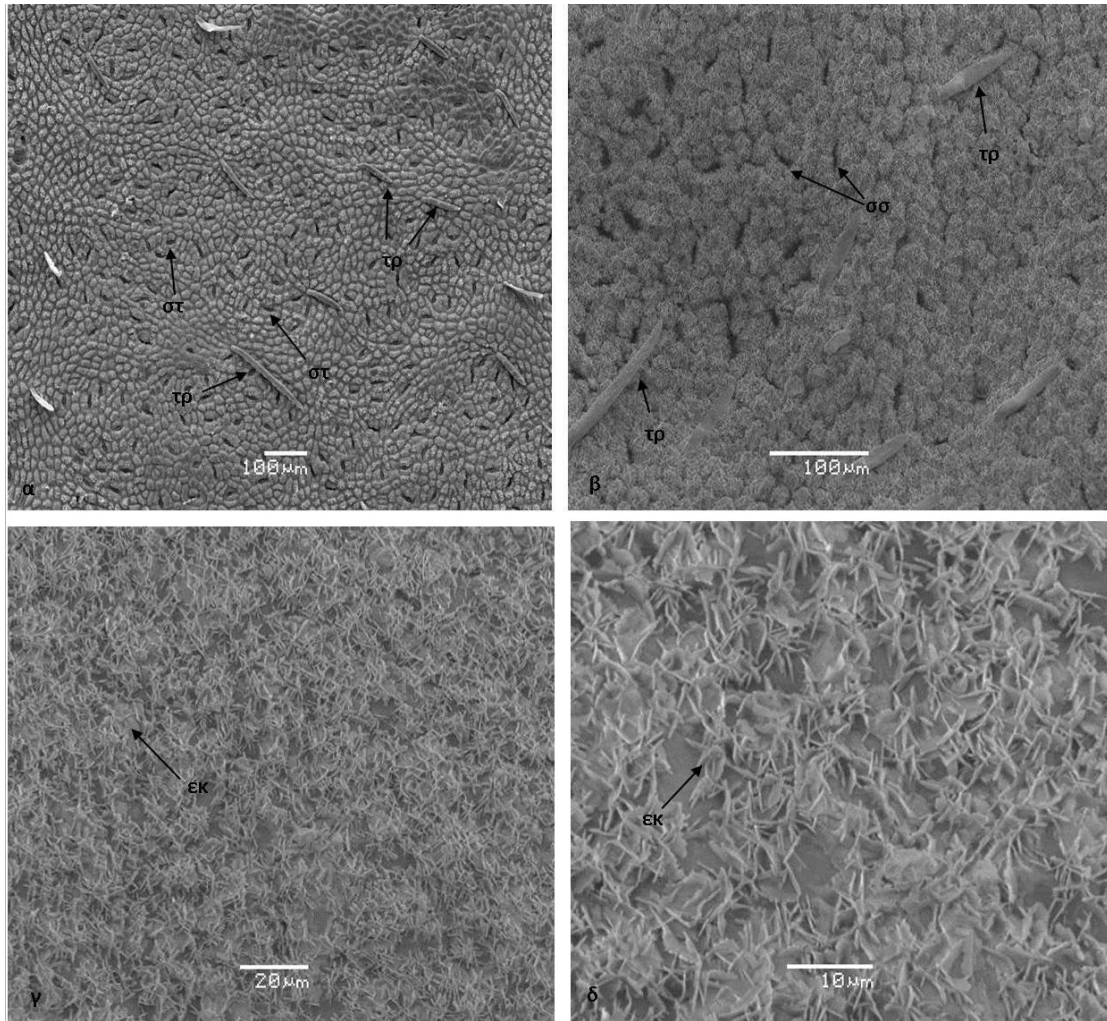
Εικόνα 19: Η προσαξονική επιφάνεια (πε), τα κίτταρα του πασσαλώδους παρεγχύματος και η συγκέντρωση των ταννινών (ταν) στα επιδερμικά κίτταρα, α. Σε φύλλα 1^{οο} έτους σε ΗΜΣ β. Σε φύλλα 3^{οο} έτους, σε ΗΜΣ.



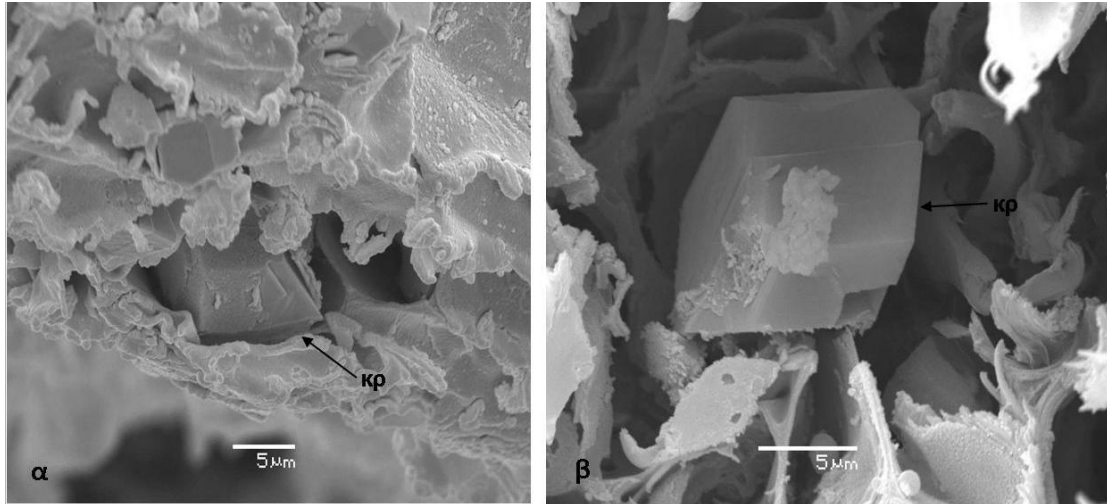
Εικόνα 20: Κύτταρα σπογγώδους παρέγχυμα (σπ) και οι πηκτινικές ίνες (πι) μεταξύ αυτών, α. Σε φύλλα 1^ο έτους, ορατά σε μεγάλη μεγέθυνση, σε ΗΜΣ β. Σε φύλλα 3^ο έτους, σε ΗΜΣ γ. Σε φύλλα 5^ο έτους, ορατά σε μεγάλη μεγέθυνση, σε ΗΜΣ.



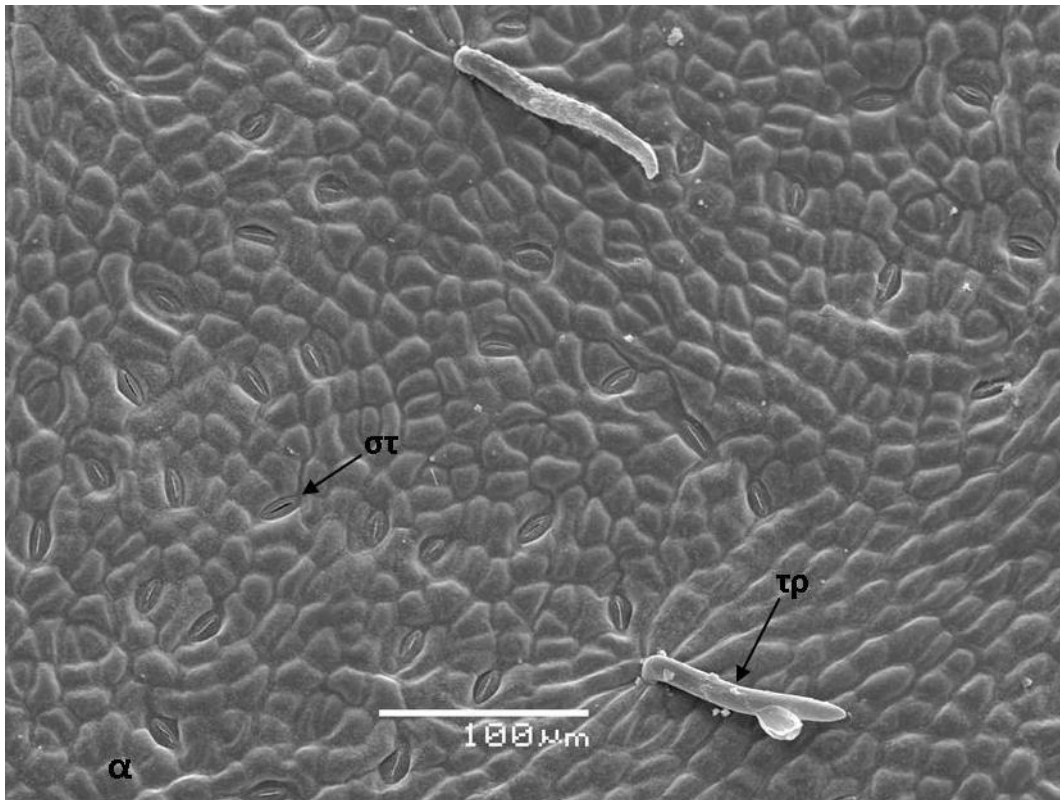
Εικόνα 21: Η αποαξονική επιφάνεια, οι τρίχες (τρ) και τα στόματα (στ), **α.** Σε φύλλα 1^{οο} έτους σε ΗΜΣ **γ.** Σε φύλλα 3^{οο} έτους, σε ΗΜΣ. Η αποαξονική επιφάνεια, οι τρίχες (τρ), οι σχισμές των στομάτων (σσ) και οι επεφυρμενιδικοί κηροί (εκ) που την καλύπτουν, **β.** Σε νωπά φύλλα 1^{οο} έτους, σε ΗΜΣ **δ.** Σε νωπά φύλλα 3^{οο} έτους, σε ΗΜΣ.



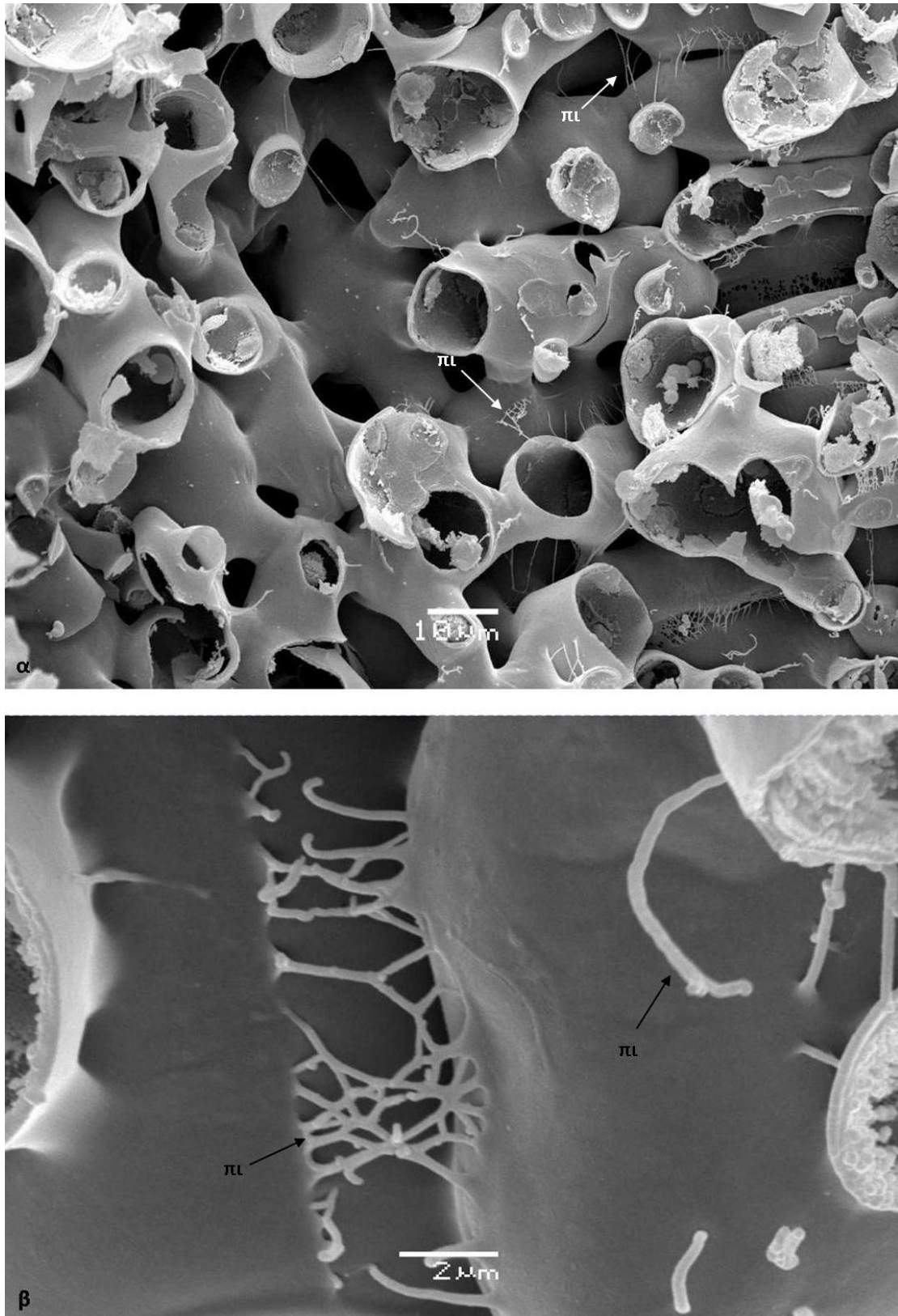
Εικόνα 22: Η αποαξονική επιφάνεια, τα στόματα (στ) και οι τρίχες (τρ), **α.** Σε φύλλα 2^ο έτους, σε ΗΜΣ **β.** Σε νωπά φύλλα 2ου έτους και οι επεφυμενιδικοί κηροί (εκ) που την καλύπτουν, σε ΗΜΣ. Η προσαξονική επιφάνεια και οι επεφυμενιδικοί κηροί (εκ) που την καλύπτουν, **γ.** Σε νωπά φύλλα 2^ο έτους, σε ΗΜΣ **δ.** Σε νωπά φύλλα 2^ο έτους, σε ΗΜΣ.



