

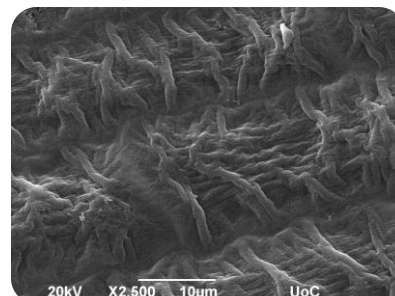
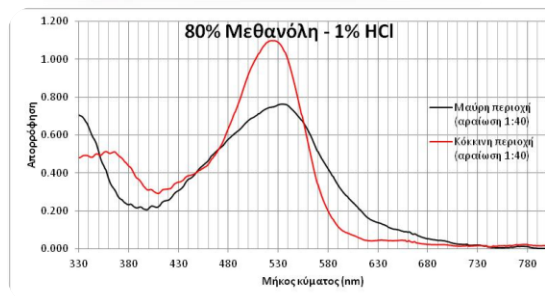
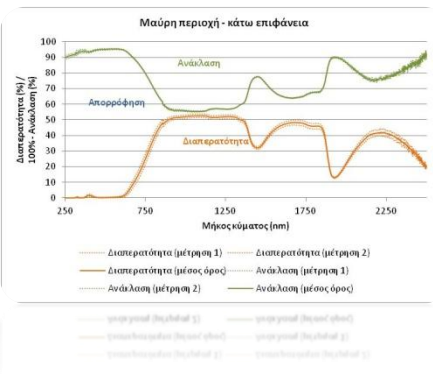
ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

Διπλωματική εργασία:

## Μελέτη οπτικών ιδιοτήτων χαρακτηριστικών ανθικών ιστών



Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Σοφία Ριζοπούλου

Δημήτρης Χαλκίδης

A.M.: 1113201400123

Αθήνα 2019

## Περιεχόμενα

<b>Πρόλογος – ευχαριστίες.....</b>	<b>5</b>
<b>1. Εισαγωγή .....</b>	<b>7</b>
1.1 Στοιχεία θεωρίας χρώματος και η θέση του μαύρου .....	7
1.2 Η φυσική και η χημεία του μαύρου χρώματος.....	10
1.2.1 Η φυσική του μαύρου .....	10
1.2.2 Η χημεία του μαύρου .....	12
1.2.3 Υπερ-μαύρο .....	13
1.3 Μαύρο χρώμα στους ζωντανούς οργανισμούς με έμφαση στις μελανίνες.....	15
1.4 Περιπτώσεις δομικής ενίσχυσης του μαύρου χρώματος σε ζώα .....	17
1.5 Ανθικές χρωστικές.....	20
1.5.1 Γενικά για τις φυτικές χρωστικές .....	20
1.5.2 Χλωροφύλλες .....	21
1.5.3 Βεταλαΐνες.....	22
1.5.4 Καροτενοειδή .....	23
1.5.5 Φλαβονοειδή.....	24
1.5.6 Ανθοκυανίνες .....	27
1.5.6.1 Χημική δομή ανθοκυανιδινών .....	27
1.5.6.2 Πρωτοταγής χημική δομή ανθοκυανινών.....	28
1.5.6.3 Επίδραση του διαλύτη, της θερμοκρασίας και του pH στο χρώμα.....	29
1.5.6.4 Ενδομοριακές και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις με φλαβονοειδή – αλληλεπίδραση με συγχρωστικές.....	30
1.5.6.5 Αλληλεπιδράσεις με μέταλλα .....	32
1.5.6.6 Χωρικός εντοπισμός ανθοκυανινών .....	33
1.6 Δομικό χρώμα.....	35
1.6.1 Γενικά στοιχεία και βασικές έννοιες .....	35
1.6.2 Φυσικοί μηχανισμοί παραγωγής δομικού χρώματος.....	36
1.6.3 Δομικό χρώμα σε ζώα .....	40
1.6.4 Δομικό χρώμα σε φυτά .....	43
1.6.5 Δομικό χρώμα σε άνθη.....	46
1.7 Οπτικές ιδιότητες στα άνθη .....	51
1.7.1 Διέλευση, ανάκλαση, απορρόφηση, διάθλαση & σκέδαση .....	51

1.7.2 Άλλες οπτικές ιδιότητες των ανθέων .....	56
1.7.3 Περιπτώσεις δομικής ενίσχυσης του χρώματος σε άνθη .....	58
1.8 Μαύρος χρωματισμός σε άνθη.....	62
1.8.1 Φύση του μαύρου χρώματος στα φυτά με έμφαση στα άνθη.....	62
1.8.2 Ποικιλότητα των μαύρων ανθέων .....	68
1.9 Στοιχεία βιολογίας της εφυμενίδας .....	70
1.9.1 Βασική δομή και βιοχημεία της εφυμενίδας.....	70
1.9.2 Εφυμενιδιακές ποικίσεις .....	71
1.10 Στοιχεία βιολογίας του <i>Paraver rhoeas</i> L. ....	73
1.10.1 Συστηματική, Γεωγραφική κατανομή & Φυλογένεση .....	73
1.10.2 Μορφολογία, Ανατομία & Φυσιολογία .....	74
1.10.3 Κύκλος ζωής & Φύτρωση .....	76
1.10.4 Αναπαραγωγή, Ανθοφορία & Επικονίαση .....	76
1.10.5 Στοιχεία φυτοχημείας .....	77
1.10.6 Μορφολογία, μικρομορφολογία, ανατομία και χρώμα των πετάλων .....	78
1.11 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας.....	81
<b>2. Υλικά και μέθοδοι .....</b>	<b>82</b>
2.1 Συλλογή και γενική κατεργασία φυτικού υλικού.....	82
2.2 Προσδιορισμός οπτικών ιδιοτήτων άθικτων πετάλων .....	84
2.3 Μονιμοποίηση και αφυδάτωση του υλικού και προετοιμασία για SEM .....	86
2.4 Ηλεκτρονι(α)κό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM).....	89
2.5 Στοιχειακή ανάλυση με SEM-EDX .....	91
2.6 Φασματοφωτομετρία ορατού-υπεριώδους .....	95
2.7 Λήψη φασμάτων απορρόφησης από εκχυλίσματα πετάλων.....	97
2.8 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών ανθοκυανινών .....	98
2.9 Ποσοτικός προσδιορισμός «ολικών φλαβονοειδών».....	101
2.10 Ποσοτικός προσδιορισμός χλωροφυλλών και ολικών καροτενοειδών .....	105
<b>3. Αποτελέσματα .....</b>	<b>113</b>
3.1 Παρατηρήσεις στο πεδίο και υδατοπεριεκτικότητα.....	113
3.2 Μακροσκοπικές παρατηρήσεις.....	114
3.3 Οπτικές ιδιότητες άθικτων πετάλων .....	117
3.3.1 Μαύρη περιοχή – άνω επιφάνεια.....	117
3.3.2 Μαύρη περιοχή – κάτω επιφάνεια .....	121
3.3.3 Κόκκινη περιοχή – άνω επιφάνεια.....	124

3.3.4 Κόκκινη περιοχή – κάτω επιφάνεια .....	127
3.3.5 Μαύρη περιοχή – σύγκριση των δύο επιφανειών.....	130
3.3.6 Κόκκινη περιοχή – σύγκριση των δύο επιφανειών.....	132
3.3.7 Άνω επιφάνειες – σύγκριση των δύο περιοχών .....	134
3.3.8 Κάτω επιφάνειες – σύγκριση των δύο περιοχών.....	136
3.4 Ηλεκτρονιογραφίες SEM .....	138
3.5 Στοιχειακή ανάλυση με SEM-EDX .....	152
3.6 Ανάλυση φασμάτων απορρόφησης από εκχυλίσματα πετάλων .....	157
3.7 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών ανθοκυανινών .....	163
3.8 Ποσοτικός προσδιορισμός «ολικών φλαβονοειδών».....	165
3.9 Ποσοτικός προσδιορισμός χλωροφυλλών και ολικών καροτενοειδών.....	168
<b>4. Συζήτηση – Συμπεράσματα .....</b>	<b>171</b>
4.1 Μακροσκοπικές παρατηρήσεις.....	171
4.2 Οπτικές ιδιότητες άθικτων πετάλων .....	171
4.3 Ηλεκτρονιογραφίες SEM .....	172
4.4 Στοιχειακή ανάλυση EDX.....	173
4.5 Φάσματα εκχύλισης χρωστικών.....	173
4.6 Ανθοκυανίνες .....	175
4.7 Φλαβόνες και φλαβονόλες .....	176
4.8 Χλωροφύλλες και καροτενοειδή.....	177
4.9 Γενικά συμπεράσματα για τις οπτικές ιδιότητες .....	177
4.10 Προτάσεις για περαιτέρω διερεύνηση .....	178
<b>6. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>179</b>

## Πρόλογος – ευχαριστίες

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία εντάσσεται στο ευρύτερο πλαίσιο της μελέτης των οπτικών ιδιοτήτων των ανθέων, με εξέχουσα οπτική ιδιότητα το χρώμα τους. Έναυσμα για αυτήν την εργασία αποτέλεσε η σπανιότητα των μαύρων περιοχών στα άνθη, και ιδιαίτερα σε άγρια άνθη της Ελληνικής χλωρίδας. Σκοπός αυτής της εργασίας είναι να αποπειραθεί να διερευνήσει τις αιτίες που δημιουργούν το μαύρο χρώμα στα άνθη. Ως αντικείμενο μελέτης επιλέχθηκε η παπαρούνα (*Papaver rhoeas* L.), ένα κοινότατο και πολύ χαρακτηριστικό άνθος της Ελληνικής χλωρίδας. Τα πέταλα του συγκεκριμένου άνθους αποτελούνται από δύο κύριες χρωματικές περιοχές, μία κόκκινη και μία μαύρη. Κατά αυτόν τον τρόπο η περιπλάνηση γύρω από τις αιτίες (βιοχημικές και οπτικές) του μαύρου χρώματος πορεύεται μαζί με την παράλληλη μελέτη της κόκκινης περιοχής ως μέτρο σύγκρισης. Θεωρήθηκε καλό να προηγηθεί μία εκτενής μελέτη για τη βιοχημεία και τη φυσική του χρώματος στα άνθη προκειμένου να γίνει πληρέστερη και εμπειριστατωμένη προσέγγιση του στενότερου ερευνητικού αντικειμένου της παρούσας εργασίας. Το πειραματικό τμήμα της παρούσας εργασίας μοιράστηκε ανάμεσα στον τομέα Βοτανικής, του τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ και στο Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λέιζερ, ΙΤΕ και στη Μονάδα Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας «Βασίλης Γαλανόπουλος» του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Θα μπορούσαμε να πούμε ότι στην Αθήνα αποπειράθηκε μια «βιο-χημική» προσέγγιση του θέματος, ενώ στο Ηράκλειο Κρήτης αποπειράθηκε μια πιο «φυσική – οπτική» προσέγγιση του θέματος.

Στην πραγματοποίηση της συγκεκριμένης εργασίας συνέβαλαν μία σειρά από άνθρωποι, με τους οποίους είχα τη χαρά να συνεργαστώ. Το λιγότερο που οφείλω στον καθέναν από αυτούς είναι ένα «ευχαριστώ». Πρώτα από όλους οφείλω να ευχαριστήσω τη την επιβλέπουσα αυτής της εργασίας, την καθηγήτρια κα. Σοφία Ριζοπούλου για μια σειρά από λόγους. Επειδή μου έδωσε την ευκαιρία να μελετήσω ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα – το οποίο όσο περισσότερο μελετούσα, τόσο περισσότερο μου κινούσε το ενδιαφέρον, για όλη την καθοδήγησή της σε όσα σημεία χρειαζόταν και για την ευγενική, πρόθυμη και συνεργατική στάση της απέναντί μου σε όλη τη διάρκεια της εργασίας. Δύο σημεία για τα οποία θέλω να την ευχαριστήσω ιδιαίτερω είναι για την ευκαιρία που μου έδωσε να μπω για λίγες μέρες σε εργαστήρια του ΙΤΕ και του Τμήματος Βιολογίας Κρήτης, και επομένως την ευκαιρία να δω και άλλους ερευνητικούς χώρους, καθώς και για τις πολύ εύστοχες παρατηρήσεις της στο γραπτό κείμενο της εργασίας, οι οποίες πολλές φορές ξέφευγαν από αυστηρά επιστημονικά θέματα και αφορούσαν θέματα γλώσσας και έκφρασης. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στη δρ. Χρυσάνθη Χειμώνα που με υποστήριξε σε όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης διπλωματικής μου εργασίας σε όλα τα στάδιά της. Στην πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε περιλαμβάνονται η καθοδήγηση σε εργαστηριακές διαδικασίες, η επιλογή κατάλληλων μεθοδολογιών, η παροχή αναλυτικών σχολίων για το γραπτό κείμενο, αλλά και οι αρκετές φορές που με βοήθησε σε ποικίλης φύσης πρακτικά ζητήματα.

Ένα ευχαριστώ οφείλω και σε τρία άτομα από το Ηράκλειο Κρήτης που η συμβολή τους ήταν καθοριστική. Τον δρ. Μανόλη Στρατάκη, ο οποίος ακόμα και από μια σύντομη συνάντησή μας κατάλαβε τη φύση του αντικειμένου που θα μελετούσα και έδωσε τις

κατάλληλες ερευνητικές κατευθύνσεις για το τμήμα της εργαστηριακής δουλειάς που πραγματοποιήθηκε στο Ηράκλειο. Επιπλέον ένα μεγάλο ευχαριστώ στον υποψήφιο δρ. Ευθύμη Σεραπετζόγλου και τον δρ. Στέφανο Παπαδάκη για την πρακτική βοήθεια που μου προσέφεραν κατά τον χειρισμό του φασματοφωτόμετρου και του SEM αντίστοιχα, καθώς και για την προθυμία με την οποία την προσέφεραν. Ένα ευχαριστώ για τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου βοτανικής με τα οποία συνυπήρξα (την επίκουρη καθηγήτρια κα. Μαρία-Σόνια Μελετίου-Χρήστου, τους υποψήφιους διδάκτορες Σοφία Παπαδοπούλου και Γιάννη Πούρη και τις διπλωματικές συμφοιτήτριές μου Βίβιαν Αλευρογιάννη, Μαρία Καραούλια και Μαρία Μόσχου) για το φιλικό και ευχάριστο κλίμα που είχαμε, καθώς και για όσες στιγμές χρειάστηκα τη βοήθειά τους. Ευχαριστώ τον δρ. Δημήτρη Γκίκα και την Έμμη Τσεκούρα για την πρόθυμη παροχή του κειμένου του διδακτορικού διπλώματος και της διπλωματικής εργασίας τους, αντίστοιχα, όταν τα χρειάστηκα. Ευχαριστώ επίσης τον επίκουρο καθηγητή κο. Ανδρέα Ρούσση που μου επέτρεψε να πραγματοποιήσω κάποιες μετρήσεις κατά τη διάρκεια του εργαστηρίου του, την υπάλληλο της βιβλιοθήκης του μουσείου Γουλανδρή Φυσικής Ιστορίας κα Ζωή Νάστα για την πολύ πρόθυμη και βοηθητική της στάση όταν έψαχνα βιβλιογραφία, και τον δρ. Νίκο Πάγκα από τη Φιλοδοσική Ένωση Αθηνών για την πολύ πρόθυμη στάση του για συνεργασία, αν και κάτι τέτοιο εν τέλει δεν προέκυψε. Τελευταίο και πολύ μεγάλο ευχαριστώ στα άτομα του οικογενειακού και φιλικού μου περιβάλλοντος που με βοήθησαν – ο καθένας με τον τρόπο του – σε καθημερινό και ανεκτίμητο βαθμό.

## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Στοιχεία θεωρίας χρώματος και η θέση του μαύρου

Με την έννοια του χρώματος (colour ή color) μπορεί να εννοούνται συνήθως τρεις διαφορετικές έννοιες με τελείως διαφορετικές ιδιότητες. Αυτές περιλαμβάνουν το χρώμα ως χαρακτηριστικό των ακτίνων φωτός, το χρώμα ως ιδιότητα των αντικειμένων και το χρώμα υπό το πρίσμα της ανθρώπινης αντίληψης και πρόσληψης. Η έννοια του μαύρου αναπαριστά κάτι διαφορετικό σε κάθε περίπτωση. Στην περίπτωση του χρώματος του φωτός, το μαύρο σημαίνει την πλήρη απουσία φωτός. Στην περίπτωση του χρώματος των αντικειμένων, το μαύρο αναλογεί σε ένα αντικείμενο με μηδενική διαφάνεια και μηδενική ανάκλαση. Για την αντίληψη του ανθρώπου μαύρο σημαίνει την πλήρη απουσία οπτικού ερεθίσματος, δηλαδή η πλήρης απουσία φωτεινού ερεθίσματος του οφθαλμού οδηγεί στην αντίληψη του μαύρου χρώματος από την εγκέφαλο. (Nassau 1983; Thacker 2013). Στην πραγματικότητα οι φιλοσοφικές προεκτάσεις της «φύσης» του μαύρου, δηλαδή αν το μαύρο συμβολίζει την πλήρη απουσία ύλης ή κατά πόσο αποτελεί έργο τέχνης έχει απασχολήσει διαχρονικά καλλιτέχνες και θεωρητικούς της τέχνης από τον 17<sup>ο</sup> αιώνα έως σήμερα (Thacker 2013).

Τα χρώματα έχουν διαφορετική συμπεριφορά ανάλογα με την φύση της προέλευσής τους. Όταν πρόκειται για φωτεινές ακτίνες, η ανάμιξη ακτίνων φωτός με τα κύρια χρώματα

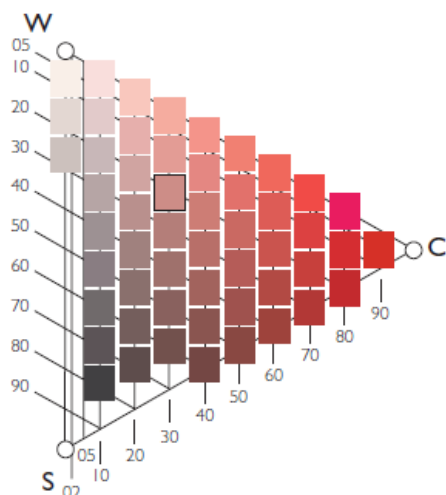


**Εικόνα 1.1: Αφαιρετικό πρότυπο ανάμιξης των χρωμάτων.** Το αφαιρετικό πρότυπο ανάμιξης των χρωμάτων εφαρμόζεται κατά την ανάμιξη των χρωστικών. Από την ανάμιξη των βασικών χρωμάτων (μπλε, κίτρινο, κόκκινο), που βρίσκονται περιφερειακά στην εικόνα, σε ίσες αναλογίες προκύπτει στο κέντρο ένα χρώμα το οποίο θεωρητικά αντιστοιχεί στο μαύρο, αλλά πρακτικά πρόκειται για ένα πολύ σκούρο χρώμα πάρα πολύ χαμηλού κορεσμού (εικόνα από

οδηγεί σε άσπρο χρώμα. Αυτό ονομάζεται προσθετικό μοντέλο ανάμιξης των χρωμάτων (adding color mixing) επειδή το άσπρο προκύπτει από την πρόσθεση των χρωμάτων και το μαύρο από την απουσία τους. Όταν πρόκειται όμως για το χρώμα αντικειμένων, όπως κατά την ανάμιξη χρωστικών, τότε η ανάμιξη χρωστικών διαφορετικών (συμπληρωματικών) χρωμάτων οδηγεί – θεωρητικά – στο μαύρο (Εικόνα 1.1). Αυτό ονομάζεται αφαιρετικό μοντέλο ανάμιξης των χρωμάτων (subtractive color mixing) γιατί η πρόσθεση των χρωμάτων οδηγεί στο μαύρο και η απουσία τους (αφαίρεση) στο άσπρο. Αυτή η διαφοροποίηση οφείλονται στον τρόπο

με τον οποίο προκύπτει το χρώμα από τις χρωστικές. Σε γενικές γραμμές το χρώμα μιας χρωστικής αντιστοιχεί στο τμήμα του ορατού φάσματος το οποίο ανακλάται, ενώ το υπόλοιπο τμήμα του φάσματος απορροφάται από τη χρωστική. Όταν αναμιγνύονται χρωστικές συμπληρωματικών χρωμάτων, τότε κάθε μία απορροφά σε διαφορετική περιοχή του ορατού φάσματος, με αποτέλεσμα να απορροφάται συνολικά όλο το μέρος του ορατού φάσματος, δηλαδή όλη η ποσότητα του ορατού φωτός που προσπίπτει. Το αποτέλεσμα

είναι να μην ανακλάται καθόλου ορατό φως, και άρα η απουσία ακτίνων φωτός οδηγεί στο μαύρο χρώμα. Ωστόσο στην πράξη, από την ανάμιξη συμπληρωματικών χρωστικών δεν προκύπτει μαύρο χρώμα αλλά ένα σκούρο γκρι (Εικόνα 1.1). Αυτός είναι ο λόγος που η ύπαρξη τριών βασικών χρωμάτων δεν επαρκεί για τη ρεαλιστική απόδοση όλων των χρωμάτων και προστίθεται ένα τέταρτο χρώμα, το μαύρο, όπως π.χ. στην έγχρωμη εκτύπωση. Εφέ προσθετικού μοντέλου ανάμιξης χρωμάτων με τη χρήση χρωστικών μπορεί



**Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση για τις έννοιες της απόχρωσης, του κορεσμού και της λαμπρότητας.**

Απεικόνιση των παραμέτρων του χρώματος σύμφωνα με το σύστημα του NCS. Χάρην απλούστευσης το σχήμα θα αναλυθεί αποκλειστικά με τις έννοιες της απόχρωσης, του κορεσμού και της λαμπρότητας. Όλα τα εικονιζόμενα χρώματα ανήκουν στην ίδια απόχρωση, συγκεκριμένα μια απόχρωση του κόκκινου, αλλά με κυμαινόμενες τιμές κορεσμού και λαμπρότητας. Πιο συγκεκριμένα ο κορεσμός αυξάνεται από τα αριστερά προς τα δεξιά δίνοντας πιο καθαρά χρώματα, αλλά μένει σταθερός μέσα στην ίδια στήλη. Η λαμπρότητα αυξάνεται από κάτω προς τα επάνω σε κάθε στήλη δίνοντας πιο φωτεινά χρώματα. Οι τιμές του πλάγιου άξονα μπορούν να θεωρηθούν εκατοστιαίες τιμές του κορεσμού (κορεσμός%), ενώ οι τιμές στον κατακόρυφο άξονα μπορούν να θεωρηθούν τιμές του 100%-λαμπρότητα% (εικόνα από Brainard 2003).

να δημιουργηθεί με την τεχνική του πουαντιγισμού (pointillism), η οποία οδηγεί σε πιο φωτεινά χρώματα (Nassau 1983).

Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα για την περιγραφή του χρώματος. Ένα από αυτά τα μοντέλα περιγράφει το κάθε χρώμα με τρεις έννοιες: την απόχρωση (hue), τον κορεσμό (saturation) και την λαμπρότητα (brightness). Η απόχρωση εκφράζει το κύριο χρώμα, όπως π.χ. κόκκινο, πορτοκαλί, κίτρινο, μπλε, τυρκουάζ. Η απόχρωση προκύπτει από τα χρώματα όπως εκφράζονται από τα χρώματα που συναντώνται στην έκταση του ορατού φάσματος. Ο κορεσμός εκφράζει πόσο «καθαρό» είναι κάποιο χρώμα. Ο μεγάλος κορεσμός προσδίδει μια πιο καθαρή και σαφή αίσθηση του χρώματος που λαμβάνει ο θεατής. Ο μικρός κορεσμός εκφράζει πόσο λευκό έχει αναμιχθεί στο χρώμα, αν αναφερόμαστε σε φως, ή πόσο μαύρο έχει αναμιχθεί στο χρώμα, αν μιλάμε για χρωστική. Δηλαδή όσο μειώνεται ο κορεσμός, τόσο προσεγγίζει το χρώμα το αποτέλεσμα της ανάμιξης (προσθετικής ή αφαιρετικής) όλων των χρωμάτων. Το αποτέλεσμα του μικρού κορεσμού είναι ένα πιο ασαφές και πιο άτονο χρώμα. Για παράδειγμα μια χρωστική με λαδί χρώμα χαρακτηρίζεται από πράσινη απόχρωση και μικρό κορεσμό και αντίστοιχα κίτρινη ή κόκκινη χρωστική με μικρό κορεσμό που μπορεί να έχει καφέ αποτέλεσμα. Η λαμπρότητα αναφέρεται στην ένταση της ακτινοβολίας αν αναφερόμαστε σε φως. Στις χρωστικές η μεγάλη λαμπρότητα αντιστοιχεί σε ένα πιο ανοιχτό χρώμα, προς το άσπρο, ενώ μικρή λαμπρότητα σε ένα πιο σκούρο χρώμα, προς το μαύρο. Για παράδειγμα μια ροζ χρωστική χαρακτηρίζεται από κόκκινη απόχρωση και μεγάλη λαμπρότητα. Το άσπρο αντιστοιχεί στη μέγιστη λαμπρότητα και το μαύρο σε μηδενική.



Απουσία απόχρωσης και ενδιάμεσες τιμές λαμπρότητας οδηγούν στους διάφορους τόνους του γκρι. (Brainard 2003) Το λευκό, το μαύρο και το γκρι χαρακτηρίζονται και ως αχρωματικά (achromatic) χρώματα, αν και μια τέτοια προσέγγιση οδηγεί στη θεώρηση του μαύρου ως μη-χρώμα (Thacker 2013). Σε πραγματικές συνθήκες η αίσθηση του χρώματος επηρεάζεται έντονα από το χρωματικό του περιβάλλον. Υπό αυτές τις συνθήκες σχετικότητας ο κορεσμός και η λαμπρότητα αντικαθίστανται από τις συγγενείς, αλλά σχετικές, έννοιες του χρώματος (chroma) και της φωτεινότητας (lightness) αντίστοιχα (Nassau 1983, Shevell 2003). Οι έννοιες της απόχρωσης, του κορεσμού, του χρώματος, της λαμπρότητας και της φωτεινότητας μπορούν να περιγραφούν με αυστηρές μαθηματικές εκφράσεις. Επιπλέον μπορούν να απεικονιστούν με διάφορα συστήματα, όπως το Σουηδικό σύστημα των φυσικών χρωμάτων (Swedish Natural Colour System – NCS) (Εικόνα 1.2) (Brainard 2003).

## 1.2 Η φυσική και η χημεία του μαύρου χρώματος

### 1.2.1 Η φυσική του μαύρου

Το μαύρο χρώμα εμφανίζεται σε αρκετές περιπτώσεις σε ποικίλα φυσικά (βιολογικά ή μη) και τεχνητά υλικά. Από άποψη φυσικής ο μαύρος χρωματισμός ενός σώματος προκύπτει όταν το λευκό φως που προσπίπτει σε ένα σώμα απορροφάται σε μεγάλο βαθμό από το υλικό για όλο το εύρος του ορατού φωτός. Ως εκ τούτου το ανακλώμενο φως είναι λίγο και δεν υπερτερεί κάποια φασματική (χρωματική) χροιά, με αποτέλεσμα να δίνεται η αίσθηση του μαύρου. Οι φυσικοί μηχανισμοί που μπορεί να προκαλούν τον μαύρο χρωματισμό ποικίλλουν και ανάλογα με το υλικό μπορεί να περιλαμβάνουν χρώμα λόγω μοριακών τροχιακών (molecular orbitals) στα χρωμοφόρα (chromophores) οργανικών ενώσεων, χρώμα λόγω μεταφοράς φορτίου (charge transfer), περιπτώσεις χρώματος σε ημιαγωγούς (semiconductors) και χρώμα λόγω χρωματικών κέντρων (color centers) (Nassau 1983, 2003).

Σε μηχανισμό μεταφοράς φορτίου (charge transfer) οφείλεται το μαύρο και γενικότερα σκούρο χρώμα πολλών οξειδίων μετάλλων μετάπτωσης (transition metal oxides), όπως στον μαγνητίτη (magnetite)  $Fe_3O_4$ . Κατά τον μηχανισμό αυτόν η απορρόφηση ενός φωτονίου προκαλεί την μετακίνηση ενός ηλεκτρονίου από ένα μεταλλικό ιόν σε ένα άλλο, με αποτέλεσμα την προσωρινή μεταβολή του σθένους (valence) και των δύο ιόντων. Σε αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να συμμετέχουν ιόντα δύο διαφορετικών μετάλλων μετάπτωσης (ετεροπυρηνική - heteronuclear - μεταφορά φορτίου) ή μόνο ένα στοιχείο μετάπτωσης (ομοπυρηνική - homonuclear - μεταφορά φορτίου). Το  $Fe_3O_4$  αποτελεί περίπτωση ομοπυρηνικού τύπου στον οποίο συμμετέχουν δύο διαφορετικές καταστάσεις σθένους του σιδήρου ( $Fe^{2+}$  και  $Fe^{3+}$ ). Θεωρούμε δύο ιόντα σε δύο διαφορετικές θέσεις A και B σε μία κρυσταλλική διάταξη του  $Fe_3O_4$ , οι οποίες δεν είναι ταυτόσημες μέσα στην κρυσταλλική δομή. Η απορρόφηση ενός φωτονίου προκαλεί τη μεταφορά  $(Fe^{2+})_A + (Fe^{3+})_B \rightarrow (Fe^{3+})_A + (Fe^{2+})_B$ . Επειδή οι δύο θέσεις δεν είναι ταυτόσημες, οι δύο διαμορφώσεις όπως περιγράφονται από τα δύο σκέλη της εξίσωσης είναι ανόμοιες ενεργειακά. Το δεξί μέλος της εξίσωσης αντιστοιχεί σε υψηλότερη ενεργειακή στάθμη σε σχέση με το αριστερό και από την απορρόφηση του φωτός προκαλείται το μαύρο χρώμα. Στην πραγματικότητα το  $Fe_3O_4$  θα μπορούσε να γραφεί ως  $Fe^{II}O \cdot Fe^{III}_2O_3$  ώστε να αντικατοπτρίζονται οι δύο καταστάσεις σθένους του κρυστάλλου (Nassau 1983, 2003). Ο γραφίτης (graphite) αποτελείται αποκλειστικά από άτομα άνθρακα τα οποία σχηματίζουν επίπεδα παράλληλα φύλλα (sheets) από συνδεδεμένους δακτυλίους τύπου βενζολίου. Τα φύλλα συγκρατούνται μεταξύ τους με ασθενείς ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις Van der Waals. Το σύστημα συζευγμένων π-δεσμών που προκύπτει σε κάθε φύλλο επιτρέπει την ελεύθερη κίνηση ηλεκτρονίων εντός του φύλλου. Αυτή η μεταφορά φορτίων ευθύνεται για το μαύρο χρώμα του γραφίτη, όπως και την ηλεκτρική του αγωγιμότητα. Οι διάφορες μορφές άμορφου μαύρου άνθρακα, όπως το κάρβουνο, είναι μικροκρυσταλλικές (microcrystalline) δομές τμημάτων γραφίτη ποικίλου μεγέθους (Nassau 1983). Στον μηχανισμό της μεταφοράς φορτίου βασίζεται η τακτική προσθήκης σουλφιδίων σιδήρου ( $Fe_xS_y$ ), βαναδίου ( $V^V$ ) ή χρωμίου ( $Cr^{VI}$ ) στο γυαλί ώστε να αποδοθεί μαύρη χροιά. Άλλα στοιχεία μετάπτωσης που χρησιμοποιούνται στην υαλουργία είναι το κοβάλτιο και το νικέλιο, η προσθήκη των οποίων προκαλεί ολική απορρόφηση στο ορατό φάσμα, άρα μαύρο χρώμα, αλλά αφήνει το

υπεριώδες να διέλθει. Ο μηχανισμός ωστόσο παραγωγής του μαύρου χρώματος στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι κάπως διαφορετικός (Nassau 1983). Μια ιδιαίτερη περίπτωση παροδικής εμφάνισης μαύρου χρώματος παρατηρείται στα φωτοχρωμικά (photochromic) γυαλιά. Κατά την έκθεση των γυαλιών αυτών σε πηγή φωτός συμβαίνει φωτοχημική διάσπαση του  $\text{AgCl}$  σε  $\text{Ag}$  και  $\text{Cl}_2$ . Τα άτομα του αργύρου ( $\text{Ag}$ ) ευθύνονται για τον σκούρο χρωματισμό. Με την απομάκρυνση του φωτός, ο χλωριούχος άργυρος επανασχηματίζεται και το γυαλί αποχρωματίζεται. Άλλη χημική αντίδραση που μπορεί να συμβαίνει από τη συνύπαρξη αλάτων αργύρου και χαλκού για το φωτοχημικό σκοτεινιάσμα του γυαλιού είναι η  $\text{Ag}^+ + \text{Cu}^+ \rightarrow \text{Ag} + \text{Cu}^{2+}$  (Nassau 1983).

Το μαύρο χρώμα σε ημιαγωγούς, όπως και άλλα χρώματα, ερμηνεύεται πολλές φορές με τη θεωρία του ενεργειακού χάσματος (band gap). Αυτή η θεωρία εφαρμόζεται σε περιπτώσεις κατά τις οποίες ακριβώς τέσσερα ηλεκτρόνια σθένους (valence electrons) ανά άτομο είναι διαθέσιμα στη ζώνη (band) ενός άλλου χημικού στοιχείου ή ένωσης. Το αποτέλεσμα είναι η χαμηλότερη ενεργειακά ζώνη (ζώνη σθένους-valence band) να είναι ακριβώς πλήρης ηλεκτρονίων ενώ η ανώτερη ενεργειακά ζώνη (ζώνη αγωγιμότητας-conduction band) είναι ακριβώς άδεια. Η ενεργειακή απόσταση μεταξύ των ορίων των δύο αυτών ζωνών καλείται ενεργειακό χάσμα (energy band gap). Όταν η ενέργεια ενός φωτονίου που προσπίπτει πάνω στον ημιαγωγό είναι ίση ή μεγαλύτερη από το ενεργειακό χάσμα του ημιαγωγού, τότε το φωτόνιο απορροφάται, και ένα ηλεκτρόνιο μπορεί να μεταφερθεί από τη ζώνη σθένους στη ζώνη αγωγιμότητας. Αν το ενεργειακό χάσμα είναι πολύ μεγάλο, όπως 5,4 eV στο διαμάντι, τότε καμιά ακτινοβολία του ορατού φάσματος δεν έχει την απαραίτητη ενέργεια ώστε να απορροφηθεί και το αποτέλεσμα είναι διαφάνεια. Αν το ενεργειακό χάσμα είναι πολύ μικρό (μικρότερο από 1,77 eV), τότε όλα τα χρώματα του ορατού φάσματος φέρουν την απαραίτητη ενέργεια και απορροφώνται από τα ηλεκτρόνια, με αποτέλεσμα την εμφάνιση μαύρου χρωματισμού. Με αυτόν τον μηχανισμό μπορεί να προκύψει μαύρο χρώμα στη μετακιννάβαρη (metacinnabar -  $\text{HgS}$ ), το πυρίτιο ( $\text{Si}$ ), τον γαληνίτη (galena -  $\text{PbS}$ ) και το γερμάνιο ( $\text{Ge}$ ) (Nassau 1983, 2003, Orna 2013). Στον μηχανισμό παραγωγής χρώματος σε ημιαγωγούς βασίζεται η τακτική προσθήκης σουλφιδιο-σεληνίδιο του καδμίου ( $\text{Cd}_x\text{S}_y\text{Se}_z$ ) στο γυαλί ώστε να αποδοθεί μαύρη χροιά (Nassau 1983).



**Εικόνα 1.3: Καπνίας χαλαζίας.** Το σκούρο χρώμα του καπνία χαλαζία οφείλεται στη δράση χρωματικών κέντρων (εικόνα από Nassau 1983).

Ένας άλλος μηχανισμός από τον οποίο μπορεί να προκύψει μαύρο χρώμα, είναι η συμμετοχή κάποιου κέντρου χρώματος (color center). Ο μηχανισμός συγγενεύει με τους μηχανισμούς παραγωγής χρώματος σε μέταλλα και ημιαγωγούς και προκύπτει από άχρωμα υλικά τα οποία εκτίθενται σε ακτινοβολία. Η διάρκεια του χρώματος ενδέχεται να έχει περιορισμένη διάρκεια. Θεωρούμε σε ένα αρχικά άχρωμο υλικό, δύο θέσεις A και B. Ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από τη θέση A στη θέση B, προκαλώντας ένα έλλειμμα ηλεκτρονίων  $A^+$  (οπή – θετική περίσσεια φορτίου) και μία περίσσεια ηλεκτρονίων  $B^-$  (αρνητική περίσσεια φορτίου). Είτε το  $A^+$ , είτε το  $B^-$ , είτε και οι δύο θέσεις μπορούν να δράσουν ως κέντρα χρώματος, απορροφώντας ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος και προσδίδοντας χρώμα στο υλικό. Με θέρμανση τα ηλεκτρόνια επιστρέφουν στην αρχική τους θέση και ο χρωματισμός χάνεται. Σε αυτόν τον

μηχανισμό οφείλεται ο πολύ σκούρος χρωματισμός του καπνία χαλαζία (smoky quartz). Εν γένει ο χαλαζίας αποτελείται από  $\text{SiO}_2$  με περιστασιακή παρουσία  $\text{Al}^{3+}$ . Μετά την επίδραση ακτινοβολίας (π.χ. ακτινοβολία X ή γ) απομακρύνεται ένα ηλεκτρόνιο από την ενότητα  $[\text{AlO}_4]^{5-}$  και μετατρέπεται σε  $[\text{AlO}_4]^{4-}$ , η οποία λειτουργεί ως οπή. Η οπή αυτή είναι υπεύθυνη για το σκούρο γκριζο, προς καφέ ή μαύρο χρώμα του καπνία χαλαζία (Εικόνα 1.3) (Nassau 1983, 2003).

Στα βιολογικά υλικά το μαύρο χρώμα προέρχεται από οργανικά μόρια – χρωστικές. Οι οργανικές χρωστικές περιέχουν συγκεκριμένες ομάδες στα μόριά τους, που καλούνται χρωμοφόρα (chromophores), οι οποίες ευθύνονται για την απορρόφηση των φωτονίων το χρώμα των μορίων. Ως κέντρο των χρωμοφόρων θεωρούνται διπλοί δεσμοί μεταξύ δύο ατόμων άνθρακα, αλλά και ανάμεσα σε δύο άτομα αζώτου, σε άζωτο και άνθρακα, και άνθρακα και θείο. Ιδιαίτερη σημασία έχουν τα συστήματα συζυγών δεσμών άνθρακα. Συχνά τα μόρια των οργανικών χρωστικών χαρακτηρίζονται από το φαινόμενο του συντονισμού (resonance). Το χρώμα επηρεάζεται από τα αυξοχρώματα (auxochromes) δηλαδή ομάδες των οργανικών μορίων οι οποίες προκαλούν τροποποιήσεις του χρώματος. Μεταξύ άλλων, στα αυξοχρώματα περιλαμβάνονται οι μεθυλομάδες, οι υδροξυλομάδες, οι αμινομάδες και τα αλογόνα στοιχεία. Το χρώμα παράγεται από την απορρόφηση φωτονίων από τα μόρια της χρωστικής, τα οποία προκαλούν ανακατανομή των ηλεκτρονίων στα μοριακά τροχιακά (molecular orbitals) της ένωσης. Στις ενώσεις αυτές περιλαμβάνονται ενώσεις όπως οι φυτικές χρωστικές καροτενοειδή, χλωροφύλλες, και φλαβονοειδή και οι σκούρες ζωικές καφέ-μαύρες μελανίνες (melanins) (Nassau 1983, 2003).

### 1.2.2 Η χημεία του μαύρου

Στην πορεία του χρόνου ο άνθρωπος έχει χρησιμοποιήσει μια σειρά από βαφές (dyes) και χρωστικές (pigments) για να επιτύχει το μαύρο χρώμα. Πολλές από αυτές βασίζονται στον ανόργανο άνθρακα. Ήδη από την προϊστορική εποχή έχουν χρησιμοποιηθεί επεξεργασμένες βαφές μαύρου χρώματος όπως μαρτυρείται από σπηλαιογραφίες. Σε αυτές περιλαμβάνεται κάρβουνο (charcoal) που έχει προκύψει από ειδική ατελή καύση σκληρών ξύλων (Orna 2013). Μια ακόμα μορφή μαύρου χρώματος γνωστού από την αρχαιότητα είναι το μαύρο του λύχνου (lamp black), το οποίο πρόκειται για μια μορφή σχεδόν καθαρού άμορφου άνθρακα. Η διαδικασία παρασκευής του περιγράφεται από τον Πλίνιο τον Πρεσβύτερο κατά τον 1<sup>ο</sup> μ.Χ. (Orna 2013). Άλλη μορφή κατεργασμένης μαύρης χρωστικής με βάση τον άνθρακα είναι το μαύρο των οστών (bone black) που παράγεται από οστά ως πρώτη ύλη (Nassau 1983). Ορυκτά μαύρα χρώματα φυσικής προέλευσης με βάση τον άνθρακα περιλαμβάνουν την άσφαλτο (asphalt), τον γαιάνθρακα (coal) και τον γραφίτη (graphite) (Nassau 1983).

Εκτός από τις ανόργανες χρωστικές με βάση τον άνθρακα, κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιηθεί και πολλές ακόμα ανόργανες μαύρες χρωστικές οι οποίες δεν περιέχουν άνθρακα. Ήδη στην προϊστορική εποχή έχει βρεθεί η χρήση φυσικού διοξειδίου του μαγγανίου (manganese dioxide –  $\text{MnO}_2$ ) ως μαύρη χρωστική σε σπηλαιογραφίες (Orna 2013). Στην αρχαία Αίγυπτο χρησιμοποιούσαν σκόνη μαύρου γαληνίτη ( $\text{PbS}$ ) κατά τον καλλωπισμό του προσώπου (Orna 2013). Μία ακόμα μαύρη χρωστική με το όνομα «ορυκτό των Αιθίοπων» (ethiops mineral), λόγω του χρώματός της, που προκύπτει κατά την ανάμιξη

και θέρμανση υδράργυρου και θείου εμφανίζεται στην Ευρώπη κατά τον Μεσαίωνα, αλλά φαίνεται να έχει πανάρχαια κινεζική προέλευση (Orna 2013). Περαιτέρω επεξεργασία του υλικού αυτού οδηγεί στην παραγωγή ευρέως χρησιμοποιούμενης κόκκινης χρωστικής HgS (βερμίλιο – vermilion) (Orna 2013). Λοιπές ανόργανες μαύρες χρωστικές περιλαμβάνουν το μαύρο του οξειδίου του σιδήρου  $Fe_3O_4$  (iron oxide black) και το μαύρο του χρωμίτη του χαλκού  $CuCr_2O_4$  (copper chromite black) (Nassau 1983).

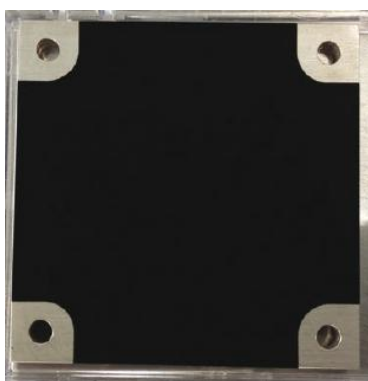
Πολλές μαύρες χρωστικές ανήκουν στις οργανικές ενώσεις και αρκετές βρίσκονται σε εμπορική χρήση ως βαφές ακόμα και σήμερα. Μια οργανική μαύρη χρωστική με φυσική προέλευση, η οποία χρησιμοποιείται ακόμα στις μέρες μας για τις βαφές κάποιων υφασμάτων είναι το μαύρο του αιματόξυλου (Logwood black). Αν και γνωστό περίπου από το 1500, μόλις τον 19<sup>ο</sup> αιώνα απέκτησε ουσιαστική σημασία. Πρόκειται για μια χρωστική που προέρχεται από το καρδιάξυλο του *Haematoxylon campechianum* L. (Logwood – μπακάμι), στο οποίο προστίθεται χρώμιο για να του προσδώσει μια μαύρη χροιά (Gordon and Gregory 1987). Μια σημαντική κατηγορία οργανικών χρωστικών είναι τα μαύρα της ανιλίνης (aniline blacks), οι οποίες ανακαλύφθηκαν τον 19<sup>ο</sup> αιώνα. Χρησιμοποιούνται στη βαφή υφασμάτων και παράγονται απευθείας πάνω στο ύφασμα από την οξείδωση της ανιλίνης. Χρησιμοποιούνται ακόμα ευρέως για την βαφή των βαμβακερών (Gordon and Gregory 1987). Προερχόμενη από διαφορετική χημική κατηγορία οργανικών χρωστικών το μαύρο του θείου (sulphur black), όπως το CI Sulphur Black 1, είναι η πιο σημαντική χρωστική στις μέρες μας από τις βαφές του θείου. Ωστόσο η χημική σύσταση της βαφής αυτής παραμένει ασαφής (Gordon and Gregory 1987, Christie 2001). Στη μεγάλη κατηγορία των άζω-βαφών (azo dyes), οι οποίες ως χρωμοφόρο φέρουν δύο άτομα αζώτου ενωμένα με διπλό δεσμό, εντάσσεται και η μπλε-μαύρη διαζω-βαφή (diaz) των βαμβακερών CI Acid Black1 (Gordon and Gregory 1987, Christie 2001). Στην κατηγορία των βαφών ανθρακινόνης με μέταλλα (metallised anthraquinone dyes) εντάσσεται η χρωστική που προκύπτει από την ανάμιξη τρισθενούς σιδήρου με αλιζαρίνη (alizarin), μια υδροξυ-ανθρακινόνη, η οποία έχει καφέ –μαύρο χρώμα (Gordon and Gregory 1987). Στην ομάδα των βαφών καρβαζολίου (carbazole) και τύπου ίντιγκο (intigoid) περιλαμβάνονται οι εμπορικές βαφές CI Vat Black 27 και CI Vat Black 1 αντίστοιχα (Gordon and Gregory 1987). Σε κάθε περίπτωση μαύρο χρώμα μπορεί να επιτευχθεί και από ανάμιξη χρωστικών (Orna 2013).

### 1.2.3 Υπερ-μαύρο

Κατά το πέρασμα των αιώνων ο άνθρωπος έχει κατασκευάσει διάφορα είδη μαύρων χρωστικών. Ωστόσο πρακτικοί επιστημονικοί και τεχνολογικοί λόγοι επιτάσσουν τη δημιουργία ενός ακόμα πιο μαύρου χρώματος, δηλαδή επιφανειών με ακόμα μικρότερη ανάκλαση. Για χρόνια η NASA χρησιμοποιούσε τη μαύρη χρωστική Dubbed Z306 με ανάκλαση 3,5%. Τα τελευταία χρόνια αυτό το όριο του μαύρου έχει σπάσει και έχουν δημιουργηθεί υλικά με πολύ μικρή ανάκλαση, που αντιστοιχούν στην έννοια του υπερ-μαύρου (super black) (Cartwright 2015).

Πρακτικές ανάγκες για τέτοιου είδους μαύρα υπάρχουν σε κλάδους όπως η διαστημική, η αεροναυπηγική και η στρατιωτική τεχνολογία. Το 2007 ο φυσικός John Hagorian ξεκίνησε έρευνα πάνω στη δημιουργία ενός τέτοιου υλικού με τη χρήση νανοσωλήνων (nanotubes) άνθρακα. Αυτοί οι νανοσωλήνες αποτελούνται από τη βασική εξαγωνική δομή που

απαντάται και στον γραφίτη και οι διαστάσεις τους κυμαίνονται στη νανοκλίμακα. Η καινοτομία του Hagoriban ήταν να καταφέρει να τοποθετήσει ένα στρώμα από τέτοιους νανοσωλήνες επάνω σε ένα υπόστρωμα, κατά τέτοιον τρόπο ώστε οι νανοσωλήνες να βρίσκονται ορθωμένοι, κάθετοι προς το υπόστρωμα. Το αποτέλεσμα ήταν η δημιουργία ενός εξαιρετικά μαύρου υλικού με ανάκλαση μόλις 0,5 %. Το φως που απορροφάται μετατρέπεται εν τέλει σε θερμότητα. Παράλληλα μια δεύτερη ερευνητική ομάδα υπό τον φυσικό Swan-Yu Lin δουλεύοντας με παρόμοιους κάθετα τοποθετημένους νανοσωλήνες άνθρακα κατάφεραν να κατασκευάσουν το 2008 ένα μαύρο υλικό με ανάκλαση 0,045 %, το οποίο χαρακτηρίστηκε ως το πιο μαύρο μαύρο (the blackest black) (Cartwright 2015).



**Εικόνα 1.4:** Το μαύρο Vantablack. Το πιο μαύρο χρώμα πρόκειται για μια νανοτεχνολογική επίστρωση με δομικό χαρακτήρα (εικόνα από Cartwright 2015).