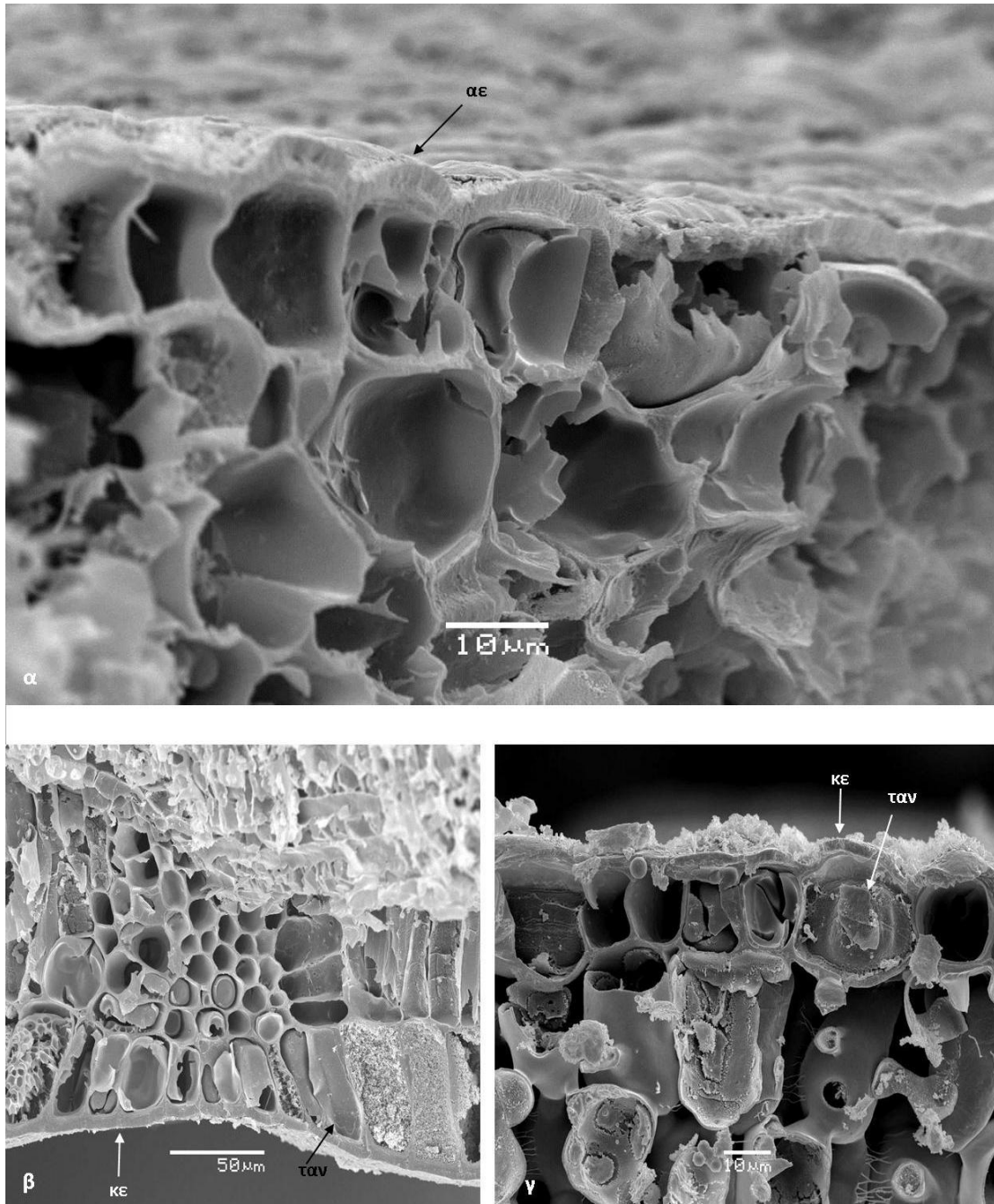
Εικόνα 23: Κρύσταλλος στα κύτταρα των επεκτάσεων των δεσμικών κολεών, **α.** Σε φύλλα 2^{ου} έτους, σε ΗΜΣ **β.** Σε φύλλα 3^{ου} έτους, σε ΗΜΣ.



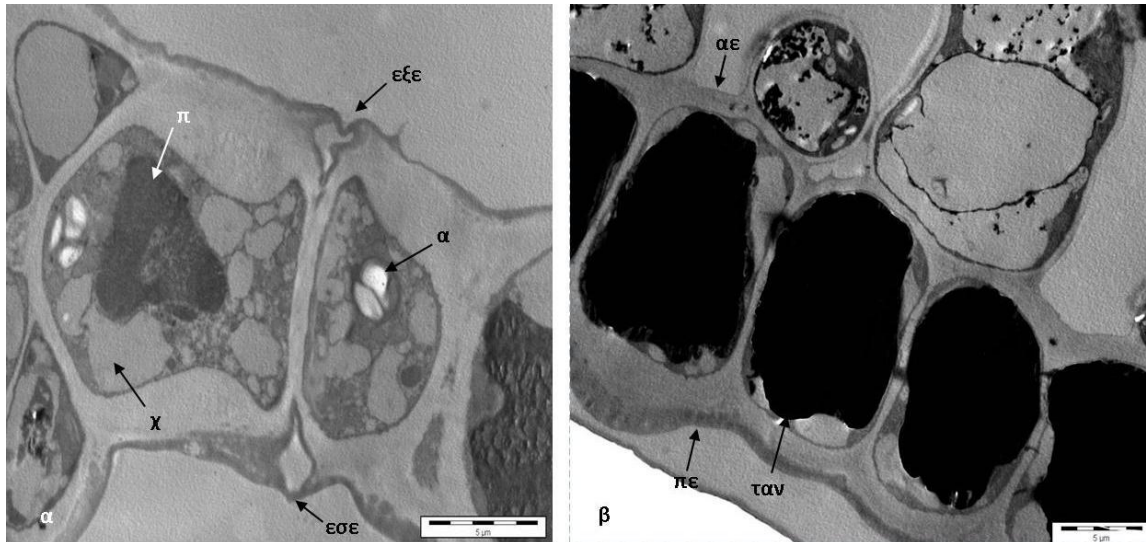
Εικόνα 24: α. Η αποαξονική επιφάνεια φύλλου 4ου έτους, οι τρίχες (τρ) και τα στόματα (στ), σε ΗΜΣ.



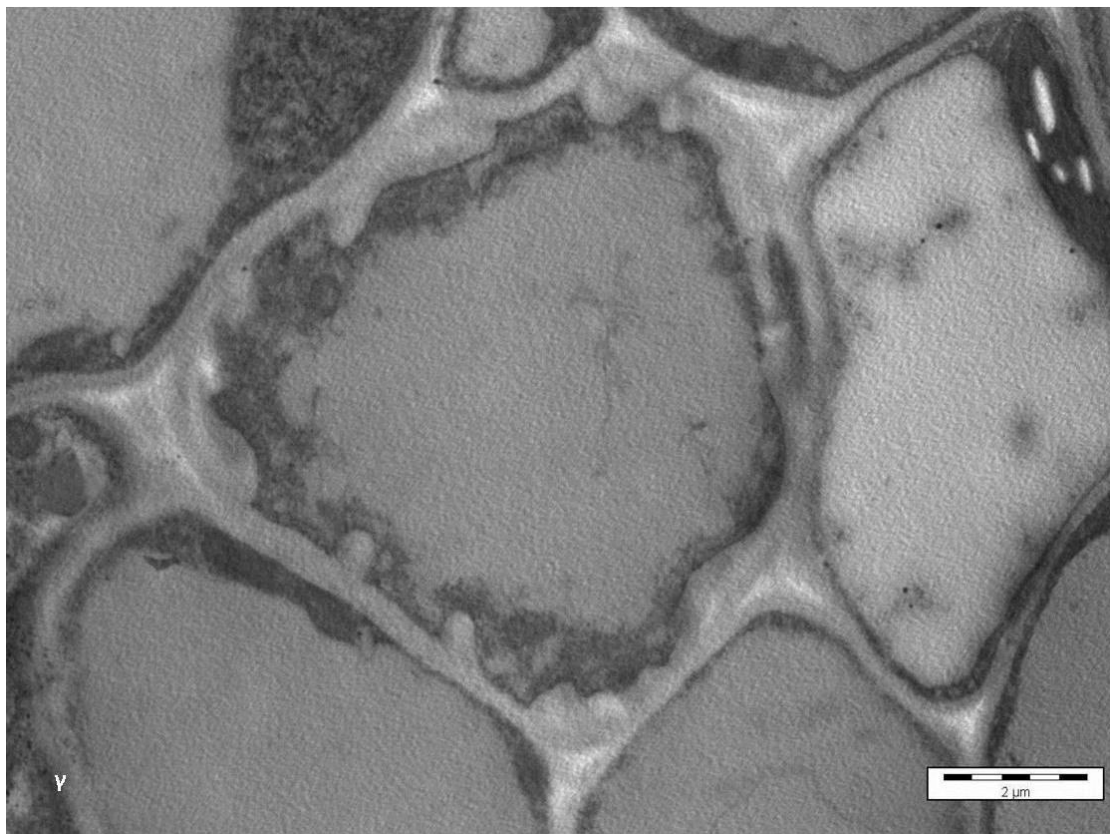
Εικόνα 25: α. Κότταρα σπογγώδους παρεγχύματος και οι πηκτινικές ίνες (πι) που παρεμβάλλονται μεταξύ των κοττάρων, σε φύλλα 3^{ου} έτους, σε ΗΜΣ. β. Πηκτινικές ίνες (πι) μεταξύ των κοττάρων του σπογγώδους παρεγχύματος σε φύλλα 3^{ου} έτους, σε ΗΜΣ.

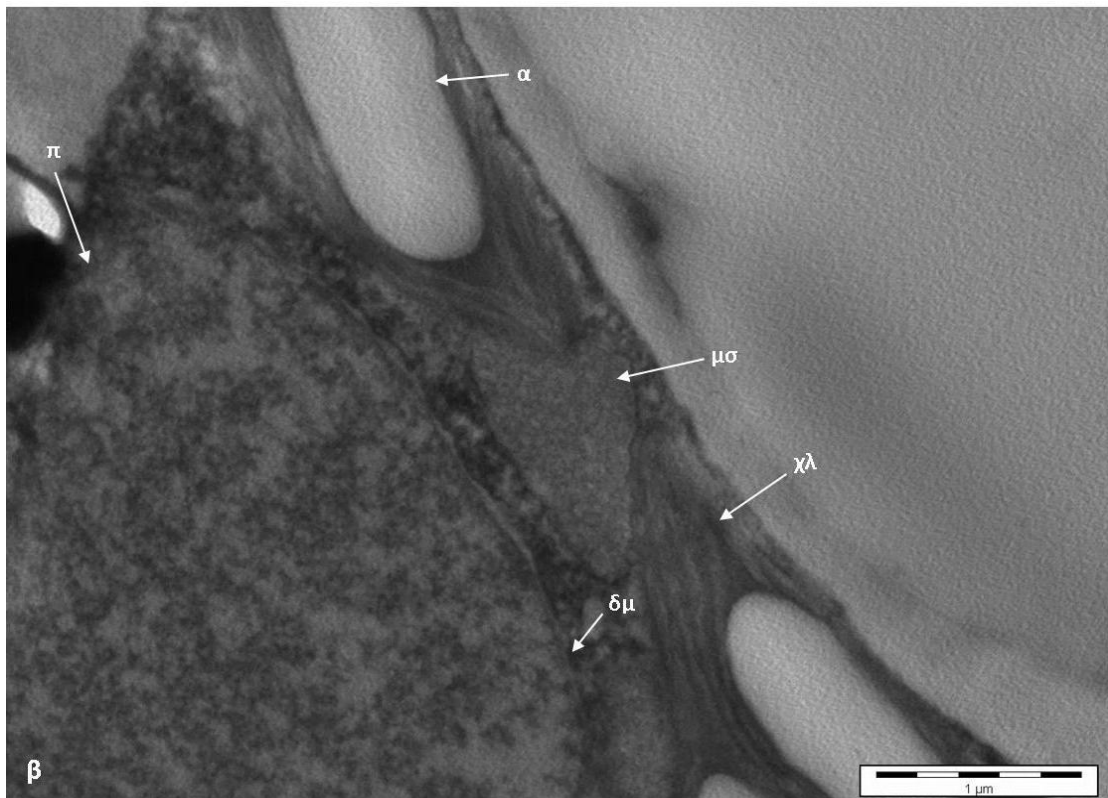
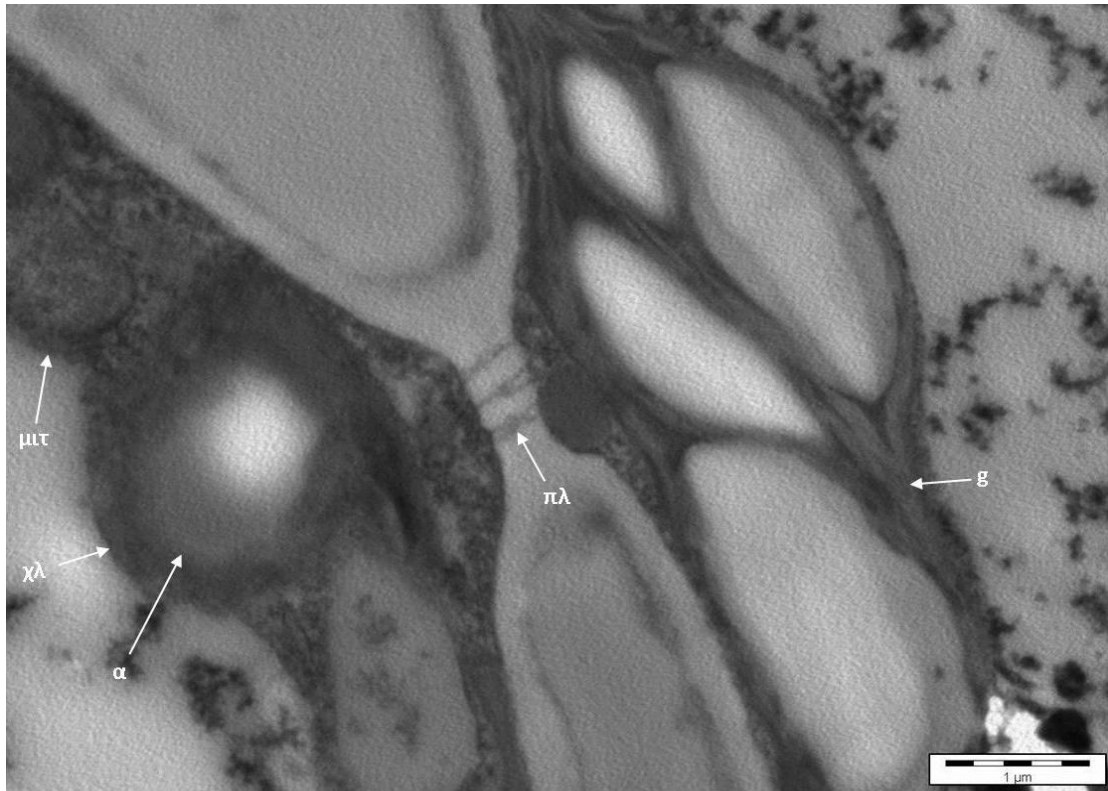


Εικόνα 26: α. Επιδερμικά κύτταρα αποαξονικής επιφάνειας σε φύλλα 1^{ου} έτους σε ΗΜΣ. β. Επιδερμικά κύτταρα επάνω επιφάνειας και ταννίνες στο εσωτερικό τους (ταν) σε φύλλα 3^{ου} έτους σε ΗΜΣ. γ. Επιδερμικά κύτταρα αποαξονικής επιφάνειας και ταννίνες στο εσωτερικό τους (ταν) σε φύλλα 3^{ου} έτους σε ΗΜΣ.

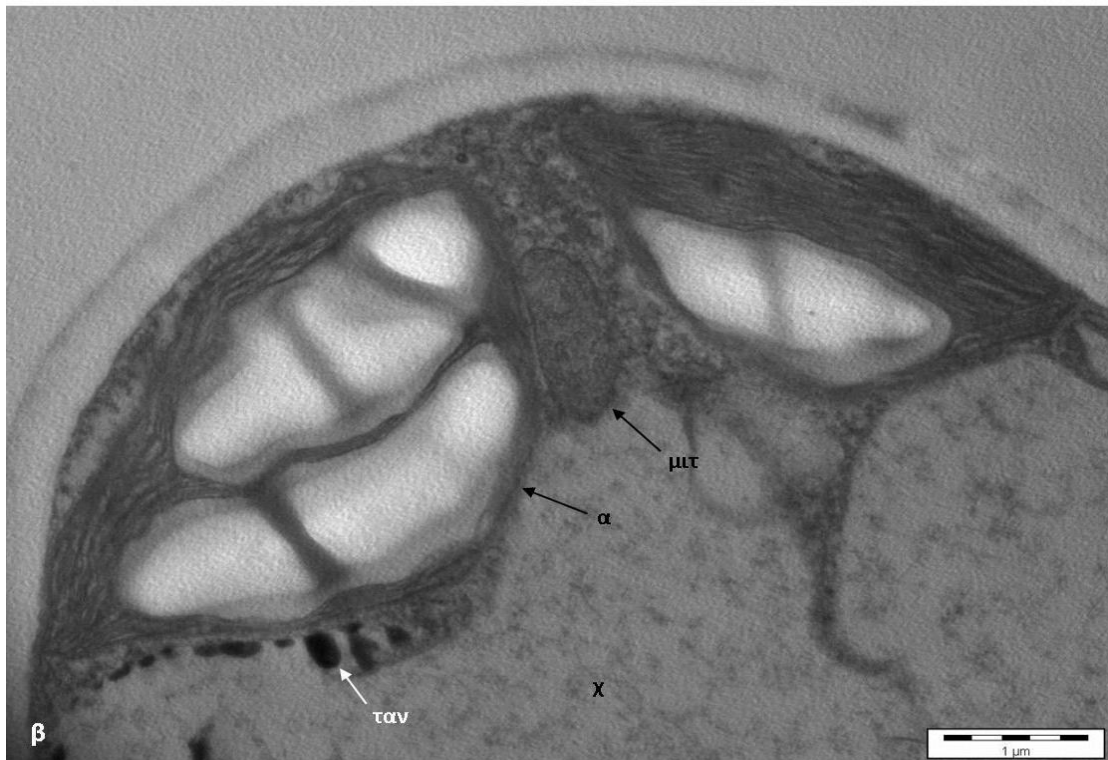
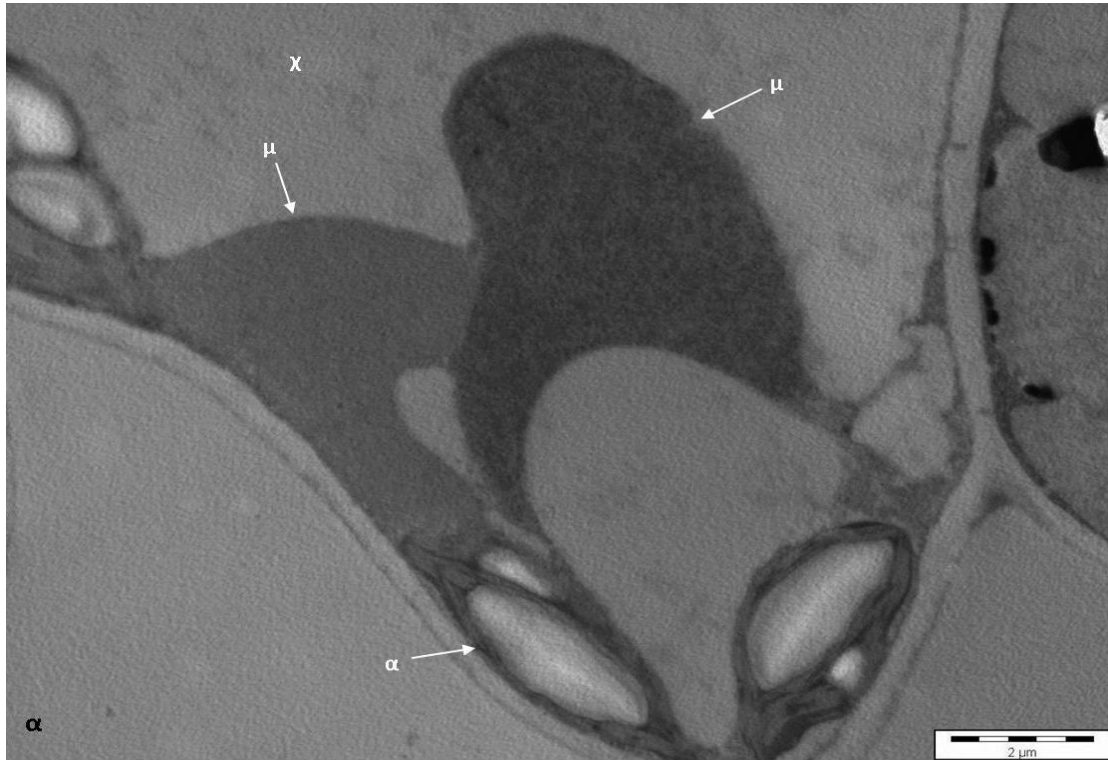


Εικόνα 27: α. Καταφρακτικά κύτταρα, εσωτερικά (εσε) και εξωτερικά επάρματα (εξε), χλωροπλάστης με πυρήνα (π) και αμυλόκοκκους (α) στην αποαζονική επιφάνεια σε φύλλα 1^{οο} έτους στο ΗΜΔ. β. Επιδερμικά κύτταρα προσαζονικής επιφάνειας γεμάτα με ταννίνες (ταν), εμφανή προσαζονική (πε) και αποαζονική εφυμενίδα (αε) σε φύλλα 1^{οο} έτους. γ. Μεταγωγό κύτταρο, στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα φύλλου 1^{οο} έτους.