Τη σκυτάλη για το πιο μαύρο μαύρο πήρε το υλικό Vantablack (Εικόνα 1.4), που κατασκευάστηκε το 2012 στο Εθνικό Εργαστήριο Φυσικής (National Physical Laboratory – NPL) στο Teddington του Ηνωμένου Βασιλείου και της εταιρείας Surrey NanoSystems (Cartwright 2015). Το πρόθεμα Vanta είναι το ακρωνύμιο από το vertically aligned nanotube arrays, δηλαδή σειρές από κάθετα διευθετημένους νανοσωλήνες (Cartwright 2015, Bailey 2016). Αποτελείται από ένα πολύ λεπτό στρώμα από νανοσωλήνες άνθρακα που τοποθετούνται κάθετα στο υπόστρωμα. Στην ουσία αποτελεί μια επικάλυψη για ένα μεγάλο εύρος άλλων υλικών. Καθώς το φως προσπίπτει ανακλάται διαρκώς μεταξύ των νανοσωλήνων έως ότου εξασθενεί σχεδόν πλήρως, και το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειάς του απορροφάται

από το υλικό ως θερμότητα. Η «βαφή» αυτή είναι διαθέσιμη και σε μορφή σπρέυ. (Bailey 2016). Η ελάχιστη ανάκλαση του υλικού αυτού αγγίζει το 0,035% και η τιμή αυτή το επαναπροσδιορίζει ως το πιο μαύρο υλικό του κόσμου (Cartwright 2015, Perkowitz 2016). Εκτός από τις πολλές τεχνολογικές προοπτικές που έχει, το Vantablack έχει κεντρίσει και το ενδιαφέρον καλλιτεχνών (Cartwright 2015, Ball 2016, Perkowitz 2016).

Εκτός από αυτά τα υλικά, δημιουργούνται και άλλα είδη μαύρου τα τελευταία χρόνια. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν οι χρωστικές M-Tone της εταιρείας PicOnyx Inc. Αποτελούνται από άμορφο κεραμικό υλικό που περιέχει ελεύθερο άνθρακα μέσα στην κεραμική δομή. Ο ελεύθερος άνθρακας δρα ως χρωμοφόρο προσδίδοντας μαύρο χρώμα. Μερικές από τις ιδιότητες του υλικού που του προσδίδουν πολλές δυνατότητες για τεχνολογικές εφαρμογές είναι η αντοχή του σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες όπως και η ιδιότητά του να μη σκονίζεται (Bailey 2016).

### 1.3 Μαύρο χρώμα στους ζωντανούς οργανισμούς με έμφαση στις μελανίνες

Το μαύρο χρώμα στους ζωντανούς οργανισμούς προκύπτει από σχετικές οργανικές ενώσεις – χρωστικές. Στα φυτά εν γένει δεν υπάρχουν πραγματικά μαύρες χρωστικές (με σπάνιες εξαιρέσεις όπως οι φυτομελανίνες) αλλά συνήθως πρόκειται για ανθοκυανίνες ή ταννίνες όπως παρουσιάζεται στη συνέχεια (Lee 2007).

Στους ζωικούς οργανισμούς υπεύθυνες για το μαύρο και το σκούρο χρώμα είναι συνήθως οι χρωστικές μελανίνες. Ως όρος αυτός είναι περισσότερο εμπειρικός παρά χημικός, γιατί οι μελανίνες περιλαμβάνουν μεγάλη χημική ποικιλότητα, η οποία δεν είναι πλήρως γνωστή. Γενικά προσδιορίζονται σαν σκούρες βιολογικές χρωστικές μεγάλου μοριακού βάρους (Swan 1974). Πρόκειται για ακανόνιστες (irregular) μεγαλομοριακές πολυμερείς ενώσεις οι οποίες περιλαμβάνουν συνήθως πολυμερή ινδολών, αλλά συχνά σε ανάμιξη με άλλες συναφείς μεταβολικές ενώσεις (Riley 1997). Γενικά οι μελανίνες μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις κατηγορίες: τις ευμελανίνες (eumelanins) που φέρουν άζωτο και αποτελούν τις κύριες σκούρες (καφέ και μαύρες) χρωστικές των ζώων, τις φαιομελανίνες (phaeomelanins), φέρουν άζωτο και θείο και έχουν κόκκινο ή κίτρινο χρώμα, και τις αλλομελανίνες (allomelanins), που δεν φέρουν άζωτο, έχουν συνήθως μαύρο χρώμα και απαντώνται σε μύκητες και στα σπέρματα κάποιων φυτών (Swan 1974, Hill 1992). Η σύνθεση της μελανίνης στα ζώα ξεκινά με την οξείδωση της τυροσίνης (Riley 1997). Σε ευμελανίνες οφείλεται το μαύρο χρώμα των τριχών και του δέρματος στον άνθρωπο, των φτερών στα πουλιά και το χρώμα στο μελάι της σουπιάς, ενώ σε φαιομελανίνες οφείλεται το χρώμα των κόκκινων τριχών του ανθρώπου. (Swan 1974). Οι ευμελανίνες είναι συχνά συνδεδεμένες με πρωτεΐνες, συνήθως είναι αδιάλυτες σε αρκετούς διαλύτες (Swan 1974) και σε στερεή κατάσταση δρουν ως ημιαγωγοί (Wolbarsht *et al.* 1981). Επιπρόσθετα οι ευμελανίνες έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και ιδιαίτερα ενάντια στη φωτο-οξείδωση (Hill 1992, Riley 1997)

Στα σπονδυλόζωα οι μελανίνες συντίθεται σε ειδικά κύτταρα, τα μελανοκύτταρα (melanocytes) σε ειδικά οργανίδια που συνδέονται στη μεμβράνη, τα μελανοσώματα (melanosomes). Όταν στα θηλαστικά οι μελανίνες μεταφέρονται στα επιδερμικά κύτταρα αυτό συμβαίνει με ειδικό σύστημα μεταφοράς (Hill 1992, Riley 1997). Η απορρόφηση των μελανινών εκτείνεται στο ορατό και στο υπεριώδες φάσμα και οφείλεται στους καρβονυλικούς δεσμούς και στους ακόρεστους δεσμούς άνθρακα-άνθρακα. Η περιεκτικότητα σε συζυγείς δεσμούς στο σύστημα των πολυμερισμένων ινδολών, κάνει το φάσμα απορρόφησης των ευμελανινών να εκτείνεται και στην κόκκινη περιοχή. Για αυτόν τον λόγο οι ευμελανίνες έχουν καφέ ή μαύρο χρώμα ενώ οι φαιομελανίνες κόκκινο ή κίτρινο (Riley 1997). Το μαύρο χρώμα των ευμελανινών εμφανίζεται στο τελευταίο στάδιο της βιοσύνθεσής τους (Swan 1974).

Στις οπτικές ιδιότητες των μελανινών περιλαμβάνονται και πιο σύνθετα φαινόμενα. Στα μελανοσώματα οι μελανίνες μαζί με την πρωτεϊνική μήτρα σχηματίζουν ενός είδους κολλοειδές πήκτωμα (colloidal gel) (Moyer 1963 όπως αναφέρεται από Wolbarsht *et al.* 1981). Επιπλέον τα μόρια της μελανίνης είναι τυχαία αλλά πυκνά καταναμημένα στον χώρο (Blois 1969 όπως αναφέρεται από Wolbarsht *et al.* 1981). Αυτά τα στοιχεία υποδηλώνουν ότι τα μελανοσώματα μπορεί να δρουν σαν παγίδες φωτός (light trap) εντείνοντας την απορρόφηση. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, το προσπίπτον φως που σκεδάζεται πάνω

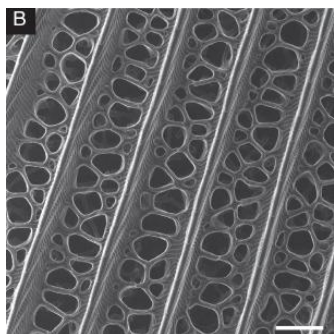
στα μόρια της μελανίνης, μπορεί να εισέρχεται βαθύτερα στο μελανόσωμα και να αλληλεπιδρά με περισσότερα μόρια μελανίνης. Ως εκ τούτου η ολική απορρόφηση είναι εντονότερη, γιατί δεν συμβαίνει μόνο στην επιφάνεια αλλά σε όλο τον όγκο του μελανοσώματος και επιπρόσθετα το φως εισέρχεται στο μελανόσωμα και απορροφάται ανεξάρτητα από τη γωνία πρόσπτωσης (Wolbarsht *et al.* 1981). Επιπλέον το ολικό οπτικό αποτέλεσμα τροποποιείται πιθανώς από σκέδαση κατά Rayleigh κατά την αλληλεπίδραση του φωτός με τα μόρια της μελανίνης και σκέδαση κατά Mie κατά την αλληλεπίδραση του φωτός με τα μελανοσώματα. Η σκέδαση κατά Rayleigh θα προσέδιδε μια πιο μπλε εμφάνιση στο ανακλώμενο φως και μια πιο κόκκινη εμφάνιση στο διερχόμενο φως (Wolbarsht *et al.* 1981).

Το μαύρο χρώμα εκτείνεται και σε άλλα βασίλεια πέρα από τα ζώα και τα φυτά. Ενδεικτικά κάποιοι από τους μύκητες που φέρουν μαύρο χρώμα, λόγω αλλομελανίνης, είναι οι βασιδιομύκητες *Russula nigrican*, *Ustilago maydis* και οι ασκομύκητες *Aspergillus niger*, *Daldinia Concentrica*. Ειδικά η μαύρη χρωστική του *Aspergillus niger* ονομάζεται ασπεργιλίνη (aspergillin) (Swan 1974). Άλλοι παθογόνοι για τον άνθρωπο μύκητες που παράγουν αλλομελανίνες είναι εκπρόσωποι των γενών *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Exophiala*, *Phialophora*, *Sporothrix* και *Cryptococcus* (Gomez and Nosanchuk 2003). Επίσης υπάρχουν οι μαύρες αλλομελανίνες της μαύρης τρούφας *Tuber melanosporum* (De Angelis *et al.* 1996 όπως αναφέρεται από Velisek and Cejpek 2011). Σε προκαρυωτικούς οργανισμούς μαύρες χρωστικές συναντώνται στα βακτήρια *Microspira tyrosinatica*, *Bacillus salmonicida*, *Bacterium symbioticum* και *Actinomyces* spp. (Swan 1974) και στα μαύρο χρώμα μπορεί να εμφανίσουν τα κυανοβακτήρια *Rivularia atra*, *Calothrix* spp., *Lyngbya* sp., *Nostoc flagelliforme* και *Gloeocapsa* spp. Στα κυανοβακτήρια το μαύρο χρώμα οφείλεται σε χρωστικές που συσσωρεύονται στο κυτταρικό τοίχωμα και φαίνεται να έχει οικοφυσιολογική σημασία. Σε αυτές τις χρωστικές περιλαμβάνονται πιθανώς χρωστικές τύπου σκυτονηματίνης (scytonemin), μιας σκούρας χρωστικής, που ανήκει στα αλκαλοειδή τύπου ινδόλης, με φωτοπροστατευτική δράση (Lewin 2006).



## 1.4 Περιπτώσεις δομικής ενίσχυσης του μαύρου χρώματος σε ζώα

Το μαύρο χρώμα στους ζωντανούς οργανισμούς προκύπτει κυρίως από την ύπαρξη χρωστικών. Όμως, σε ορισμένες περιπτώσεις ζώων έχουν παρατηρηθεί επιπλέον μικροδομές οι οποίες ενισχύουν το μαύρο χρώμα των χρωστικών. Αυτό προκύπτει από ειδικές δομές με περίτεχνη μικροαρχιτεκτονική στο ανάγλυφό τους με αποτέλεσμα από τη μια περίτεχνη μικροαρχιτεκτονική του ανάγλυφου. Αυτό το ανάγλυφο ενισχύει το την



**Εικόνα 1.5: Μικροσκοπική δομή του λεπιού του *Papilio ulyssees*.** Διακρίνονται οι παράλληλες γραμμώσεις και το ενδιάμεσο δίκτυο. Εικόνα από μικροσκόπιο ιόντων ηλίου (*Helium Ion Microscope – HIM*). Κλίμακα 2  $\mu\text{m}$  (εικόνα από *Boden et al. 2012*).

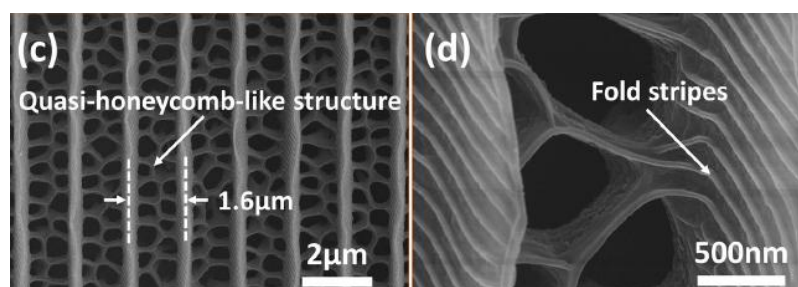
απορρόφηση από τις υποκείμενες χρωστικές και οδηγεί σε πολύ μαύρο χρώμα, δηλαδή σε ελάχιστη ανάκλαση σε όλο το ορατό φάσμα. Οι διαφορετικοί τύποι τέτοιων μικροδομών εικάζεται ότι συμβάλλουν στην ιδιαίτερα μειωμένη ανάκλαση μέσω των πολλαπλών σκεδάσεων του φωτός.

Τέτοιου είδους δομές έχουν μελετηθεί στα μαύρα λέπια από την νωτιαία πλευρά του λεπιδόπτερου *Papilio Ulysses* (Εικόνα 1.5). Τα λέπια αποτελούνται από χιτίνη και το σύνθετο μικρο- και νανο-ανάγλυφό τους περιλαμβάνει παράλληλες δοκούς με αποστάσεις 2-3  $\mu\text{m}$  ανάμεσα στις οποίες εκτείνεται ένα δίκτυο από δοκούς, φύλλα και οπές σε εντυπωσιακή οργάνωση και διάταξη (Εικόνα 1.5). Το μαύρο χρώμα προκύπτει από τη χρωστική μελανίνη στα λέπια, η οποία ενισχύεται χρωματικά πολύ έντονα από τις δομές. Η δομή το ενισχύει πιθανώς επειδή αυξάνει την επιφάνεια του λεπιού που εκτίθεται, άρα και την

ποσότητα της χρωστικής, ή ίσως επειδή οι δομές σκεδάζουν το χρώμα προς το εσωτερικό του λεπιού και αυξάνεται η αλληλεπίδραση του φωτός με τη μελανίνη, ίσως και με πιο σύνθετους οπτικούς τρόπους (*Boden et al. 2012*).

Ένα άλλο λεπιδόπτερο στα λέπια του οποίου έχει παρατηρηθεί περίπτωση δομικής ενίσχυσης του μαύρου είναι το *Trogonoptera brookiana*. Σε αυτήν την περίπτωση το μικρο- και νανοανάγλυφο

στα λέπια σχηματίζει μια εξαιρετικά έντονη παγίδα φωτός (light trapping effect). Τα λέπια φέρουν διαμήκεις δοκούς που προεξέχουν σε απόσταση περίπου 1,6  $\mu\text{m}$ , και στην επιφάνειά τους

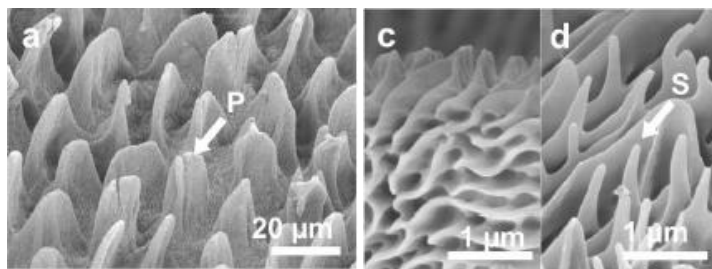


**Εικόνα 1.6: Μικροσκοπική δομή του λεπιού του *Trogonoptera brookiana*.** Διακρίνονται οι παράλληλες γραμμώσεις και το ενδιάμεσο δίκτυο (αριστερά) καθώς και οι πιο λεπτοφυείς γραμμώσεις (δεξιά). Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης εκπομπής πεδίου (*Field Emission Scanning Electron Microscope – FESEM*) (εικόνα από *Han et al. 2015*).