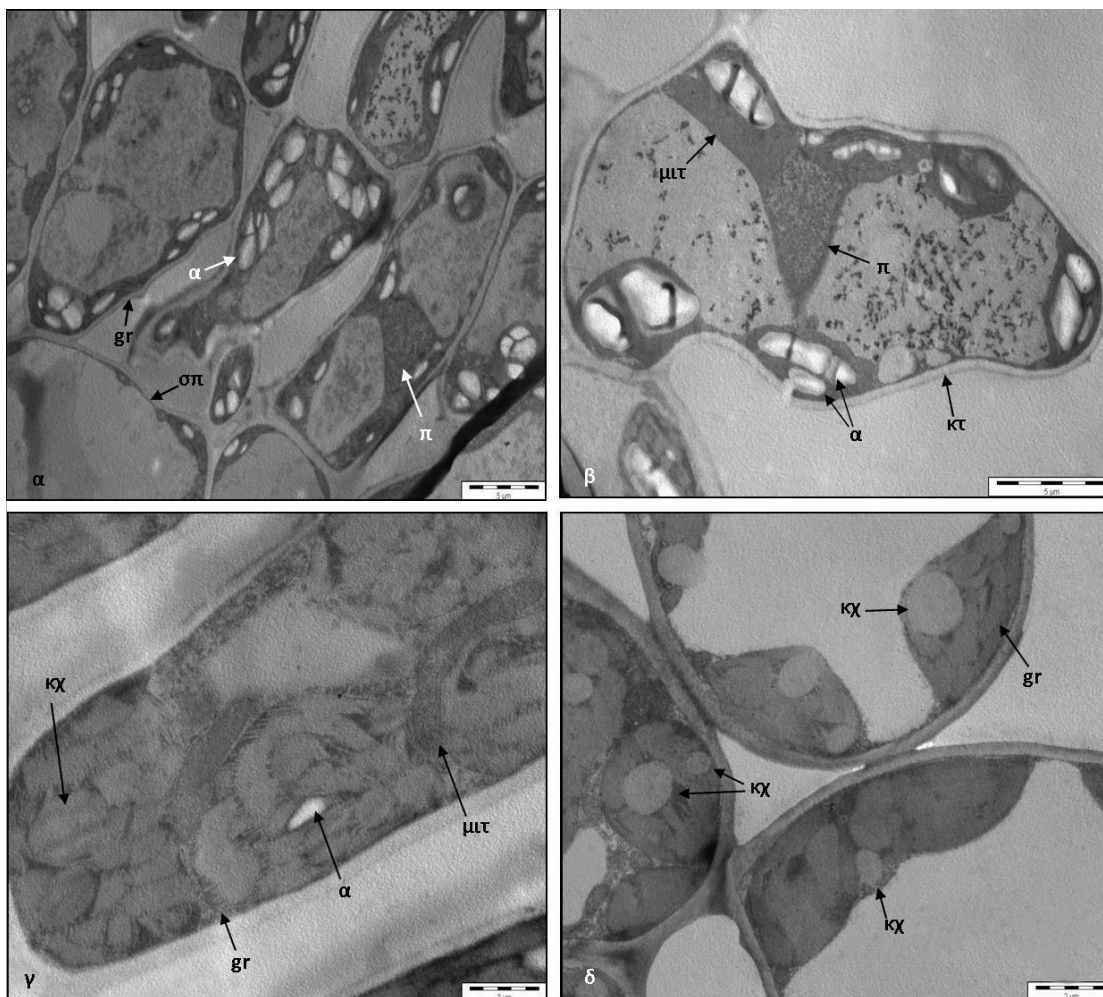




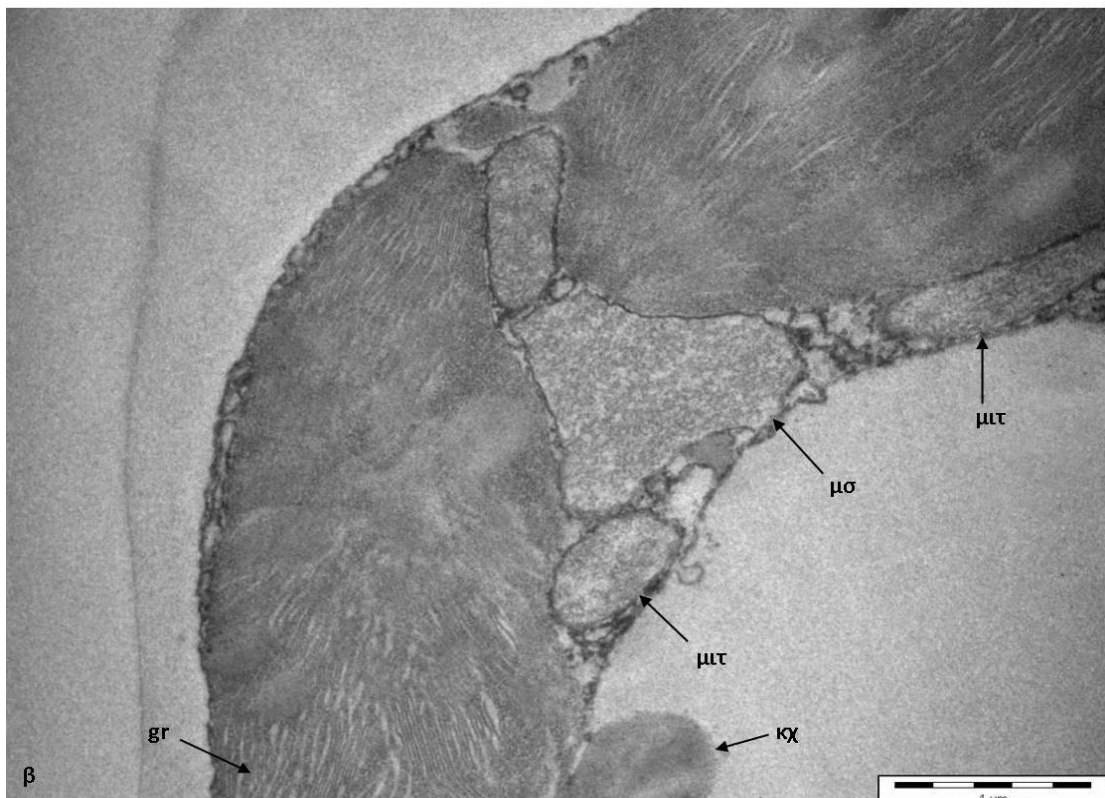
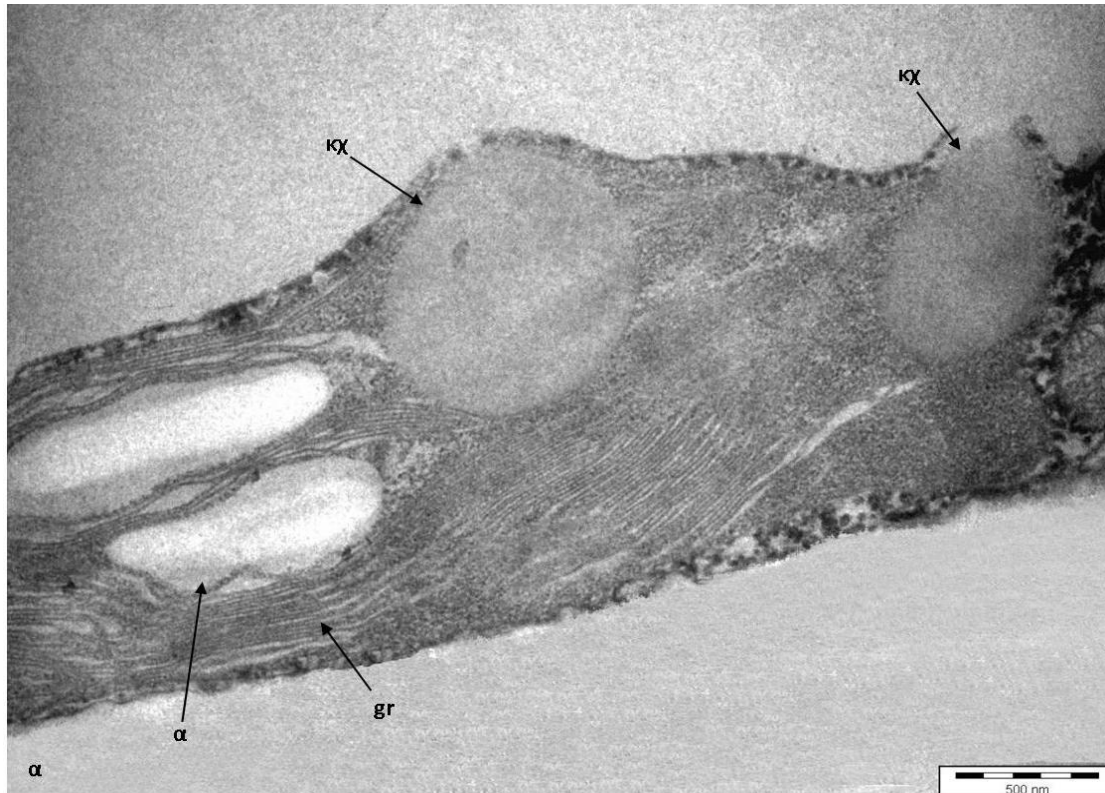
Εικόνα 28: α. Χλωροπλάστες (χλ) με μεγάλους αμυλόκοκκους, (α) grana χλωροπλάστων (gr), πλασμοδέσμη (πλ) και μιτοχόνδριο (μιτ), στο πασσαλώδες παρέγχυμα φύλλων 1^{ου} έτους στο ΗΜΔ. β. Χλωροπλάστης (χλ), μεγάλος πυρήνας (π) με εμφανή τη διπλή μεμβράνη που τον περιβάλλει (δμ) και μικροσωμάτιο (μσ) ανάμεσα σε δύο μεγάλους αμυλόκοκκους (α), στο πασσαλώδες παρέγχυμα φύλλων 1^{ου} έτους σε ΗΜΔ.



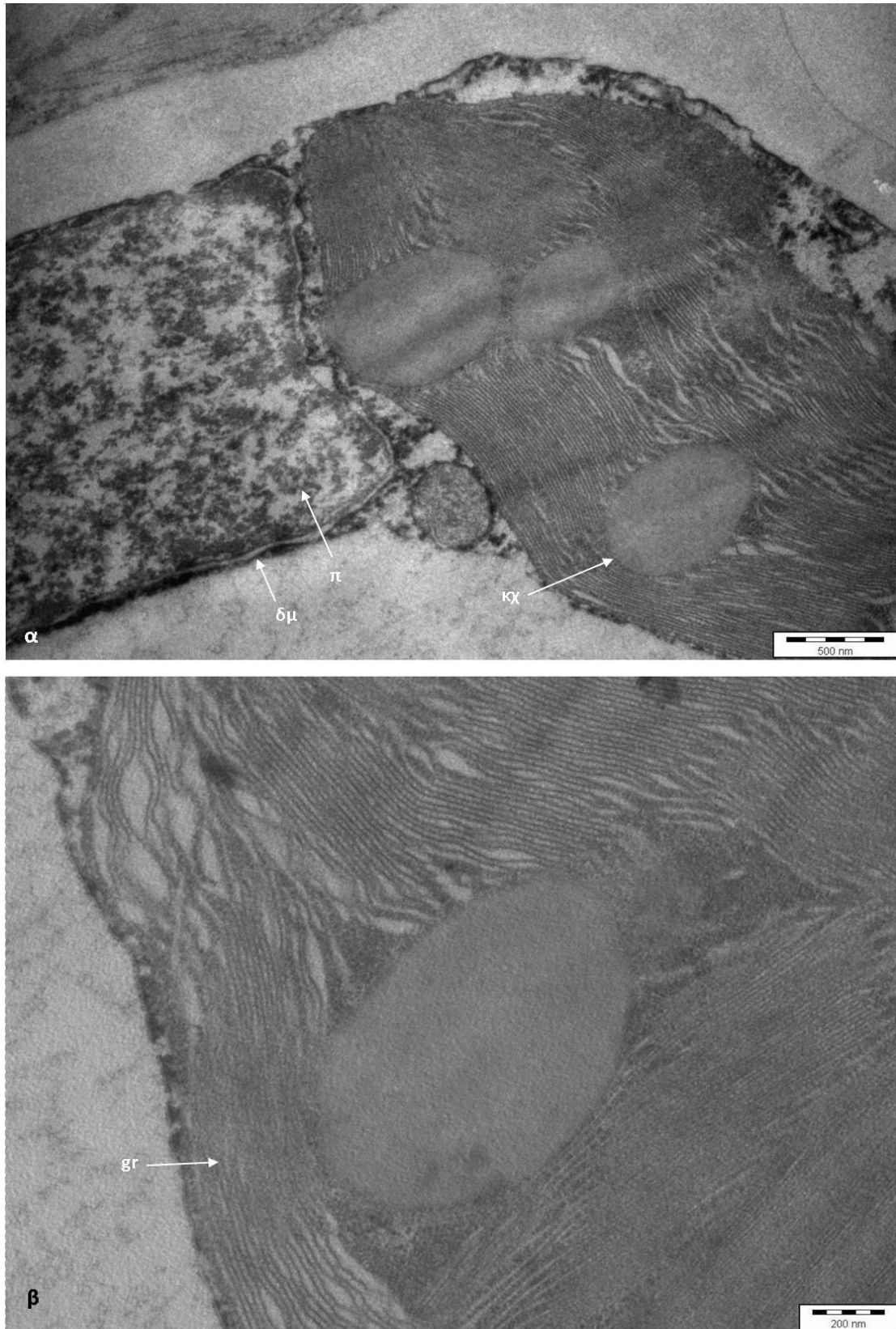
Εικόνα 29: α. Χλωροπλάστες με μεγάλους αμυλόκοκκους (α), δευτερογενείς μεταβολίτες (μ) στο χυμοτόπιο (χ), στο σπογγώδες παρέγχυμα φύλλων 1^{ου} έτους στο ΗΜΔ. β. Χλωροπλάστες με μεγάλους αμυλόκοκκους (α), μιτοχόνδριο (μμι) και ταννίνες (ταν) στο χυμοτόπιο (χ), σε σπογγώδες παρέγχυμα φύλλων 1^{ου} έτους σε ΗΜΔ.