υπάρχουν ακόμα πιο λεπτοφυείς επιμήκεις γραμμώσεις. Μεταξύ των δοκών εκτείνεται ένα

δίκτυο από πόρους σχηματίζοντας μια δομή τύπου-κυψέλης (quasi-honeycomb-like structure) (Εικόνα 1.6). Στα άθικτα λέπια η απορρόφηση είναι κάτω από 8%. σε όλη την έκταση 400-700 nm Αυτή η εξαιρετικά μικρή ανάκλαση ενισχύεται πιθανότητα από τη μικροδομή, όπως φαίνεται και με αντίγραφο SiO<sub>2</sub>. Πιθανώς οι διαδοχικές πολλαπλές ανακλάσεις του φωτός στα τοιχώματα των ραβδίων και στη βάση του λεπιού, και οι πολλαπλές διαθλάσεις που προκύπτουν, να εξασθενούν την ισχύ κάθε προσπίπτουσας ακτίνας, οδηγώντας σε μικρή ανάκλαση. Τέτοιες δομές της φύσης έχουν πολλές βιομμητικές προοπτικές, λόγω των εντυπωσιακών ιδιοτήτων τους (Han *et al.* 2015).

Εξαιρετικά μαύρο χρώμα λόγω δομικής συνιστώσας παρατηρείται και σε μαύρες φολίδες

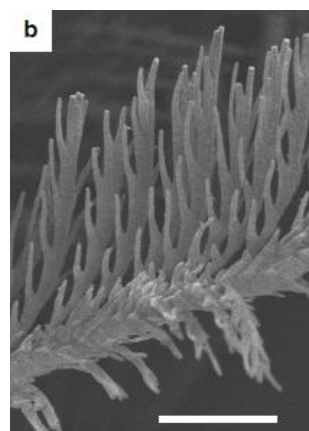


**Εικόνα 1.7: Μικροσκοπική δομή της φολίδας του *Bitis rhinoceros*.** Διακρίνονται οι φυλλοειδείς προεξοχές (a), το δίκτυο διακλαδισμένων γραμμώσεων (c) και οι μικρές άκανθες (d). Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Scanning Electron Microscope – SEM) (εικόνα από Spinner *et al.* 2013).

παρουσιάζει φυλλοειδείς (leaf-like) προεξοχές σε επίπεδο μικρομέτρων (Εικόνα 1.7). Επιπλέον, σε επίπεδο νανομέτρων καλύπτονται από ένα εκτεταμένο δίκτυο από διακλαδισμένες γραμμώσεις (branched ridges) και μικρές άκανθες (spinules) που προεξέχουν και εμφανίζουν κάποια κανονικότητα (Εικόνα 1.7). Στην περιοχή του ορατού φάσματος (400-700 nm) οι μαύρες φολίδες παρουσιάζουν πολύ μικρή ανάκλαση, με μέγιστο εύρος 4 έως 10%. Θεωρείται ότι ο μαύρος χρωματισμός οφείλεται στη μικρομορφολογία των φολίδων, με έμφαση στις φυλλοειδείς προεξοχές. Οι πολλαπλές σκεδάσεις του φωτός πάνω στις δομές προκαλούν φαινόμενο παγίδευσης του φωτός (light trapping) και οι διαστάσεις των δομών πιθανώς συμβάλλουν στο φαινόμενο αυτό. Η τοποθέτηση των χρωστικών στο εξωτερικό των φολίδων ενισχύει το φαινόμενο. Επιπρόσθετες παρατηρήσεις εξάρτησης της σκέδασης από τη γωνία πρόσπτωσης ερμηνεύονται από τη δομική παράμετρο (Spinner *et al.* 2013).

Μια ακόμα περίπτωση κατά την οποία δομή και χρωστικές συνεργάζονται με αποτέλεσμα ένα υπερ-μαύρο (super black) χρώμα είναι ορισμένα φτερά παραδείσιων πουλιών, σε αντίθεση με τα τυπικά μαύρα φτερά τους. Πέντε από τα

της αφρικανικής οχιάς *Bitis rhinoceros*. Στις φολίδες των σκούρων περιοχών της νωτιαίας πλευράς του σώματος της οχιάς, η σκούρα χρωστική βρίσκεται κυρίως στα εξωτερικά τμήματα των φολίδων. Οι φολίδες αποτελούνται εξωτερικά από α- και β-κερατίνη και το ανάγλυφο των φολίδων



**Εικόνα 1.8: Μικροσκοπική δομή υπερ-μαύρου φτερού του *Parotia wahnesi*.** Διακρίνεται η πολύ ιδιαίτερη μορφολογία των κυρτών πυκνών και ακανθωδών μυστακίων. Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Scanning Electron Microscope – SEM). Κλίμακα 50 μm (εικόνα από Spinner *et al.* 2013).

είδη στα οποία απαντάται αυτό το εξαιρετικά μαύρο χρώμα είναι τα *Ptiloris paradiseus*, *Seleucidis melanoleucus*, *Astrapia stephaniae*, *Lophorina superba* και *Parotia wahnesei*. Τα φτερά αυτά εμφανίζουν εξαιρετικά χαμηλή κατοπτρική ανάκλαση 0,8-0,31%, σε αντίθεση με το 3,2-4,7% των τυπικών μαύρων φτερών, κάνοντάς τα συγκρίσιμα με τα πιο μαύρα συνθετικά τεχνητά υλικά. Η ολική ανάκλασή τους, όπως μετρήθηκε με σφαίρα ολοκλήρωσης, είναι σταθερή και κάτω από 4% σε όλο το ορατό φάσμα, δίνοντας τα πολύ πιο χαμηλές και σταθερές καμπύλες ανάκλασης από πολλά ανθρώπινα υφάσματα αλλά και από τα λέπια της πεταλούδας και τις φολίδες της οχιάς που περιγράφηκαν από τους Han *et al.* (2015) και Spinner *et al.* (2013), αντίστοιχα. Τα μυστάκια (barbules) των υπερ-μαύρων φτερών εμφανίζουν ιδιαίτερη μορφολογία. Είναι κυρτά, στενά πακεταρισμένα μεταξύ τους και φέρουν μικρές άκανθες (spines) σε επίπεδο μικροκλίμακας (Εικόνα 1.8). Αυτή η μορφολογία είναι εντονότερη στα ακραία μυστάκια κάθε φτερού. Μοντέλα προσομοίωσης τύπου ray-tracing για τα μυστάκια των υπερ-μαύρων φτερών δείχνουν ότι η ιδιαίτερη μορφολογία τους προκαλεί πολλαπλές σκεδάσεις (scattering) του φωτός με αποτέλεσμα την αυξημένη δομική απορρόφηση (structural absorption). Η μορφολογία αυτής της εξαιρετικά μαύρης δομής είναι διαφορετική από τις γραμμικές προεξοχές των πεταλούδων και τις φυλλοειδείς προεξοχές της οχιάς που αναφέρονται παραπάνω (McCoy *et al.* 2018).

## 1.5 Ανθικές χρωστικές

### 1.5.1 Γενικά για τις φυτικές χρωστικές

Το χρώμα των βιολογικών υλικών οφείλεται συνήθως σε χημικές ενώσεις που ονομάζονται χρωστικές και αυτό το χρώμα καλείται χημικό χρώμα (chemical colour) ή χρώμα χρωστικών (pigmentary colour), σε αντίθεση με το δομικό χρώμα (structural colour) (Glover and Whitney 2010), το οποίο παρουσιάζεται στη συνέχεια. Οι φυτικές χρωστικές είναι οργανικά μόρια τα οποία ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία οργανικών ενώσεων που μπορούν να απορροφούν φωτόνια ορισμένου μήκους κύματος. Αυτό συμβαίνει μέσα από την παρουσία συγκεκριμένων χημικών ομάδων όπως ο διπλός δεσμός άνθρακα-άνθρακα ή ο βενζολικός δακτύλιος που απορροφούν συγκεκριμένα μήκη κύματος στην υπεριώδη περιοχή. Άλλες ομάδες όπως ο διπλός δεσμός αζώτου-οξυγόνου απορροφούν στην ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Κατά αυτόν τον τρόπο η παρουσία χρωστικών σε έναν ιστό αλλοιώνει τη φασματική σύσταση του προσπίπτοντος φωτός καθώς ορισμένα μήκη κύματος απορροφούνται και τα υπόλοιπα ανακλώνται (ή διέρχονται). Αν αυτή η απορρόφηση περιλαμβάνει μήκη κύματος από την ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, τότε το αποτέλεσμα γίνεται αισθητό από τον άνθρωπο ως χρώμα συγκεκριμένης απόχρωσης. Το χρώμα σχετίζεται με το ανακλώμενο φως και μέσω της ανάκλασης οι φυτικές χρωστικές προκαλούν χρώμα (ορατό στον άνθρωπο) (Lee 2007).

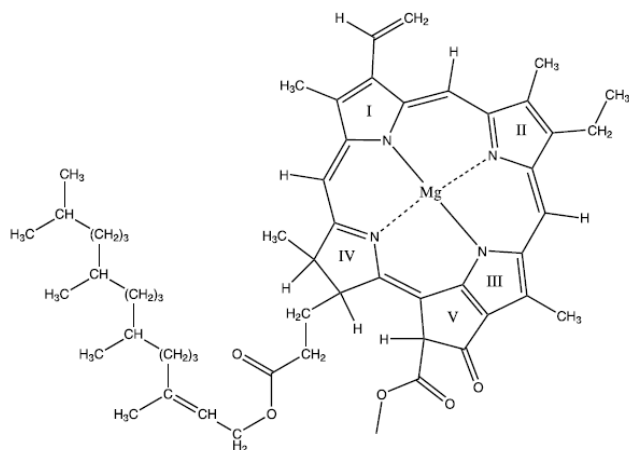
Οι φυτικές χρωστικές εμπίπτουν σε τέσσερις κύριες κατηγορίες: τις χλωροφύλλες, τα καροτενοειδή, τα φλαβονοειδή και τις βεταλαΐνες, καθώς και σε αρκετές μικρότερες. Γενικά ως φυτική χρωστική χαρακτηρίζεται κάθε φυτική οργανική χημική ένωση η οποία προκαλεί απορρόφηση στο ορατό φάσμα. Κάθε μία από αυτές τις βασικές κατηγορίες αντιστοιχεί σε μία διαφορετική βασική χημική δομή και κατά συνέπεια σε διαφορετική βιοσυνθετική οδό. Ανάλογα με τη χημική τους φύση μπορεί να είναι υδρόφιλες ή λιπόφιλες. Οι χρωστικές εμφανίζουν εξειδίκευση στα όργανα ενός φυτού στο οποίο απαντούν, αλλά επίσης και στα κύτταρα και στους ιστούς μέσα στο όργανο και στα υποκυτταρικά διαμερίσματα μέσα στο κύτταρο. Οι κατηγορίες φυτικών χρωστικών που αναφέρθηκαν απαντώνται και σε άλλες ομάδες οργανισμών εκτός από τα φυτά, οι οποίοι είτε τις βιοσυνθέτουν είτε τις παραλαμβάνουν με κατανάλωση φυτών. Χρωστικές απαντώνται και στα βλαστητικά και στα αναπαραγωγικά φυτικά όργανα και η λειτουργία τους μπορεί να έχει άμεση σχέση με την αλληλεπίδραση με το φως, όπως φωτοσύνθεση, λήψη φωτεινών μηνυμάτων, απορρόφηση περίσσειας ακτινοβολίας, οπτική επικοινωνία, ή και να μην έχει άμεση σχέση όπως αντιοξειδωτική ή αντιμικροβιακή δράση (Davies 2004a).

Ιδιαίτερη σημασία έχουν οι χρωστικές των ανθέων. Αυτές περιλαμβάνουν κυρίως φλαβονοειδή (κυρίως ανθοκυανίνες, φλαβόνες, φλαβονόλες, αουρόνες, χαλκόνες), καροτενοειδή, βεταλαΐνες και σπανιότερα χλωροφύλλες (Davies 2004a, Lee 2007, Glover 2014). Οι χρωστικές αυτές είναι υπεύθυνες για τα ποικίλα χρώματα των ανθέων. Ο ιδιαίτερος οικολογικός ρόλος του χρώματος είναι η προσέλκυση ζώων επικονιαστών. Ανάλογα με το οπτικό σύστημα των επικονιαστών (πολλοί από τους οποίους βλέπουν και στο υπεριώδες φως) και τη διαφορετική τους ευαισθησία στις διάφορες περιοχές του ορατού και του υπεριώδους, τα διάφορα χρώματα έχουν συσχετιστεί σε αδρές γραμμές με διαφορετικές ομάδες επικονιαστών (Davies 2004a). Τα άνθη που ανήκουν στο ίδιο χρώμα

αντιστοιχούν γενικά στο ίδιο πρότυπο φάσματος ανάκλασης, το οποίο ωστόσο διαφέρει αισθητά όταν μεταβάλλεται το χρώμα του άνθους (Τσεκούρα 2018). Οι χρωστικές - και κατά συνέπεια το χρώμα των ανθέων - συχνά δεν είναι χωρικά ή/και χρονικά σταθερές, αλλά η βιοσύνθεσή και αποικοδόμησή τους βρίσκεται σε αυστηρό χωρικό και χρονικό έλεγχο. Δηλαδή το χρώμα μπορεί να μην είναι ομοιογενές αλλά να σχηματίζονται μοτίβα (variegated) (ορατά και υπεριώδη) πάνω στα πέταλα του άνθους, που οφείλονται σε διαφορετικές περιεχόμενες χρωστικές (Lee 2007, Chimona *et al.* 2012, Glover *et al.* 2013, Glover 2014, Rhizoroulou *et al.* 2015). Επίσης το χρώμα ενός άνθους μπορεί να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της άνθισής του, λόγω μεταβολών στη σύνθεση και διάσπαση των χρωστικών που αντικατοπτρίζονται σε διαφορετικό περιεχόμενο χρωστικών (Lee 2007, Glover 2014).

### 1.5.2 Χλωροφύλλες

Οι χλωροφύλλες ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία χρωστικών που φέρουν έναν πορφυρινικό δακτύλιο και συντίθενται από την οδό της πορφυρίνης. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν και άλλες χρωστικές ζωικής προέλευσης, όπως η αιμοσφαιρίνη, ή φυτικής προέλευσης όπως η ψυχανθαιμοσφαιρίνη (Lee 2007). Οι χλωροφύλλες (Εικόνα 1.9) είναι η πιο διαδεδομένη κατηγορία χρωστικών στα φυτά και ευθύνονται για το πράσινο χρώμα τους. Εντοπίζονται στους χλωροπλάστες, στη μεμβράνη των οποίων βρίσκονται αγκυροβολημένες εσωτερικά, και απορροφούν τη φωτεινή ενέργεια για τη διενέργεια φωτοσύνθεσης. Ανήκουν στην ευρύτερη χημική ομάδα των τετραπυρρολίων (όπως και η αίμη, η βιταμίνη B12, το φυτόχρωμα και το κρυπτόχρωμα) (Willows 2004, Lee 2007, Mlodzinska 2009, Miller *et al.* 2011). Δηλαδή ο κύριος σκελετός των χλωροφυλλών αποτελείται από τέσσερα πυρρόλια ενωμένα κυκλικά (Εικόνα 1.9). Στο κέντρο του



**Εικόνα 1.9: Συντακτικός τύπος της χλωροφύλλης α.** Διακρίνονται ο πορφυρινικός τετραπυρρολικός δακτύλιος με το ιόν μαγνησίου και η μακριά λιπόφιλη αλειφατική ουρά 20 ατόμων άνθρακα. Η διαφορά της χλωροφύλλης β είναι ότι φέρει αλδεΐδομάδα αντί μεθυλομάδας στον δακτύλιο II (εικόνα από Lee 2007).

τετραπυρρολικού δακτυλίου βρίσκεται ένα ιόν μαγνησίου. Στον δακτύλιο βρίσκεται προσαρτημένη μία υδρόφοβη αλειφατική ουρά φυτόλης με 20 άτομα άνθρακα (Εικόνα 1.9). Στα φυτά οι κύριες μορφές χλωροφύλλης είναι η χλωροφύλλη α και η χλωροφύλλη β. Οι δύο χλωροφύλλες διαφέρουν δομικά σε ένα σημείο, στο οποίο η χλωροφύλλη α φέρει  $-CH_3$  ενώ η χλωροφύλλη β φέρει  $-CHO$  (Willows 2004, Lee 2007, Mlodzinska 2009).