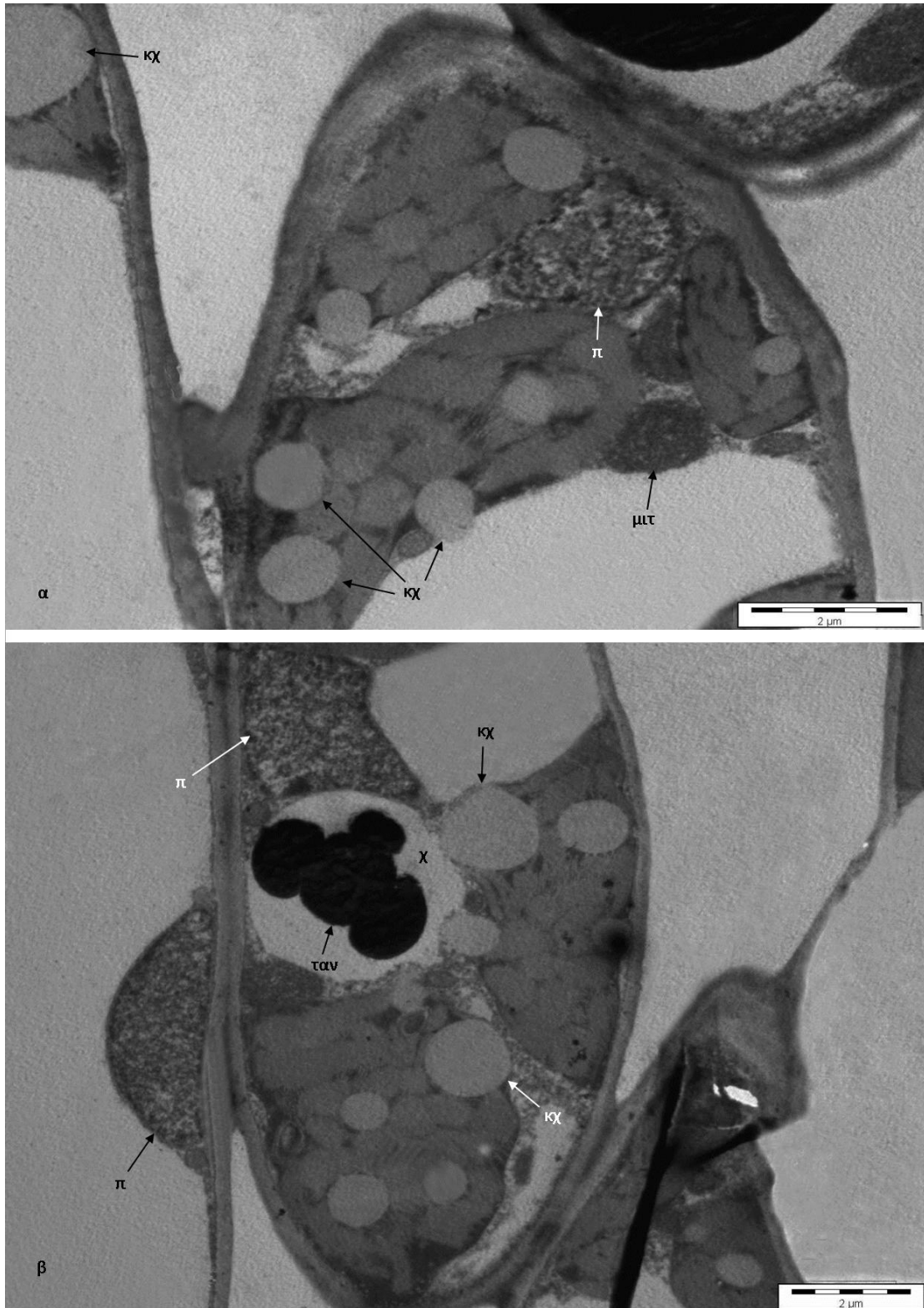
Εικόνα: α. Κύτταρα του μεσόφυλλου που περιέχουν χλωροπλάστες με μικρό αριθμό θυλακοειδών στα grana (gr) πολλούς αμυλόκοκκους (α) και πυρήνες (π), σε φύλλα 1^ο έτους, στο ΗΜΔ. **β.** Χλωροπλάστες με πολλούς και μεγάλο μεγέθους αμυλόκοκκους (α), μικρό αριθμό θυλακοειδών στα grana (gr) και πυρήνα (π), σε φύλλα 1^ο έτους, στο ΗΜΔ. **γ.** Χλωροπλάστες σε φύλλα 3^ο έτους, στο ΗΜΔ παρατηρείται ένας μικρός αμυλόκοκκος, grana (gr) με μεγάλο αριθμό θυλακοειδών, κυτίδια χλωροπλάστων (κχ) στο πασσαλώδες παρέγχυμα. **δ.** Κύτταρα σπογγώδους παρεγχύματος, χλωροπλάστες με μεγάλο μεγέθους κυτίδια (κχ), μεγάλο αριθμό θυλακοειδών στα grana (gr) σε φύλλα 4^ο έτους, στο ΗΜΔ.



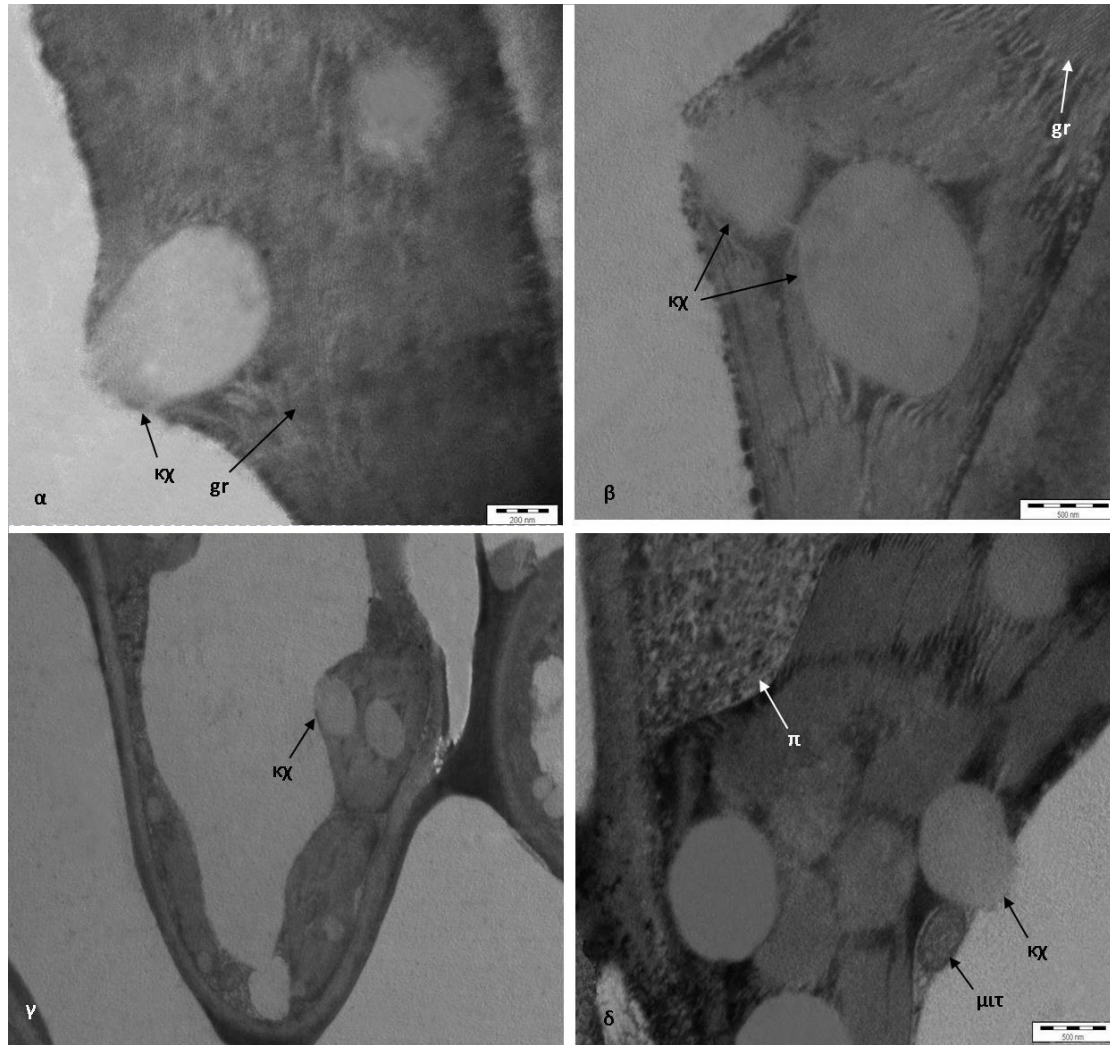
Εικόνα 30: α. Χλωροπλάστης με 2 μεγάλους αμυλόκοκκους (α), grana (gr) με μεγάλο αριθμό θυλακοειδών, 2 μεγάλα κυστίδια χλωροπλάστων (κχ) περιβαλλόμενα με μεμβράνη, το ένα εκ των δύο φαίνεται να διαρρηγνύεται στο κυτόπλασμα, στο πασσαλώδες παρέγχυμα σε φύλλα 3^{ου} έτους στο ΗΜΔ. β. Χλωροπλάστης με 2 μιτοχόνδρια (μιτ), μεγάλου μεγέθους μικροσωμάτιο (μσ), μεγάλο αριθμό θυλακοειδών στα grana και κυστίδιο (κχ) στο χυμοτόπιο, στο πασσαλώδες παρέγχυμα σε φύλλα 3^{ου} έτους στο ΗΜΔ.