Το ιόν του μαγνησίου και οι διπλοί και απλοί δεσμοί του τετραπυρρολικού δακτυλίου οφείλονται για την απορρόφηση φωτός από τις χλωροφύλλες (Mlodzinska 2009). Τα μόρια των χλωροφυλλών επιδεικνύουν έντονη απορρόφηση στην

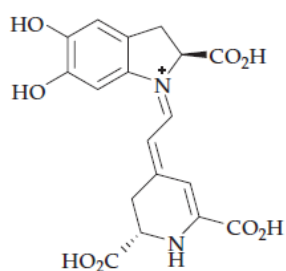
κόκκινη και κυανή περιοχή του ορατού φάσματος και για αυτό το χρώμα τους είναι πράσινο. Οι χλωροφύλλες α και β έχουν διαφορετικά φάσματα απορρόφησης με μετατοπισμένα μέγιστα απορρόφησης και διαφορετική χρωματική απόχρωση. (Willows 2004, Lee 2007, Mlodzinska 2009)

Η ποιότητα και η ποσότητα της χλωροφύλλης στο φυτό μπορεί να επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Για παράδειγμα η σκίαση προκαλεί μείωση του λόγου χλωροφύλλης α/β (Willows 2004), ενώ ανεπάρκεια μαγνησίου οδηγεί σε μειωμένη ποσότητα χλωροφύλλης (Mlodzinska 2009). Επίσης οι χλωροφύλλες παρέχουν και φωτοπροστασία στο φυτό, αποβάλλοντας την περίσσεια φωτός μέσω φθορισμού, θερμότητας ή αντιδράσεων με άλλα στοιχεία (Willows 2004, Mlodzinska 2009). Οι χλωροφύλλες είναι υπεύθυνες σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις για τον χρωματισμό των πράσινων περιοχών σε άνθη, αν και τα πλήρως πράσινα άνθη είναι ιδιαίτερα σπάνια (Lee 2007). Αν και οι χλωροφύλλες είναι οι πιο κοινές χρωστικές των φυτών, δεν θεωρούνται από τις κύριες ανθικές χρωστικές. Εντούτοις η παρουσία τους έχει εντοπιστεί και σε άνθη (πέταλα, τέπαλα) του Μεσογειακού οικοσυστήματος όπως στα *Asphodelus ramosus*, *Carraris spinosa* (Αργυρόπουλος 2009, Chimona *et al.* 2012, Χειμών 2015), *Sinapis arvensis* και *Eruca sativa* (Αργυρόπουλος 2009). Επιπλέον, πολλά κίτρινα άνθη διαθέτουν πιθανώς χλωροφύλλη α, όπως φαίνεται από την ανάλυση φασμάτων απορρόφησης (van der Kooi *et al.* 2016, 2017).  $Mg^{2+}$

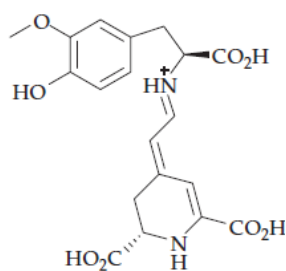
### 1.5.3 Βεταλαΐνες

Οι βεταλαΐνες είναι υδατοδιαλυτές αζωτούχες χρωστικές, της ευρύτερης χημικής κατηγορίας των ινδολών, που απαντώνται στις περισσότερες οικογένειες της τάξης Caryophyllales (με εξαιρέσεις, όπως την οικογένεια Caryophyllaceae). Επιπλέον απαντώνται και σε κάποιους κάκτους, τη *Bougainvillea* και συγγενή τάξα, την *Portulaca* και βασιδιομύκητες (Zryd and Christinet 2004, Grotewold 2006, Lee 2007, Mlodzinska 2009, Miller *et al.* 2011).

Οι βεταλαΐνες διαίρουνται στις κίτρινες-πορτοκαλί βεταξανθίνες και τις κόκκινες-μωβ βετακυανίνες. Το κίτρινωπό χρώμα στις βεταλαΐνες προκύπτει από ένα σύστημα τριών



Betanidin



Betaxanthin

**Εικόνα 1.10: Συντακτικοί τύποι βεταλαΐνων.** Διακρίνονται ο συντακτικός τύπος μιας βετακυανίνης (αριστερά) και μιας βεταξανθίνης (δεξιά). Διακρίνονται τα χαρακτηριστικά άτομα αζώτου και τα συστήματα συζυγών διπλών δεσμών (εικόνα από Glover 2014).

συζυγών διπλών δεσμών (Εικόνα 1.10), ενώ το ιώδες προκύπτει μετά από την συμβολή του αρωματικού δακτυλίου στις βετακυανίνες. Οι βεταξανθίνες προκύπτουν από την σύνδεση ενός μορίου βεταλαμικού οξέος με ένα πρωτεϊνικό αμινοξύ, ένα μη πρωτεϊνικό αμινοξύ ή μία αμίνη, ενώ οι βετακυανίνες προκύπτουν από τη σύνδεση ενός μορίου βεταλαμικού οξέος με ένα

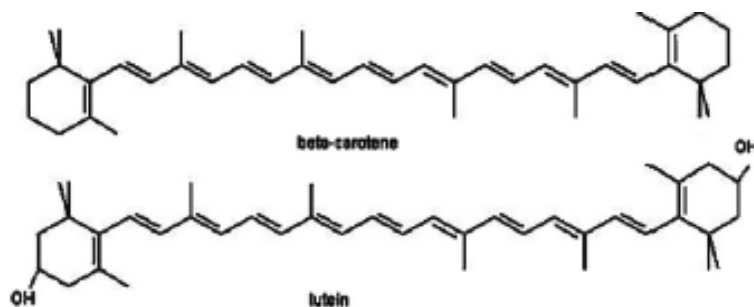
μόριο *cyclo*-DOPA (παράγωγο τυροσίνης). Τα μόρια βεταλαϊνών που προκύπτουν τροποποιούνται συχνά με γλυκοζυλίωση ή ακυλίωση (Zryd and Christinet 2004).

Μερικές φορές οι βεταλαΐνες σχηματίζουν σύμπλοκα με μόρια τυροσίνης ή γλυκίνης (Mlodzinska 2009). Συνδυασμός βεταξανθίνης και βετακυανίνης μπορεί να οδηγήσει σε πράσινο χρωματισμό (Gandía-Herrero *et al.* 2005 όπως αναφέρεται από Mlodzinska 2009). Στις βεταλαΐνες συχνά προσδέονται σάκχαρα και τις καθιστούν περισσότερο υδατοδιαλυτές, ώστε να συσσωρεύονται στο χυμοτόπιο (Lee 2007, Miller *et al.* 2011). Η σύνθεσή τους είναι μεταβολικά πιο δαπανηρή σε σχέση με τα φλαβονοειδή και τα καροτενοειδή (Lee 2007).

Οι βεταλαΐνες είναι υδατοδιαλυτές χρωστικές με παρόμοια χρώματα με τις ανθοκυανίνες. Παρατηρείται ωστόσο αμοιβαίος αποκλεισμός μεταξύ αυτών των δύο κατηγοριών χρωστικών. Δηλαδή αποκλείεται η συνύπαρξη ανθοκυανινών και βεταλαϊνών στην ίδια οικογένεια φυτών. Έχουν διατυπωθεί υποθέσεις που να προσπαθούν να εξηγήσουν αυτήν την κατάσταση (Grotewold 2006, Miller *et al.* 2011). Ωστόσο εντύπωση προκαλεί ότι σε κάποιες τουλάχιστον περιπτώσεις φυτά με βεταλαΐνες συσσωρεύουν ταυτόχρονα και σημαντικές ποσότητες από φλαβονόλες, πρωτοανθοκυανιδίνες και άλλα φλαβονοειδή, πιθανώς υπονοώντας ότι η διακοπή της παραγωγής ανθοκυανινών βρίσκεται στα τελευταία στάδια της βιοσυνθετικής οδού (Stafford 1994 και Shimada *et al.* 2004 όπως παρατίθενται από Grotewold 2006).

#### 1.5.4 Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι χρωστικές πολλές φορές υπεύθυνες για κίτρινες, πορτοκαλί και κόκκινες αποχρώσεις σε άνθη, καρπούς και φύλλα. Παράγονται από την οδό του



**Εικόνα 1.11: Συντακτικοί τύποι καροτενοειδών.** Διακρίνονται ο συντακτικός τύπος ενός καροτενίου (β-καροτένιο - άνω) και μιας ξανθοφύλλης (λουτεΐνη - κάτω). Διακρίνονται τα χαρακτηριστικά συστήματα συζυγών διπλών δεσμών. Οι ξανθοφύλλες αποτελούν οξειδωμένα (οξυγονωμένα) παράγωγα καροτενίων (εικόνα από Mlodzinska 2009).

χλωροπλαστών ως μέρος της φωτοσυνθετικής συσκευής (Cuttriss and Pogson 2004, Grotewold 2006, Lee 2007, Mlodzinska 2009, Miller *et al.* 2011).

Τα καροτενοειδή συντίθενται στα πλαστίδια από το πρόδρομο μόριο διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (diphosphate isopentenyl – IPP) και αποτελούν πρόδρομες ενώσεις και για

ισοπρενίου και ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των τερπενίων. Εκτός από τα φυτά, έχουν βρεθεί και σε βακτήρια, φύκη, μύκητες και ζώα (π.χ. καρκινοειδή). Τα καροτενοειδή είναι λιπόφιλες ενώσεις και στα άνθη εντοπίζονται στους χρωμοπλάστες, ενώ στα πράσινα μέρη συναντώνται στη μεμβράνη των



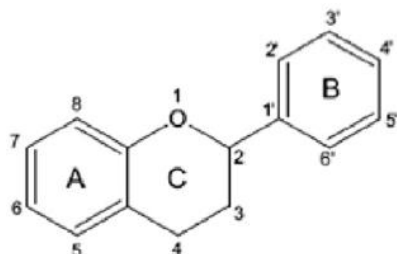
άλλα μόρια όπως το αποκοπτικό οξύ (ABA) (Grotewold 2006). Τα καροτενοειδή είναι τετρατερπένια συνήθως με 40 άτομα άνθρακα. Τα άκρα των καροτενοειδών μπορεί να είναι γραμμικά ή κυκλικά. Τα καροτενοειδή διαιρούνται σε δύο κύριες ομάδες, σε καροτένια και ξανθοφύλλες. Τα καροτένια είναι υδρογονάνθρακες και οι ξανθοφύλλες οξυγονωμένα παράγωγά τους (Εικόνα 1.11). (Cuttriss and Pogson 2004, Miller *et al.* 2011). Τα πιο συνήθη καροτένια στα φυτά είναι το β-καροτένιο και το λυκοπένιο, και οι πιο συνηθισμένες ξανθοφύλλες είναι η ζεαξανθίνη, η βιολαξανθίνη και η λουτεΐνη (Mlodzinska 2009).

Τα καροτενοειδή αποτελούν τη δεύτερη πιο κοινή ομάδα φυτικών χρωστικών μετά τις χλωροφύλλες και αποτελούν ομάδα χρωστικών η οποία είναι απαραίτητη για την επιβίωση των φυτών (Miller *et al.* 2011). Τα καροτενοειδή συμμετέχουν στη συλλογή του φωτός και στη φωτοσύνθεση δρώντας ως επικουρικές φωτοσυνθετικές χρωστικές, δηλαδή συλλέγοντας και μεταφέροντας ενέργεια στη χλωροφύλλη β. Επιπλέον τα καροτενοειδή έχουν και φωτοπροστατευτικό και αντιοξειδωτικό ρόλο προστατεύοντας τη λειτουργία των φωτοσυστημάτων από τον έντονο φωτισμό. Η περίσσεια ενέργεια αποβάλλεται ως θερμότητα με την αλληλομετατροπή μεταξύ καροτενοειδών μέσω του κύκλου των ξανθοφυλλών (Mlodzinska 2009, Miller *et al.* 2011).

Το χρώμα τους οφείλεται στους πολλούς συζυγείς διπλούς δεσμούς τους και η ακριβής απόχρωση εξαρτάται από το πλήθος των διπλών δεσμών και τις ομάδες στα άκρα του μορίου (Cuttriss and Pogson 2004, Miller *et al.* 2011). Σε συνδυασμό με πρωτεΐνες μπορεί να δώσουν ασυνήθιστα χρώματα, όπως η ασταξανθίνη που προσδίδει το μπλε χρώμα στον αστακό (Cuttriss and Pogson 2004, Grotewold 2006, Mlodzinska 2009). Τα καροτενοειδή μπορεί να συνυπάρχουν στα άνθη με ανθοκυανίνες οδηγώντας σε κόκκινες (Ng and Smith 2016) ή καφέ αποχρώσεις (Forkmann 1991 όπως αναφέρεται από Grotewold 2006). Επειδή τα καροτενοειδή απορροφούν στην υπεριώδη περιοχή και για αυτόν τον λόγο προσφέρουν στο άνθος έντονη χρωματική αντίθεση από το περιβάλλον ως προς το οπτικό σύστημα των μελισσών (Miller *et al.* 2011).

### 1.5.5 Φλαβονοειδή

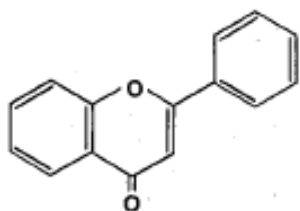
Ο όρος φλαβονοειδή αναφέρεται σε μία ευρεία κατηγορία οργανικών ενώσεων των οποίων η βασική δομή περιλαμβάνει 2 φαινολικούς δακτυλίους (Α και Β δακτύλιοι) που συνδέονται με μία γέφυρα τριών ατόμων άνθρακα τα οποία συνήθως σχηματίζουν δακτύλιο (C δακτύλιος) (Εικόνα 1.12). Σε αυτή τη βασική δομή μπορεί υπάρχουν υποκαταστάτες όπως υδροξυλομάδες, μεθυλομάδες, σάκχαρα, οργανικά οξέα, μονάδες ισοπρενίου, και άλλου είδους υποκαταστάτες. Συνήθως τα φλαβονοειδή εντοπίζονται με τη μορφή γλυκοζιτών και με αυτόν τον τρόπο καθίστανται υδατοδιαλυτά και εντοπίζονται στο χυμοτόπιο των κυττάρων διαφόρων φυτικών οργάνων. Στην περίπτωση που τα φλαβονοειδή δεν είναι γλυκοζυλιωμένα (αγλυκόνες) και ιδίως τα πολυμεθυλιωμένα εντοπίζονται ως



**Εικόνα 1.12:** Συντακτικός τύπος βασικής δομής φλαβονοειδούς. Διακρίνονται οι δύο βενζολικοί και ο ετεροκυκλικός δακτύλιος καθώς και η αρίθμηση που ακολουθείται για τα άτομα του άνθρακα (εικόνα από Paroti *et al.* 2011).



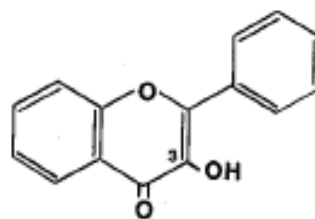
συστατικά των κηρών ή με τη μορφή κρυστάλλων. Βιοσυνθετική ικανότητα των φλαβονοειδών διαθέτουν μόνο τα φυτά (έχουν εντοπιστεί σε σπερματοφύτα, πτεριδόφυτα, βρυόφυτα και χαροφύκη) και σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν χημειοταξινομική αξία (Iwashina 2000). Εκτός από τις ανθοκυανίνες, οι οποίες θα αναλυθούν στη συνέχεια, υπάρχουν και μια σειρά από άλλες κατηγορίες φλαβονοειδών, για κάποιες από τις οποίες θα γίνει μια σύντομη αναφορά παρακάτω. Όσα φλαβονοειδή απορροφούν στην ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος χαρακτηρίζονται ως χρωστικές. Η κύρια βιοσυνθετική οδός των φλαβονοειδών ξεκινά με πρόδρομο μόριο τη φαινυλαανίνη (Schwinn and Cavies 2004). Η σύνθεση των φλαβονοειδών γίνεται στο κυτταρόπλασμα ενώ μετά τη γλυκοζυλίωσή τους μεταφέρονται στον κυτταρικό χυμό (Lee 2007). Τα φλαβονοειδή εντοπίζονται σε όλα τα φυτικά μέρη. Απορροφούν στην υπεριώδη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, και ως εκ τούτου έχουν, μεταξύ των άλλων, και φωτοπροστατευτικό ρόλο (Miler *et al.* 2011). Αυξημένη έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη σύνθεση φλαβονοειδών (Gorton and Vogelmann 1996). Όλα τα φλαβονοειδή απορροφούν στις περιοχές 250-270 nm και 330-350, και κάποια στην περιοχή nm 520-550 nm (Glover 2014).