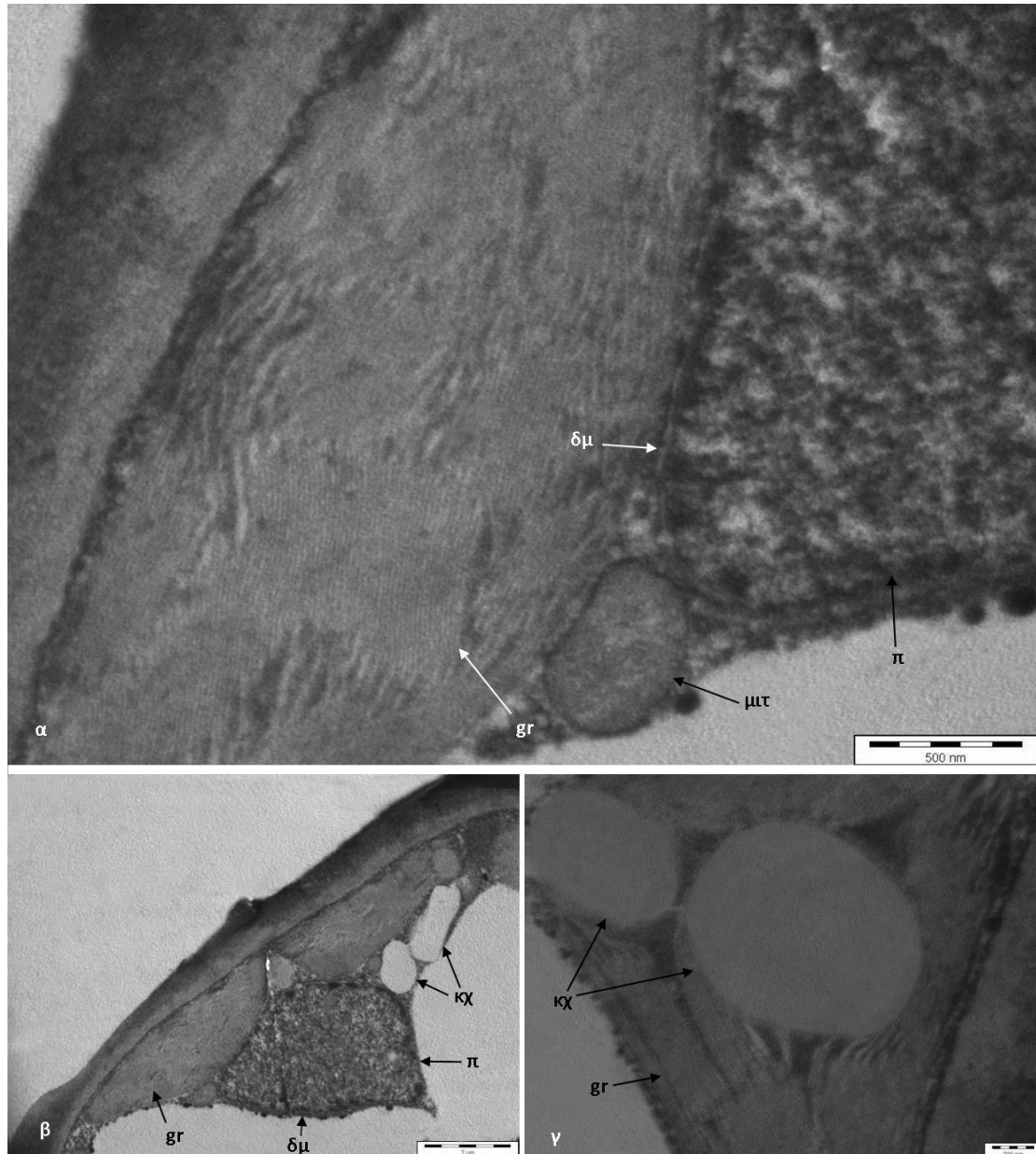
Εικόνα 31: α. Χλωροπλάστης με μεγάλο πυρήνα (π) με εμφανή τη διπλή μεμβράνη που τον περιβάλλει (δμ) και μεγάλα κυστίδια χλωροπλαστών (κχ), μιτοχόνδριο και μεγάλο αριθμό θυλακοειδών στα grana στο πασσαλώδες παρέγχυμα, σε φύλλα 3^{ου} έτους στο ΗΜΔ.
β. Κυστίδιο χλωροπλάστη (κχ) και τα θυλακοειδή των grana (gr) στο πασσαλώδες παρέγχυμα, σε φύλλα 3^{ου} έτους στο ΗΜΔ.



Εικόνα 32: α. Χλωροπλάστες με πολλά κυστίδια (κχ), πυρήνας και μιτοχόνδρια στο σπογγώδες παρέγχυμα σε φύλλα 4^{ου} έτους στο ΗΜΔ. β. Κύτταρα σπογγώδους παρεγχύματος με πολλά κυστίδια χλωροπλάστων (κχ), πυρήνες (π) και ταννίνες (ταν) στο χυμοτόπιο σε φύλλα 4^{ου} έτους στο ΗΜΔ.



Εικόνα 33: α. Κυτίδιο χλωροπλάστη κατά τη διάρρηξη του στο κυτόπλασμα και μεγάλος αριθμός θυλακοειδών των grana στο πασσαλώδες παρέγχυμα, σε φύλλα 4^{οο} έτος στο ΗΜΔ. β. Κυτίδια χλωροπλάστη (κχ) και μεγάλος αριθμός θυλακοειδών των grana (gr) στο πασσαλώδες παρέγχυμα, σε φύλλα 4^{οο} έτος στο ΗΜΔ. γ. Κύτταρα σπογγώδους παρεγχύματος με χλωροπλάστες με εμφανή κυτίδια (κχ). δ. Χλωροπλάστης με πολλά και μεγάλα κυτίδια (κχ), πυρήνας (π) και μιτοχόνδρια (μιτ) στο σπογγώδες παρέγχυμα σε φύλλα 4^{οο} έτους στο ΗΜΔ.



Εικόνα 34: α. Χλωροπλάστης με μεγάλο πυρήνα (π) και εμφανή τη διπλή μεμβράνη που το περιβάλλει (δμ), μιτοχόνδριο (μιτ) και μεγάλο αριθμό θυλακοειδών των grana (gr) στο πασσαλώδες παρέγχυμα, σε φύλλα 4^{οο} έτος στο ΗΜΔ. β. Κυτταρικό τοίχωμα (κτ), κυστίδια χλωροπλαστών (κχ), πυρήνας (π) με εμφανή τη διπλή μεμβράνη που το περιβάλλει (δμ) και μεγάλο αριθμό θυλακοειδών των grana (gr) στο σπογγώδες παρέγχυμα, σε φύλλα 4^{οο} έτος στο ΗΜΔ. γ. Κυστίδια χλωροπλαστών (κχ) και μεγάλος αριθμός θυλακοειδών των grana (gr) στο πασσαλώδες παρέγχυμα, σε φύλλα 4^{οο} έτος στο ΗΜΔ.

7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η χαρουπιά είναι αείφυλλο δένδρο ή θάμνος προσαρμοσμένος στα θερμά και ξηρά κλίματα, όπως αυτά των μεσογειακών οικοσυστημάτων στα οποία και ευδοκμεί. Η οικονομική αξία του δένδρου οφείλεται στην καλλιέργεια για τους καρπούς του, οι οποίοι χρησιμοποιούνται από τα πολύ παλιά χρόνια για διατροφικούς, βιομηχανικούς και γεωργικούς σκοπούς.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν οι ανατομικές και φυσιολογικές διαφορές σε φύλλα διαφορετικού έτους. Όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, τα ανατομικά χαρακτηριστικά των φύλλων των αείφυλλων σκληρόφυλλων ειδών, παρόλο που απαιτούν υψηλό κόστος κατασκευής, φαίνεται να είναι απολύτως απαραίτητα για την προσαρμογή στις συνθήκες του μεσογειακού περιβάλλοντος και επιτρέπουν την παρατεταμένη διάρκεια ζωής τους, η οποία φθάνει κατά μέσο όρο τα δύο χρόνια (Καραμπουρνιώτης και Λιακόπουλος, 2009). Τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν ότι τα φύλλα της χαρουπιάς έχουν διάρκεια ζωής μέχρι και τα 4 έτη, κατά τη διάρκεια των οποίων τα φύλλα αν και εμφανίζουν ανατομικές και φυσιολογικές διαφορές, είναι πλήρως λειτουργικά.

Στη διάρκεια των δύο χρόνων που διήρκεσε η παρούσα εργασία παρατηρήσαμε ότι, μπορούν να αναπτυχθούν νέα φύλλα χαρουπιάς όλες τις εποχές του έτους εφόσον οι συνθήκες είναι κατάλληλες, όπως για παράδειγμα μερικές ημέρες καλοκαιρίας κατά τη διάρκεια του χειμώνα ή βροχοπτώσεις κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. Με βάση τα παραπάνω στοιχεία συμπεραίνουμε ότι τα φύλλα της χαρουπιάς αναπτύσσονται σύμφωνα με το διαδοχικό πρότυπο φυλλώματος. Κατά τον Kikuzawa (2003) είδη με διαδοχικό τύπο φυλλώματος έχουν κατά πάσα πιθανότητα το πλεονέκτημα της διατήρησης υψηλότερων φωτοσυνθετικών ρυθμών καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, επειδή συνθέτουν νέα φύλλα σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, από τα είδη τα οποία συνθέτουν το φύλλωμά τους ταυτόχρονα, σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Τα αποτελέσματα της ιστοχημείας έδειξαν την ύπαρξη πολυφαινολών, ταννινών αλλά και φλαβονοειδών στα επιδερμικά κύτταρα και στα κύτταρα του μεσοφύλλου. Η δαπάνη πολύτιμων φωτοσυνθετικών προϊόντων για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών με σκοπό την αμυντική θωράκιση των φύλλων, μπορεί εύκολα να γίνει κατανοητή, καθώς η αναπλήρωση τους είναι δύσκολη (λόγω του υψηλού κόστους κατασκευής, των φτωχών εδαφών και των αντίξωων επικρατουσών συνθηκών) και επομένως η διατήρησή τους όσο το δυνατόν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα αποτελεί επιτακτική ανάγκη για το φυτό.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι παρόλο που το φυτό χαρακτηρίζεται ως σκληρόφυλλο δεν διαθέτει καθόλου λιγνινοποιημένα κύτταρα, όπως αυτά συνήθως εμφανίζονται είτε στις επεκτάσεις του δεσμικού κολεού είτε ακόμα και στα επιδερμικά κύτταρα (όπως πχ στη δάφνη) (Fasseas and Akoumianaki-Ioannidou, 2010), ή ιδιαίτερα ανεπτυγμένα ξυλώδη αγγεία. Στη χαρουπιιά η σκληρότητα των φύλλων φαίνεται να οφείλεται στο ότι το μεσόφυλλο εμφανίζει πολύ πυκνή δομή με ελάχιστους μεσοκυττάριους χώρους τόσο στο πασσαλώδες όσο και στο σπογγώδες παρεγχύμα. Στη σκληρότητα του φύλλου φαίνεται ακόμα να συμβάλλει και η ύπαρξη πολλών πηκτινικών ινών που φαίνεται να σταθεροποιούν τα κύτταρα, και κυρίως αυτά του σπογγώδους παρεγχύματος, μεταξύ τους.

Πρώτη γραμμή άμυνας των φύλλων της χαρουπιιάς αποτελεί η μεγάλο πάχους προσαξονική και αποαξονική εφυμενίδα η οποία καλύπτεται από παχύ στρώμα επεφυμενιδικών συστατικών (κηρών) ισχυρά υδρόφοβου χαρακτήρα, οι οποίοι περιορίζουν την υπερβολική απώλεια νερού. Σε αυτούς τους κηρούς οφείλεται και το γκριζοπράσινο χρώμα των φύλλων.

Σημαντικό χαρακτηριστικό που παρατηρήθηκε είναι η ύπαρξη εσωτερικής εφυμενίδας μεταξύ επιδερμικών κυττάρων και κυττάρων του πασσαλώδους ή σπογγώδους παρεγχύματος. Η ύπαρξη παρόμοιας εφυμενίδας, εσωτερικά και εξωτερικά των επιδερμικών κυττάρων της προσαξονικής και αποαξονικής επιδερμίδας, έχει αναφερθεί από τους Pesacrete *et al.* (1999), για το φυτό

Cirsium horridulum. Ο ρόλος της διπλής αυτής εφυμενίδας φαίνεται να είναι η προστασία από την αφυδάτωση αλλά πιθανόν να λειτουργεί και ως επιπλέον φίλτρο από τη UV ακτινοβολία, εφόσον με το μικροσκόπιο φθορισμού εντοπίζονται σε αυτή φλαβονοειδείς ενώσεις που διαθέτουν αυτή την ιδιότητα (Καραμπουρνιώτης, 2003).

Η αύξηση του πάχους των φύλλων, σύμφωνα με τις μετρήσεις μας, οφείλεται κατά κύριο λόγο στην επιμήκυνση των κυττάρων του πασσαλώδους παρεγχύματος και λιγότερο στην αύξηση του μεγέθους του σπογγώδους παρεγχύματος. Η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε να συμβαίνει μεταξύ φύλλων του πρώτου και του δεύτερου έτους ενώ δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση στα γηραιότερα φύλλα. Πιθανόν αυτή η αύξηση του πάχους των φύλλων να εξυπηρετεί στη διόγκωση του φωτοσυνθετικού παρεγχύματος για να μπορέσει σε αυτό να φιλοξενήσει μεγαλύτερους χλωροπλάστες με περισσότερα grana, προσαρμοσμένους σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού όπως φαίνονται να είναι στα φύλλα του 3^{ου} έτους.

Όσον αφορά τη δομή των κυττάρων του μεσόφυλλου, αυτά εμφανίζονται να είναι συμπαγή με περιορισμένους μεσοκυττάριους χώρους και περισσότερες από μια στρώσεις κυττάρων, στο πασσαλώδες παρέγχυμα παρατηρήθηκαν μέχρι και τέσσερις στρώσεις. Οι χλωροπλάστες των φύλλων του πρώτου έτους εμφανίζουν κλασική δομή αφού περιέχουν πολλούς αμυλόκοκκους και θυλακοειδή grana με μερικές στρώσεις (20/granum). Αντίθετα οι χλωροπλάστες των γηραιότερων φύλλων δεν συσσωρεύουν άμυλο και τα θυλακοειδή των grana εμφανίζουν πολλές στρώσεις, οι οποίες μετρήθηκαν να φτάνουν τα 240/granum. Ο αριθμός των θυλακοειδών των grana φαίνεται να αυξάνεται με την ηλικία των φύλλων. Τα γηραιότερα φύλλα φαίνεται να είναι προσαρμοσμένα σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού (δομή χλωροπλάστων low light), καθώς τα φύλλα αυτά διατηρούν υψηλούς ρυθμούς φωτοσυνθετικής ικανότητας αν και δέχονται χαμηλότερης έντασης φωτισμό, εφόσον βρίσκονται εσωτερικά στην κόμη του δένδρου. Παρόμοια δομή χλωροπλάστων με μεγάλο αριθμό θυλακοειδών ανά granum, παρατηρήθηκαν

σε φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού από τους Akoumianaki *et al.* (2003). Ενώ προηγούμενες μελέτες σε αείφυλλα είδη, έδειξαν ότι τα ώριμα προϋπάρχοντα φύλλα δεν εγκλιματίζονται μορφολογικά σε αλλαγές της έντασης του φωτός, ή εγκλιματίζονται μόνο μερικώς (Osunkoya and Ash 1991, Turnbull *et al.* 1993, Brooks *et al.* 1996, Mohammed and Parker 1999, Wyka *et al.* 2008). Έτσι, σε αείφυλλα είδη, η εναλλαγή των φύλλων, που περιλαμβάνει την αντικατάσταση των παλαιών φύλλων με χαμηλό δυναμικό εγκλιματισμού με νέα φύλλα με υψηλό δυναμικό εγκλιματισμού, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον εγκλιματισμό του φωτός (Katahata *et al.*, 2007).

Χαρακτηριστικό των χλωροπλαστών των φύλλων 2^{ου}, 3^{ου} και 4^{ου} έτους αποτελεί η παρουσία κυστιδίων που περιβάλλονται από μοναδιαία μεμβράνη και τα οποία κυστίδια φαίνεται να αποβάλλουν το περιεχόμενό τους είτε στο κυτόπλασμα είτε σε παρακείμενο χυμοτόπιο. Στη βιβλιογραφία τέτοια κυστίδια έχουν παρατηρηθεί από τους Eymery *et al.* (1999) οι οποίοι όμως τα περιγράφουν ως πλαστοσφαιρίδια (plastoglobuli). Οι εικόνες από το ΗΜΔ καταρρίπτουν τον χαρακτηρισμό αυτών των κυστιδίων ως πλαστοσφαιρίδια καθώς είναι κατά πολύ μεγαλύτερα σε μέγεθος από τα πλαστοσφαιρίδια, περιβάλλονται από μοναδιαία μεμβράνη και το περιεχόμενό τους εμφανίζεται ομοιογενές και ελαφρά οσμιοφιλο (γκρι) σε αντιδιαστολή με τα πλαστοσφαιρίδια τα οποία δεν περιβάλλονται από μεμβράνη και είναι μη οσμωτικά ενεργά, λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα τους ενώ το χρώμα τους στο ΗΜΔ είναι χαρακτηριστικά μαύρο λόγω του έντονα οσμιοφιλου χαρακτήρα των λιπιδίων.

Το περιεχόμενο και σε τι συμβάλλουν αυτά τα κυστίδια θα πρέπει να αποτελέσει αντικείμενο περαιτέρω μελέτης. Φαίνεται όμως να σχετίζεται με τη συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών και συγκεκριμένα πολυφαινολών (ταννινών) στα χυμοτόπια των κυττάρων της επιδερμίδας, αλλά και των υπόλοιπων κυττάρων του παρεγχύματος ή άλλων ιστών της χαρουπιάς. Με όλες τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη,

πολυφαινόλες (ταννίνες) εντοπίστηκαν σε όλους τους τύπους κυττάρων ενώ αυτές ήταν ιδιαίτερα συμπαγείς στα επιδερμικά κύτταρα. Οι ταννίνες φαίνεται να αποτελούν τον κύριο τρόπο προστασίας του φυτού έναντι βιοτικών καταπονήσεων. Συγκεκριμένα, εάν αυτές συμπεριληφθούν στην τροφή των φυτοφάγων προκαλούν ανασχεση της ανάπτυξης και πιθανόν ακόμη θάνατο. Η δράση τους αυτή σχετίζεται με την ιδιότητά τους να αντιδρούν και να κατακρημνίζουν αδιακρίτως πρωτεΐνες (Καραμπουρνιώτης, 2003). Εκτός αυτού λειτουργούν ως αποθητικές ουσίες, ενώ προσδίδουν στυφή γεύση στη τροφή. Σημαντικό θα είναι να ελεγχθούν περαιτέρω οι βιοσυνθετικοί οδοί παραγωγής πολυφαινολών (σικιμικού οξέως) και οι βιοσυνθετικοί οδοί των τερπενίων (φωσφογλυκεριναλδεϋδης/ πυροσταφυλικού) για να διευκρινιστεί με σιγουριά η φύση των κυστιδίων αλλά και ποια είναι η χρησιμότητά τους για το φυτό.

Ως προς τα φυσιολογικά αποτελέσματα, οι τιμές φωτοσυνθετικής ταχύτητας οι οποίες καταγράφηκαν συμφωνούν με τα οικοφυσιολογικά χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου είδους ότι δηλαδή η ξυλοκερατιά ως αείφυλλος θάμνος ή δένδρο είναι προσαρμοσμένη στα χαρακτηριστικά του μεσογειακού κλίματος. Σχεδόν όλα τα φυτικά είδη με αυτά τα στοιχεία χαρακτηρίζονται από σχετικά χαμηλούς ρυθμούς ανταλλαγής αερίων οι οποίοι δικαιολογούνται εν μέρει από την ιδιαίτερη αντοχή των φύλλων στις ξηροθερμικές συνθήκες του μεσογειακού θέρους αλλά και στις μετρίως χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα. Συγκεκριμένα, τα φύλλα είναι δερματώδη, σκληρά με αυστηρό έλεγχο των διαπνευστικών απωλειών, προστατευτικούς ιστούς και μεσόφυλλο με πυκνή διάταξη και μεγάλο πάχος, χαρακτηριστικά τα οποία δεν ευνοούν υψηλές ταχύτητες ανταλλαγής αερίων (Warren and Adams, 2004).

Οι τιμές ανταλλαγής αερίων που καταγράφηκαν στην παρούσα μελέτη συμφωνούν ή είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες μετρήσεις που έχουν δημοσιευτεί. Συγκεκριμένα, οι Osório *et al.* (2005, 2012) αναφέρουν ως μέγιστες τιμές φωτοσυνθετικής ταχύτητας για ώριμα δένδρα περίπου 11 μmol

CO₂ m⁻² s⁻¹. Πολύ χαμηλότερες τιμές, περίπου 6 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹, έχουν αναφερθεί για δενδρύλλια ενός έτους (Osório *et al.*, 2011). Χαμηλότερες τιμές στοματικής αγωγιμότητας (περίπου μεταξύ 100 και 140 mmol CO₂ m⁻² s⁻¹) έχουν μετρηθεί σε ώριμα δένδρα υπό τρέχουσες περιβαλλοντικές συνθήκες (Osório *et al.*, 2012). Μεταξύ ηλικιών, έχει αναφερθεί ότι τα νέα φύλλα παρουσιάζουν συγκρίσιμες τιμές ανταλλαγής αερίων με τα παλαιότερα, αν και δεν δίνονται περισσότερες πληροφορίες για την ακριβή τους ηλικία (Osório *et al.*, 2005), γεγονός το οποίο καταγράφηκε στην παρούσα μελέτη για τα φύλλα του 1^{ου} και του 2^{ου} έτους.

Εντόπωση προκαλεί το γεγονός ότι οι τιμές της ταχύτητας διαπνοής όπως και ακόμα περισσότερο αυτές της στοματικής αγωγιμότητας οι οποίες καταγράφηκαν στην παρούσα εργασία παραμένουν σχετικά σταθερές με την αύξηση της έντασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να υποδηλώνει ελλειμματική υδατική κατάσταση και συνεπώς αυστηρό έλεγχο των στοματικών κινήσεων. Σύμφωνα με τους Ramalho *et al.* (2000), πτώση του δυναμικού νερού σε τιμές κάτω από -2 MPa συνεπάγεται μείωση της φωτοσυνθετικής ταχύτητας των φύλλων κατά 50% περίπου, στα επίπεδα που μετρήθηκε στην παρούσα εργασία. Υπό τις παραπάνω συνθήκες, η μέγιστη στοματική αγωγιμότητα κυμαίνεται περί τα 200 mmol CO₂ m⁻² s⁻¹, αρκετά υψηλότερη από αυτή που μετρήθηκε στην παρούσα εργασία. Ως αποτέλεσμα της έλλειψης αντίδρασης της στοματικής αγωγιμότητας στην ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, η συσχέτιση μεταξύ φωτοσύνθεσης και διαπνευστικών απωλειών είναι αρνητική. Στη βιβλιογραφία δεν έχει εντοπιστεί κάποια αναφορά για την απόκριση της ταχύτητας διαπνοής ή της στοματικής αγωγιμότητας στην ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ώστε να είναι δυνατή η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Οι τιμές του ETR που καταγράφηκαν είναι υψηλότερες από αυτές που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία κατά περίπου 40-50% (Osório *et al.*, 2012). Το γεγονός αυτό ειδικότερα για τα φύλλα του 2^{ου} έτους υποδηλώνει την ιδιαίτερα καλή κατάσταση του φωτοσυστήματος II σε αυτά τα φύλλα. Τα φύλλα αυτά

έδειξαν επίσης μια προοδευτική εμπλοκή των μη-φωτοχημικών διεργασιών απόσβεσης του φθορισμού της χλωροφύλλης υποδηλώνοντας υψηλή ικανότητα απόσβεσης της ενέργειας όταν αυτή είναι σε πλεόνασμα, ιδιαίτερα χρήσιμο χαρακτηριστικό κατά τα περιστατικά χαμηλών θερμοκρασιών της χειμερινής περιόδου.

Σε γενικές γραμμές, τα φύλλα των τριών ηλικιακών κατηγοριών του φυτού *Ceratonia siliqua* έδειξαν τυπικές τιμές των παραμέτρων της φωτοσυνθετικής συσκευής με εξαίρεση αυτών της διαπνευστικής ταχύτητας και της στοματικής αγωγιμότητας. Τα χαρακτηριστικά αυτά χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Τα φύλλα και των τριών ηλικιακών κατηγοριών είναι σε μεγάλο βαθμό λειτουργικά και συμβάλλουν στο κέρδος σε άνθρακα του φυτού γεγονός το οποίο είναι συμβατό με τη μεγάλη διάρκεια ζωής των φύλλων του συγκεκριμένου φυτού.