**Εικόνα 1.13: Βασική δομή αγλυκόνης φλαβόνης.** Στις φλαβόνες δεν είναι οξυγονωμένος ο 3<sup>ος</sup> άνθρακας του ετεροκυκλικού δακτυλίου (εικόνα από Iwashina 2000).

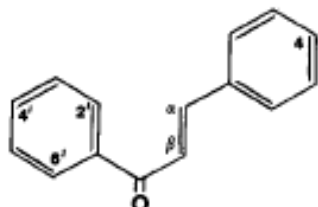
Οι φλαβόνες (flavones) χαρακτηρίζονται από υποκαταστάτες στους A και B δακτυλίους αλλά δεν φέρουν υδροξύλιο στην 3<sup>η</sup> θέση του C δακτυλίου (Εικόνα 1.13). Συνήθως συναντώνται στα χυμοτόπια με τη μορφή O- ή C-γλυκοζιτών αλλά μερικές μη γλυκοζυλιωμένες απλές ή πολυμεθυλιωμένες μορφές τους μπορεί να είναι λιπόφιλες και να απαντώνται σε κηρούς ή στο καρδιόξυλο. Συνολικά έχουν βρεθεί περίπου 400 είδη από αγλυκόνες, 500 είδη από O-γλυκοζίτες και 300 είδη από C-γλυκοζίτες. Συχνά οι γλυκοζίτες φλαβονών, και ιδίως οι C-γλυκοζίτες, λειτουργούν ως συγχρωστικές (co-pigments) στις ανθοκυανίνες στα άνθη (Iwashina 2000). Οι φλαβόνες είναι συχνά άχρωμες, λευκές ή ελαφρά κίτρινες και μπορεί να συμβάλλουν στο λευκό και υπόλευκο χρώμα των ανθέων. (Mlodzinska 2009, Miller *et al.* 2011). Εκτός από τα άνθη, εκτεταμένη είναι η παρουσία τους και στα φύλλα (Harborne 1984).

Οι φλαβονόλες (flavonols) διαφέρουν ως προς τη χημική τους δομή από τις φλαβόνες, γιατί είναι υδροξυλιωμένες στην 3<sup>η</sup> θέση του C δακτυλίου (3-υδροξυφλαβόνες) (Εικόνα 1.14). Έχουν βρεθεί περίπου 450 είδη από αγλυκόνες φλαβονολών και 900 είδη από C-γλυκοζίτες, ενώ οι O-γλυκοζίτες σπανίζουν. Τα σάκχαρα της γλυκοζυλίωσης είναι συχνά γλυκόζη, γαλακτόζη και ραμνόζη. Όπως και στις φλαβόνες, απλές και πολυμεθυλιωμένες αγλυκόνες εμφανίζονται σε λιπόφιλα μίγματα (Iwashina 2000). Οι φλαβονόλες είναι άχρωμες στο ορατό φάσμα, ελαφρά κίτρινες ή λευκές, και μπορούν να συμβάλλουν στο λευκό ή υπόλευκο χρώμα των ανθέων (Schwinn and Cavies 2004, Miller *et al.* 2011). Σε ορισμένες



**Εικόνα 1.14: Βασική δομή αγλυκόνης φλαβονόλης.** Οι φλαβονόλες φέρουν οξυγονωμένο τον 3<sup>ο</sup> άνθρακα του ετεροκυκλικού δακτυλίου (εικόνα από Iwashina 2000).

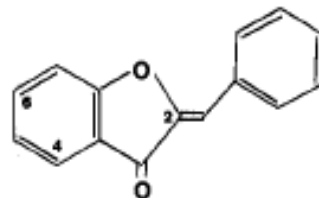
περιπτώσεις ευθύνονται για το έντονο κίτρινο χρώμα των ανθέων (Lee 2007). Επιπλέον οι φλαβονόλες που απορροφούν στο υπεριώδες μπορούν σχηματίζουν περιοχές του άνθους που ξεχωρίζουν από το υπόβαθρο, ως προς το οπτικό σύστημα των επικονιαστών μελισσών ή να ευθύνονται για υπεριώδη χρωματικά μοτίβα στο άνθος (Miller *et al.* 2011). Οι φλαβονόλες εκτός από τα άνθη, έχουν εκτεταμένη παρουσία και στα φύλλα (Harborne 1984).



**Εικόνα 1.15: Βασική δομή αγκυκόνης χαλκόνης.** Οι χαλκόνες δεν φέρουν ετεροκυκλικό δακτύλιο (εικόνα από Iwashina 2000).

Οι χαλκόνες (chalcones) είναι φλαβονοειδή τα οποία δεν φέρουν ετεροκυκλικό C-δακτύλιο (Εικόνα 1.15). Όλοι οι γλυκοζίτες στις χαλκόνες είναι O-γλυκοζίτες. Έχουν βρεθεί περίπου 250 είδη από αγκυκόνες χαλκόνης και περίπου 60 είδη από O-γλυκοζίτες. Οι χαλκόνες ως γλυκοζίτες δρουν ως κίτρινες ανθικές χρωστικές (Iwashina 2000). Οι χαλκόνες μπορεί να ευθύνονται σε κάποια άνθη για το πορτοκαλί (Lee 2007), το κίτρινο ή το υπόλευκο (cream) χρώμα (Mlodzinska 2009). Οι χαλκόνες θεωρούνται κατά βάση ανθικές χρωστικές (Harborne 1984).

Οι αουρόνες (aurones) είναι φλαβονοειδή που χαρακτηρίζονται από πενταμερή ετεροκυκλικό δακτύλιο (Εικόνα 1.16). Έχουν βρεθεί 18 είδη από αγκυκόνες αουρόνης στα φυτά και 27 είδη από O-γλυκοζίτες, δεν υπάρχουν C-γλυκοζίτες αουρόνης. Με τη μορφή των γλυκοζιτών, οι αουρόνες δρουν ως κίτρινες ανθικές χρωστικές (Iwashina 2000). Οι αουρόνες ευθύνονται επίσης για το πορτοκαλοκίτρινο χρώμα κάποιων ανθέων (Lee 2007). Θεωρούνται ανθικές χρωστικές (Harborne 1984).



**Εικόνα 1.16: Βασική δομή αγκυκόνης αουρόνης.** Οι αουρόνες φέρουν πενταμερή ετεροκυκλικό δακτύλιο (εικόνα από Iwashina 2000).

Οι φλαβανόνες (flavanones) είναι φλαβονοειδή που χαρακτηρίζονται από διπλό δεσμό μεταξύ του 2<sup>ου</sup> και 3<sup>ου</sup> άνθρακα καθώς και από τη χειρομορφία του 2<sup>ου</sup> άνθρακα. Στη φύση απαντώνται σε αγκυκόνες (περίπου 350 είδη) και κατά βάση σε O-γλυκοζίτες (περίπου 100 είδη) (Iwashina 2000). Είναι άχρωμα μόρια και απαντώνται συχνά σε φύλλα και καρπούς, ιδίως στο *Citrus* (Harborne 1984).

Τα ισοφλαβονοειδή (isoflavonoids) διαφέρουν από τις υπόλοιπες κατηγορίες φλαβονοειδών γιατί ο B-δακτύλιος συνδέεται με τον C-3 και όχι με τον C-2 άνθρακα. Από όλες τις κατηγορίες των ισοφλαβονοειδών, η πιο συνήθης είναι οι ισοφλαβόνες (περίπου 250 είδη από αγκυκόνες και 50 είδη από γλυκοζίτες) (Iwashina 2000). Τα ισοφλαβονοειδή είναι άχρωμα μόρια, απαντώνται συνήθως στη ρίζα και είναι πολύ κοινά στα Leguminosae. Επιπλέον θεωρούνται φυτοαλεξίνες (αμυντικά μόρια) σε πολλά φυτά (Harborne 1984, Iwashina 2000).

Τα διφλαβονοειδή (biflavonoids) είναι O- και C-διμερή από φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες και μερικές φορές ισοφλαβόνες. Έχουν αναφερθεί περίπου 200 είδη από διφλαβονοειδή και τριφλαβονοειδή στη φύση. Απαντώνται συνήθως ως αγκυκόνες και λιγότερο συχνά ως O-γλυκοζίτες (Iwashina 2000). Τα διφλαβονοειδή είναι άχρωμα και απαντώνται σχεδόν αποκλειστικά στα γυμνόσπερμα (Harborne 1984).

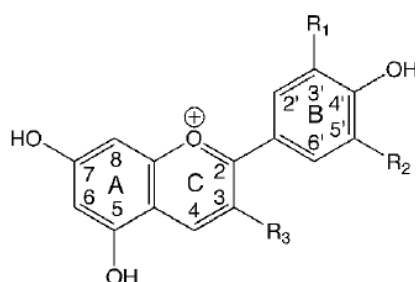
### 1.5.6 Ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυανίνες είναι από τις πιο διαδεδομένες χρωστικές και είναι πολλές φορές ευθύνονται για πορτοκαλί, ροζ, κόκκινους, ματζέντα, μωβ, μπλε και μαύρους χρωματισμούς ανθέων (Schwinn and Cavies 2004, Lee 2007, Glover and Martin 2012, Glover 2014). Ανήκουν στην ομάδα των φλαβονοειδών και στην ακόμα ευρύτερη των φαινολικών ενώσεων. Θεωρούνται ιδιαίτερα ευεργετικές ως μέρος της διατροφής του ανθρώπου για πλήθος παθήσεων, όπως πρόληψη για καρδιαγγειακές παθήσεις (Glover and Martin 2012). Οι αγλυκόνες της ανθοκυανίνης ονομάζονται ανθοκυανιδίνες, ενώ ως ανθοκυανίνες αναφέρονται οι γλυκοζίτες τους. Η ένταση του χρώματος στις ανθοκυανίνες ενισχύεται όταν οι ανθοκυανιδίνες βρίσκονται στη μορφή κατιόντος φλαβυλίου (2-φαινυλοβενζοπυρόλιο) (Εικόνα 1.18), κατά την οποία συμβαίνει το φαινόμενο του συντονισμού (Castaneda-Ovando *et al.* 2009).

Οι ανθοκυανίνες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον αριθμό των υδροξυλομάδων, το είδος και τον αριθμό των προσδεμένων σακχάρων και τις αλειφατικές ή αρωματικές ομάδες που βρίσκονται προσδεμένες με τα σάκχαρα (Kong *et al.* 2003 όπως αναφέρεται από Castaneda-Ovando *et al.* 2009). Έχουν αναφερθεί πάνω από 500 διαφορετικά είδη ανθοκυανινών και 31 είδη ανθοκυανιδινών (Andersen and Jordheim 2006). Περίπου το 90% όλων των ανθοκυανινών βασίζονται σε έξι ανθοκυανιδίνες και περίπου το 97% των ανθοκυανινών που έχουν βρεθεί είναι γλυκοζυλιωμένες (Andersen and Jordheim 2006, Castaneda-Ovando *et al.* 2009).

#### 1.5.6.1 Χημική δομή ανθοκυανιδινών

Οι πιο κοινές ανθοκυανιδίνες στα ανώτερα φυτά είναι η πελαργονιδίνη, η κυανιδίνη, η παιονιδίνη, η δελφινιδίνη, η πετουινιδίνη και η μαλβινιδίνη (Πίνακας 1.1). Σε περιδόφυτα



**Εικόνα 1.17: Βασική δομή ανθοκυανιδίνης.** Η ανθοκυανιδίνη εμφανίζεται στη μορφή του κατιόντος φλαβυλίου. Το θετικό φορτίο είναι διαμοιρασμένο στα άτομα του άνθρακα (φαινόμενο συντονισμού). Η μορφή αυτή εμφανίζει χημική σταθερότητα και ευνοείται σε όξινο pH (εικόνα από Schwinn and Cavies 2004).

και βρυόφυτα είναι κοινές άλλες ανθοκυανιδίνες (Iwashina 2000). Σχετικά με τις ανθοκυανιδίνες των ανώτερων φυτών έχει διατυπωθεί η υπόθεση συσχέτισης του βαθμού υδροξυλίωσης της ανθοκυανιδίνης με το χρώμα της ανθοκυανίνης. Οι περισσότερες ανθοκυανίνες παράγονται από 3 βασικούς τύπους ανθοκυανιδίνης που βασίζονται στην πελαργονιδίνη, στην κυανιδίνη και στη δελφινιδίνη (Πίνακας 1.1). Εν γένει αυξημένος βαθμός υδροξυλίωσης του β-δακτύλιου οδηγεί σε περισσότερο μπλε απόχρωση στην ανθοκυανίνη, η οποία δίνει την κύρια χρωματική απόχρωση (Πίνακας 1.1), εφ' όσον είναι η κύρια ανθοκυανίνη που συσσωρεύεται στον ιστό. Η πελαργονιδίνη φέρει μία ομάδα υδροξυλίου στον β-δακτύλιο και έχουν πιο, πορτοκαλί και κόκκινες αποχρώσεις. Η κυανιδίνη (και η παράγωγη παιονιδίνη) φέρουν δύο ομάδες υδροξυλίου στον β-δακτύλιο και

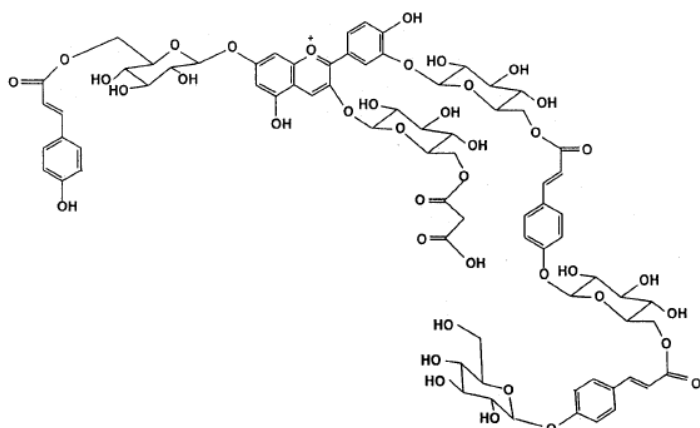
ευθύνονται περισσότερο για κόκκινες και ματζέντα-μωβ αποχρώσεις. Η δελφινιδίνη (και οι

παράγωγες πετουινιδίνη και μαλβιδίνη) φέρουν τρεις ομάδες υδροξυλίου στον β-δακτύλιο και ευθύνονται περισσότερο για μπλε-μωβ αποχρώσεις. Συνύπαρξη χρωστικών οδηγεί σε ενδιάμεσο χρωματικό αποτέλεσμα (Harborne 1976 όπως αναφέρεται από Schwinn and Cavies 2004, Lee 2007, Glover and Martin 2012, Ng and Smith 2016).

Πίνακας 1.1: Δομές των έξι κοινότερων ανθοκυανιδινών στα ανώτερα φυτά				
Ανθοκυανιδίνη	-R <sub>1</sub> (3' C)	-R <sub>2</sub> (5' C)	-R <sub>3</sub> (3 C)	Ενδεικτικό χρώμα σύμφωνα με Heldt and Piechulla (2011)
Πελαργονιδίνη	H	H	H	Πορτοκαλί-κόκκινο
Κυανιδίνη	OH	H	H	Κόκκινο
Παιονιδίνη	OCH <sub>3</sub>	H	H	Ροζ
Δελφινιδίνη	OH	OH	H	Μπλε-μωβ
Πετουινιδίνη	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Μωβ
Μαλβιδίνη	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	Κόκκινο-μωβ

#### 1.5.6.2 Πρωτοταγής χημική δομή ανθοκυανινών

Τροποποιήσεις της ανθοκυανίνης περιλαμβάνουν συνήθως Ο-γλυκοζυλίωση, Ο-ακυλίωση και Ο-μεθυλίωση. Η υδροξυλίωση συμβαίνει συχνά στον 3<sup>ο</sup> άνθρακα του C-δακτυλίου, στον 5<sup>ο</sup> και 7<sup>ο</sup> άνθρακα του Α-δακτυλίου και στον 4' άνθρακα του Β-δακτυλίου (Schwinn and Cavies 2004).