8 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Τα φύλλα της χαρουπιάς έχουν διάρκεια ζωής μέχρι και τα 4 έτη
- Παρουσιάζουν ανατομικά ξηροφυτικά χαρακτηριστικά, προσαρμοσμένα στα χαρακτηριστικά του μεσογειακού κλίματος
- Τα φύλλα και στα 4 έτη είναι πλήρως λειτουργικά, ενώ παρουσιάζουν ανατομικές και φυσιολογικές διαφορές μεταξύ τους
- Νέα φύλλα αναπτύσσονται καθ' όλη τη διάρκεια του έτους
- Εντοπίστηκαν πολυφαινόλες, ταννίνες και φλαβονοειδή στα επιδερμικά κύτταρα και στα κύτταρα του μεσοφύλλου
- Οι επεκτάσεις του δεσμικού κολεού χαρακτηρίζονται από παντελή απουσία λιγνινοποιημένων κυττάρων καθώς και σκληροεγχύματος. Το μεσόφυλλο χαρακτηρίζεται από πυκνή δομή με ελάχιστους μεσοκυττάρους χώρους τόσο στο πασσαλώδες όσο και στο σπογγώδες παρέγχυμα
- Μεταξύ των κυττάρων του σπογγώδους παρεγχύματος εντοπίστηκαν πολλές πηκτινικές ίνες
- Η εφυμενίδα τόσο η προσαξονική όσο και η αποαξονική χαρακτηρίζεται από μεγάλο πάχος και καλύπτεται από παχύ στρώμα επεφυμενιδικών συστατικών (κηρών)
- Το γκριζοπράσινο χρώμα των ώριμων φύλλων οφείλεται στους κηρούς που καλύπτουν την εφυμενίδα.
- Μεταξύ των επιδερμικών κυττάρων και των κυττάρων του πασσαλώδους ή σπογγώδους παρεγχύματος εντοπίστηκε εσωτερική εφυμενίδα
- Η αύξηση του πάχους των φύλλων μεταξύ 1^{ου} και 2^{ου} έτους οφείλεται στην επιμήκυνση των κυττάρων του πασσαλώδους παρεγχύματος, ενώ περαιτέρω αύξηση δεν παρατηρείται στα γηραιότερα φύλλα.
- Το πασσαλώδες παρέγχυμα αποτελείται από 4 στρώσεις κυττάρων

- Οι χλωροπλάστες των φύλλων του 1^{ου} έτους εμφανίζουν κλασική δομή, ενώ αντιθέτως οι χλωροπλάστες των γηραιότερων φύλλων παρουσιάζουν δομή χλωροπλαστών low light
- Ο αριθμός των θυλακοειδών των grana φαίνεται να αυξάνεται με την ηλικία των φύλλων.
- Εντοπίστηκαν κυστίδια που περιβάλλονται από μοναδιαία μεμβράνη στο εσωτερικό των χλωροπλαστών, το περιεχόμενο των οποίων είναι ομοιογενές και ελαφρά οσμινόφιλο (γκρι χρώμα).
- Τα κυστίδια των χλωροπλαστών φαίνεται να αποβάλλουν το περιεχόμενό τους είτε στο κυτόπλασμα είτε σε παρακείμενο χυμοτόπιο.
- Τα κυστίδια αυτά φαίνεται να σχετίζονται με την παραγωγή ταννινών και τη συσσώρευσή τους στα χυμοτόπια όλων των κυττάρων
- Οι καμπύλες της φωτοσύνθεσης παρουσιάζουν τυπικές τιμές
- Οι τιμές ανταλλαγής αερίων που καταγράφηκαν συμφωνούν ή είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες μετρήσεις που έχουν δημοσιευτεί
- Οι τιμές της ταχύτητας διαπνοής και της στοματικής αγωγιμότητας παραμένουν σχετικά σταθερές με την αύξηση της έντασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.
- Υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ φωτοσύνθεσης και διαπνευστικών απωλειών, οφειλόμενη στην έλλειψη αντίδρασης της στοματικής αγωγιμότητας στην ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας
- Μετρήθηκαν τιμές του ETR, υψηλότερες κατά περίπου 40-50% σε σχέση με αυτές που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία
- Ιδιαίτερα καλή βρέθηκε η κατάσταση του φωτοσυστήματος II ειδικότερα για τα φύλλα του 2^{ου} έτους
- Παρουσιάζεται προοδευτική εμπλοκή των μη-φωτοχημικών διεργασιών απόσβεσης του φθορισμού της χλωροφύλλης η οποία υποδηλώνει υψηλή ικανότητα απόσβεσης της ενέργειας όταν αυτή είναι σε πλεόνασμα

Εν κατακλείδι από την παρούσα μελέτη αποδεικνύεται ότι το *Ceratonia siliqua* εμφανίζει πολλούς προστατευτικούς μηχανισμούς για τις διάφορες καταπονήσεις.

9 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akoumaniaki-Ioannidou, A., Georgakopoulos J.H., Fasseas C., Argyroudi-Akoyunoglou J.H. 2003. Photoacclimation in *Spathiphyllum*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 73: 149-158.
- Battle, I., Tous, J. 1997. Carob tree. *Ceratonia siliqua* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Bjorkman, O., Demmig, B. 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170 (4): 489-504.
- Brooks, J.R., Sprugel, D.G., Hinckley., T.M. 1996. The effects of light acclimation during and after foliage expansion on photosynthesis of *Abies amabilis* foliage within the canopy. *Oecologia* 107: 21-32.
- Cronquist, A. 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. New York: Columbia University Press
- Davidson, R., Choudhury, H., Origgi, S., Castellan, A., Trichet, V. and Capretti, G. (1995). The reaction of phloroglucinol in the presence of acid with lignin-containing materials. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 91:87-93.
- Elias, TS. 1974. The genera of Mimosoideae (Leguminosae) in the southeastern United States. *J. Arnold Arbor.* 55: 67-118
- Eymery, F., Rey, P. 1999. Immunocytolocalization of CDSP 32 and CDSP 34, two chloroplastic drought-induced stress proteins in *Solanum tuberosum* plants. *Plant Physiol. Biochem* 37 (4): 305-312.
- Fasseas, C., Akoumianaki-Ioannidou, A. 2010. Some anatomical Features of *Laurus nobilis* Leaves Contributing to Its Suitability as Ornamental Plant in Temperate Climates. *Acta Horticulturae* 885: 99-108.
- Feder, N., and O'Brien, T.P. (1968). *Plant Microtechnique. Some principles and new methods*. *American Journal of Botany* 55 (1):123-142.
- Gardner, R. O. 1975. Vanillin-hydrochloric acid as a histochemical test for tannin. *Stain Technology* 50(5), 315-317.

- Grimstone, A., and Skaer, R. (1972). A guidebook to microscopical methods. Cam Jensen, W. (1962). Botanical Histochemistry_Principles and Practice. 1st Edition, W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Guerin, H., Delaveau, P., and Paris, R. (1971). Localisations histochimiques.II : Procèdes simples de localisation de pigments flavoniques. Application a quelques Phanerogames. Societe Botanique de France 118: 29-36.
- Hall, D.O., Rao, K.K. 1999. Photosynthesis. 6th edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- Johansen, D. (1940). Plant Microtechnique. Edition I. Mc Graw-Hill.bridge U
- Clark, G. (1981). Staining Procedures. 4th Edition. Williams and Wilkins. niversity Press, London.
- Karabourniotis, G., Papastergiou, N., Kabanopoulou, E., Fasseas, C. 1933. Foliar sclereids of *Olea europæa* may function as optical fibres. Can. J. Bot. 72: 330-336.
- Katahata, S., Naramoto, M., Kakubari, Y., Mukai., Y. 2007. Photosynthetic capacity and nitrogen partitioning in foliage of the evergreen shrub *Daphniphyllum humile* along a natural light gradient. Tree Physiol. 27: 199-208.
- Kikuzawa, K. 2003. Phenological and morphological adaptations to the light environment in two woody and two herbaceous plant species. Funct. Ecol. 17: 29-38.
- Lawlor, D.W. 2001. Photosynthesis. 3rd Ed. BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Leshem, Y., D. Ophir. 1977. Differences in endogenous levels of gibberellin activity in male and female partners of two dioecious tree species. Ann. Bot. 41:375-379.
- Mohammed, G.H., Parker., W.C. 1999. Photosynthetic acclimation in eastern hemlock [*Tsuga canadensis* (L.) Carr.] seedlings following transfer of shade-grown seedlings to high light. Trees 13: 117-124.
- Northington, D. K., Schneider, E. L. 1996. The Botanical World. 2nd Ed. Wm. C. Brown Publishers.
- Osório, M.L., Gonçalves, S., Osório, J., Romano, A. 2005. Effects of CO₂ concentration on acclimatization and physiological responses of two cultivars of carob tree. Biologia Plantarum, 49: 161-167.

- Osório, M.L., Osório, J., Gonçalves, S., David, M.M., Correia, M.J., Romano, A. 2012. Carob trees (*Ceratonia siliqua* L.) regenerated in vitro can acclimatize successfully to match the field performance of seed-derived plants. *Trees - Structure and Function*, 26: 1837-1846.
- Osório, M.L., Osório, J., Vieira, A.C., Gonçalves, S., Romano, A. 2011. Influence of enhanced temperature on photosynthesis, photooxidative damage, and antioxidant strategies in *Ceratonia siliqua* L. seedlings subjected to water deficit and rewatering. *Photosynthetica*, 49: 3-12.
- Osunkoya, O.O., Ash, J.E. 1991. Acclimation to a change in light regime in seedlings of six Australian rainforest species. *Aust. J. Bot.* 39:591-605.
- Pasqua, G., Monacelli, B., and Silvestrini, A. (2003). Accumulation of essential oils in reaction to root differentiation in *Angelica archangelica* L. *European Journal of Histochemistry* 47 (1): 87-90.
- Pesacreta, T.C., Hasenstein, KH. 1999. The Internal Cuticle of *Cirsium Horridulum* (Asteraceae) Leaves. *American Journal of Botany* 86 (7): 923-928.
- Ramalho, J.C., Lauriano, J.A., Nunes, M.A. 2000. Changes in photosynthetic performance of *Ceratonia siliqua* in summer. *Photosynthetica*, 38: 393-396.
- Ridge, I. 2002. *Plants*. Oxford University Press. Oxford, UK. Rost, T.L., Barbour, M.G., Stocking, C.R., Murphy, T.M. 1998. *Plant Biology*. Wadsworth Publishing Company
- Robertson, KR., YT Lee. 1976. The genera of Caesalpinioideae (Leguminosae) in the southeastern United States. *J. Arnold Arbor.* 51: 1-53.
- Rost, F.W.D. 1995. *Fluorescence Microscopy*. Cambridge University Press. New York.
- Sarkar, S. K. and Howarth, R. E. 1976. Specificity of the Vanillin Test for Flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24(2), 317-320.
- Schulze, E.D., Cadwell, M.M. 1995. *Ecophysiology of photosynthesis*. New York, Springer.
- Taiz L., Zeiger E. 1998. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc, New York.

- Turnbull, M.H., Doley, D., Yates., D.J. 1993. The dynamics of photosynthetic acclimation to changes in light quantity and quality in three Australian rainforest tree species. *Oecologia* 94: 218–228.
- Warren, C.R., Adams, M.A. 2004. Evergreen trees do not maximize instantaneous photosynthesis. *Trends in Plant Science*, 9: 270-274.
- Wyka, T., Robakowski, P., Zytowskiak., R. 2008. Leaf age as a factor in anatomical and physiological acclimative responses of *Taxus baccata* L. needles to contrasting irradiance environments. *Photosynth. Res.* 95: 87–99.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Αϊβαλάκης Γ., Καραμπουρνιώτης Γ., Φασσέας Κ. 2003. Σημειώσεις Γενικής Βοτανικής. Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Αναγνωστόπουλος Π.Θ. 1935. Η ελληνική ελαιοκομία. Αθήνα Τύπος Λ. Θ. Λαμπροπούλου
- Δροσόπουλος Β.Ι. 1992. Η Μορφολογία και Ανατομία των Φυτών. Αθήνα: Εκδόσεις Γ.Π.Α.
- Καραμπουρνιώτης Γ.Α. 2003. Φυσιολογία Καταπονήσεων των Φυτών. Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο
- Καραμπουρνιώτης Γ.Α., Λιακόπουλος Γ. 2009. Οικοφυσιολογία Μεσογειακών Φυτικών Ειδών. Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Μπάουμαν Ε. 1999. Η ελληνική χλωρίδα στο μύθο, στην τέχνη, στη λογοτεχνία.
- Πάπυρος Larousse Britannica. 2007. Αθήνα: Πάπυρος. 52: 393
- Ποντίκης Κ.Α. 1996. Ειδική Δενδροκομία. Ακρόδρυα – Πυρηνόκαρπα – Λοιπά Καρποφόρα. Αθήνα - Πειραιάς: Εκδόσεις Α. Σταμούλης
- Φασσέας, Κ. 2005. Λεπτή Δομή Κυττάρου. Μικροσκοπία Εφαρμοσμένη στη Γεωπονία. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, Αθήνα.

Φλοκάς, Α. 2007. Συνοπτικές Σημειώσεις Μαθήματος Βιοκλιματολογίας.
Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Χρονοπούλου Α., Σερέλη. 1996. Μαθήματα Γεωργικής Μετεωρολογίας.
Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΔΙΚΤΥΟΓΡΑΦΙΑ

Wikipedia the Free Encyclopedia

http://en.wikipedia.org/wiki/Ceratonia_siliqua. 2012

http://www.worldagroforestry.org/treedb2/AFTPDFS/Ceratonia_siliqua.pdf. 2012

Ελληνική Στατιστική Αρχή (ΕΛ.ΣΤΑΤ.) (πρώην Εθνική Στατιστική Υπηρεσία της Ελλάδος Ε.Σ.Υ.Ε., στοιχεία έτους 2005)

<http://www.statistics.gr/portal/page/portal/ESYE>. 2012