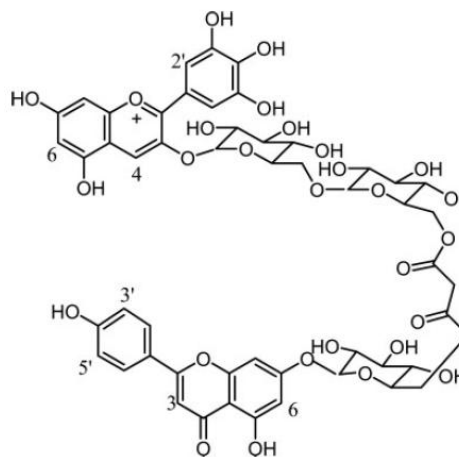


**Εικόνα 1.18: Πρωτοταγής δομή μιας ανθοκυανίνης.** Ο συντακτικός τύπος εικονίζει μια ανθοκυανίνη παράγωγη της κυανιδίνης από την ορχιδέα *Bletilla striata*. Αποτελεί έναν Ο-γλυκοζίτη και φαίνονται οι συνδέσεις (άμεσες ή έμμεσες) 5 μονοσακχαριτών, 3 αρωματικών και 1 αλειφατικού οξέος στην ανθοκυανιδίνη (εικόνα από Iwashina 2000).

Η Ο-γλυκοζυλίωση στη C-3 θέση είναι συχνά η πρώτη τροποποίηση που συμβαίνει στις ανθοκυανιδίνες (Εικόνα 1.18) (Schwinn and Cavies 2004), αν και έχει βρεθεί γλυκοζυλίωση και στις 5-, 7-, 3'- και 5'- θέσεις (Andersen and Jordheim 2006). Το πιο συχνό σάκχαρο γλυκοζυλίωσης είναι η γλυκόζη, και λιγότερο συχνά η γαλακτόζη, το γλουκουρονικό οξύ, η ραμνόζη (Schwinn and Cavies

2004, Andersen and Jordheim 2006), η αραβινόζη και η ξυλόζη. Επίσης έχουν βρεθεί και ανθοκυανιδίνες συνδεδεμένες με δισακχαρίτες, όπως η σοφορόζη, η ρουτινόζη, η σαμβουβιόζη και η γεντοβιόζη, και τρισακχαρίτες (Andersen and Jordheim 2006). Η προσθήκη σακχάρων στο μόριο της χρωστικής μπορεί να προκαλέσει ελαφρά ελάττωση του μήκους κύματος της απορρόφησης, προκαλώντας πιο πορτοκαλί απόχρωση (Lee 2007).

Συχνά συμβαίνει Ο-μεθυλίωση στις υδροξυλομάδες του δακτυλίου Β και μπορεί να έχει επίδραση και στο χρώμα (Schwinn and Cavies 2004). Συχνά στα σάκχαρα συνδέονται ομάδες (οξέα) με Ο-ακυλίωση, με εστερικούς δεσμούς. Τα οξέα μπορεί να είναι αρωματικά ή αλειφατικά (Εικόνα 1.18). Τα πιο συχνά αρωματικά οξέα είναι υδροξυκιναμικά οξέα (π.χ. p-κουμαρικό, καφεϊκό και σιναπικό οξύ) και υδροξυβενζοϊκά οξέα (π.χ. p-υδροξυβενζοϊκό και γαλλικά οξέα). Τα πιο συχνό αλειφατικό οξύ είναι το μηλονικό και σε μικρότερο βαθμό το σουκκινικό, το οξικό, το μηλικό και τα ταρταρικά οξέα (Schwinn and Cavies 2004, Andersen and Jordheim 2006). Η ακυλίωση των χρωστικών με αλειφατικά οργανικά ή αρωματικά οξέα (π.χ. καφεϊκό οξύ - caffeic acid, κουμαρικό οξύ - p-coumaric acid) μπορεί να προκαλεί ενίσχυση ή και ελαφρά μετατόπιση της απορρόφησης (Lee 2007).



**Εικόνα 1.19: Δομή σύνθετης ομοιοπολικής ένωσης ανθοκυανίνης και φλαβόνης.** Ο συντακτικός τύπος εικονίζει μια χρωστική από το φυτό *Eichhornia crassipes*. Η ένωση αυτή αποτελεί μία περίπτωση ομοιοπολικής σύνδεσης ανθοκυανίνης και φλαβόνης μέσω προσαρτημένων σακχάρων και οργανικού οξέος (εικόνα από Ellestad 2006).

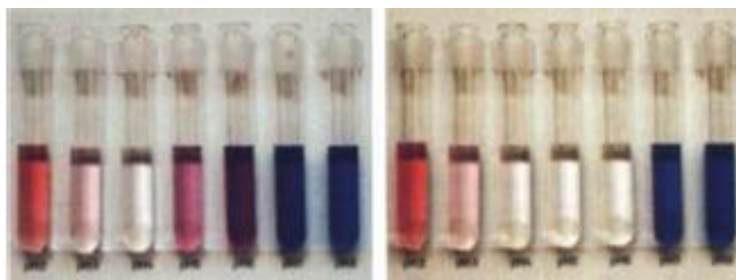
Επιπλέον έχει βρεθεί ότι οι ανθοκυανίνες μπορούν να σχηματίζουν διμερείς ενώσεις με άλλα φλαβονοειδή (φλαβόνη, φλαβονόλη ή φλαβανόλη). Τα δύο φλαβονοειδή μπορεί να συνδέονται απευθείας μεταξύ τους ή με τη μεσολάβηση ενός κοινού οργανικού οξέος-υποκαταστάτη (Εικόνα 1.19) (Andersen and Jordheim 2006).

#### 1.5.6.3 Επίδραση του διαλύτη, της θερμοκρασίας και του pH στο χρώμα

Οι ανθοκυανίνες είναι εν γένει ασταθείς ενώσεις. Το χρώμα των ανθοκυανινών εξαρτάται και από αρκετούς εξωγενείς παράγοντες. Τα άλατα του φλαβυλίου έχουν κόκκινο χρωματισμό σε πρωτικούς διαλύτες (δηλαδή πολικούς διαλύτες που μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου και διαλύουν άλατα), όπως το νερό, ενώ είναι κίτρινα σε μη πρωτικούς διαλύτες. Έχει προταθεί ότι το κόκκινο χρώμα αντιστοιχεί σε μονομερή και το κίτρινο χρώμα σε διμερή (Castaneda-Ovando *et al.* 2009).

Ένας άλλος παράγοντας που φαίνεται να επιδρά ορισμένες φορές στο χρώμα του άνθους είναι η θερμοκρασία. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι χαμηλές θερμοκρασίες προκαλούν εντονότερο χρώμα. Αυτό ωστόσο δεν προκαλείται από επιδράσεις στα μόρια των ανθοκυανινών. Αντί αυτού οι χαμηλές θερμοκρασίες προωθούν σε κάποιες περιπτώσεις αυξημένη βιοσύνθεση ανθοκυανινών (Miller *et al.* 2011). Μελέτες σε διαφορετικά φυτικά είδη βρήκαν ότι το μαγνήσιο μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της έντασης του χρώματος. Ως υπόθεση προτάθηκε ότι το μαγνήσιο οδηγεί σε σταθεροποίηση της ανθοκυανίνης, και επομένως υψηλότερες συγκεντρώσεις μαγνησίου οδηγούν σε αυξημένη σταθερότητα και εντονότερο χρώμα, ακόμα και σε υψηλές θερμοκρασίες (Nissan-Levi *et al.* 2007 όπως αναφέρεται από Miller *et al.* 2011).

Το χρώμα των ανθοκυανινών εξαρτάται από το pH (Εικόνα 1.20). Οι ανθοκυανίνες θα μπορούσαν να θεωρηθούν και ως δείκτες pH. Σε ισχυρά όξινο περιβάλλον (pH < 2,5) κυριαρχούν τα ιόντα φλαβυλίου και το χρώμα είναι συνήθως κόκκινο-πορτοκαλί. Σε ασθενώς όξινο περιβάλλον (pH 4 με 6) σχηματίζεται αρχικά βιολετί ανυδροβάση, η οποία γρήγορα ενυδατώνεται σε άχρωμη ψευδοβάση (Goto and Kondo 1991). Σε τιμές pH > 7 οι σχηματίζονται μπλε ανιόντα βάσης (Schwinn and Cavies 2004) και οι ανθοκυανίνες αποικοδομούνται



**Εικόνα 1.20: Εξάρτηση του χρώματος της ανθοκυανίνης από το pH.**

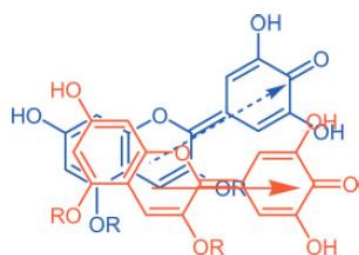
Στις εικόνες εικονίζονται υδατικά διαλύματα της ανθοκυανίνης μαλβίνης σε σταθερή συγκέντρωση αλλά διαφορετικό pH. Από αριστερά προς τα δεξιά σε κάθε εικόνα το pH αυξάνεται. Η αριστερή εικόνα προέρχεται αμέσως μετά τη διάλυση ενώ η δεξιά μετά την πάροδο δύο ωρών. Φαίνεται η αστάθεια του χρώματος στο σύνθητες ασθενώς όξινο pH του χυμοτοπιακού χυμού (εικόνα από Goto and Kondo 1991).

(Castaneda-Ovando *et al.* 2009).

Το κόκκινο έως μωβ-μπλε χρώμα των ανθοκυανινών στον ασθενώς όξινο χυμοτοπιακό χυμό δεν δικαιολογείται επομένως μόνο με την επίδραση του pH (Goto and Kondo 1991). Έχουν βρεθεί μηχανισμοί που σε ελαφρώς όξινο pH αποτρέπουν την

ενυδάτωση της ανυδροβάσης και προσδίδουν σταθερό χρωματισμό στον φυτικό ιστό. Έχει βρεθεί ότι οι γλυκοζίτες μονοσακχαριτών και ιδιαίτερα δισακχαριτών είναι πολύ πιο σταθεροί σε ουδέτερο pH σε σχέση με τις αγλυκόνες. (Fleschhut *et al.* 2006 όπως αναφέρεται από Castaneda-Ovando *et al.* 2009). Ωστόσο έχουν βρεθεί περιπτώσεις φυτών, όπως το *Iroomea* ή μεταλλάγματα *Petunia*, τα οποία φέρουν αλκαλικό χυμοτοπιακό χυμό και μπλε ανθοκυανίνες (Grotewold 2006, Miller *et al.* 2011). Ένας άλλος τρόπος με τον οποίο το

εδαφικό pH επηρεάζει το χρώμα των ανθέων είναι μέσω της διαθεσιμότητας των μεταλλικών ιόντων, όπως στην περίπτωση διαθεσιμότητας  $Al^{3+}$  στο *Hydrangea* (Miller *et al.* 2011).



**Εικόνα 1.21: Διαμοριακή αλληλεπίδραση δύο ανθοκυανινών.** Διακρίνεται η σχετική θέση των δύο αρωματικών πυρήνων των ανθοκυανινών κατά την κάθετη αλληλεπίδρασή τους (εικόνα από Ellestad 2006).

#### 1.5.6.4 Ενδομοριακές και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις με φλαβονοειδή – αλληλεπίδραση με συγχρωστικές

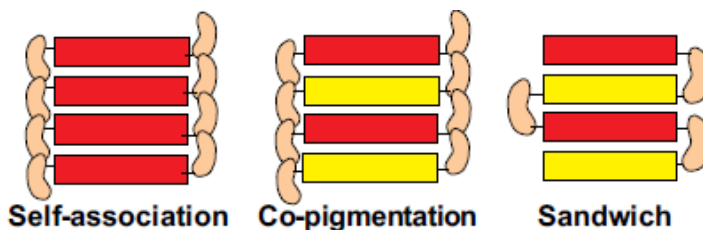
Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των ανθοκυανινών, τόσο αυξάνεται η ένταση του χρώματος, υποδεικνύοντας ότι η αύξηση της συγκέντρωσης προκαλεί και αύξηση της σταθερότητάς τους. Οι ανθοκυανίνες μπορούν να αλληλεπιδρούν με άλλα μόρια. Έχει δειχθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ ιόντων φλαβυλίου ανθοκυανινών σε όξινο pH και ανυδροβάσεων (έγχρωμο μόριο σε ισορροπία με την άχρωμη ψευδοβάση) σε

ουδέτερο pH. Τουλάχιστον δύο μόρια ανθοκυανινών μπορούν να αλληλεπιδρούν κάθετα μέσω των χρωμοφόρων τους (Εικόνα 1.21). Οι αρωματικοί δακτύλιοι αλληλεπιδρούν με

υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μέσω π-δεσμών και η ευρύτερη αλληλεπίδραση ενισχύεται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των σακχάρων (Εικόνα 1.22). Το αποτέλεσμα είναι αλλαγές στην ένταση και πιθανώς και στο μήκος κύματος της απορρόφησης (Goto and Kondo 1991, Ellestad 2006).

Το χρώμα των ανθοκυανινών επηρεάζεται και από το φαινόμενο της αλληλεπίδρασής τους με συγχρωστικές (co-pigmentation). Δηλαδή οι χρωστικές αλληλεπιδρούν με άλλες

άχρωμες οργανικές ενώσεις ή μεταλλικά ιόντα σχηματίζοντας σύνθετες δομές, με αποτέλεσμα φασματική αλλαγή ή/και ενίσχυση της έντασης του χρώματος (Boulton 2001 όπως αναφέρεται από Castaneda-Ovando *et al.* 2009, Glover, 2014). Οι συγχρωστικές (co-pigments) μπορεί να είναι άλλα φλαβονοειδή, αλκαλοειδή, αμινοξέα, οργανικά οξέα, νουκλεοτίδια, πολυσακχαρίτες, μέταλλα



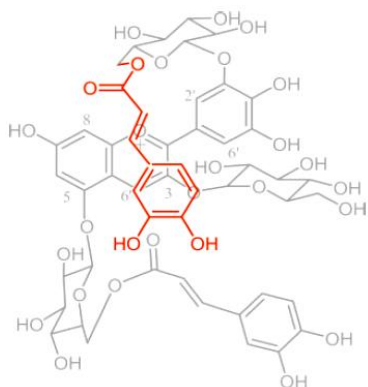
**Εικόνα 1.22:** Σχεδιαγραμματική απεικόνιση των ενδομοριακών και διαμοριακών αλληλεπιδράσεων ανθοκυανινών. Με κόκκινο απεικονίζονται τα μόρια ανθοκυανίνης, με κίτρινο τα μόρια κάποιας συγχρωστικής (φλαβόνη, φλαβονόλη ή αρωματικό οξύ) και το νεφρόσχημη δομή αναπαριστά το σάκχαρο. Αριστερά απεικονίζεται η αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών μορίων ανθοκυανίνης. Στο κέντρο απεικονίζεται σύγχρωση ανάμεσα σε μόρια ανθοκυανίνης και συγχρωστικής. Δεξιά απεικονίζεται ενδομοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ της ανθοκυανιδίνης και κάποιας ομοιοπολικά άλλης αρωματικής ένωσης (π.χ. κατάλοιπο αρωματικού οξέος), μετά από κατάλληλη στερεοδιαμόρφωση (εικόνα από Lee 2007).

και άλλες ανθοκυανίνες. (Castaneda-Ovando *et al.* 2009). Όταν αναμιγνύονται με διάλυμα ανθοκυανίνης, τη σταθεροποιούν και προκαλείται αύξηση της απορρόφησης (hyperchromic effect) και μετατόπισή της προς μεγαλύτερα μήκη κύματος, προσδίδοντας μια πιο μπλε απόχρωση (bathochromic shift) (Goto and Kondo 1991, Lee 2007, Castaneda-Ovando *et al.* 2009). Η αλληλεπίδραση με συγχρωστικές (co-pigments) είναι εμφανής σε ασθενώς όξινο pH, όταν οι ανθοκυανίνες είναι άχρωμες. Το φαινόμενο μπορεί να συμβαίνει ενδομοριακά ή και διαμοριακά, και ως τέτοια περίπτωση μπορεί να θεωρηθεί ακόμα και η αλληλεπίδραση μεταξύ ανθοκυανινών. Όταν η συγχρωστική είναι φαινολική ένωση, η σύγχρωση οφείλεται σε αλληλεπίδραση μεταξύ π-δεσμών (Castaneda-Ovando *et al.* 2009).

Ως συγχρωστικές των ανθοκυανινών δρουν συχνά φλαβόνες ή φλαβονόλες (Schwinp and Cavies 2004). Σε αυτές τις περιπτώσεις η αλληλεπίδραση εξαρτάται από το είδος και τη συγκέντρωση της ανθοκυανίνης και της φλαβόνης, το pH και τη θερμοκρασία (Assen *et al.* 1970 και Hoshimo *et al.* 1980 όπως αναφέρονται από Goto and Kondo 1991). Το φαινόμενο είναι εντονότερο όταν οι ανθοκυανίνη φέρει πλευρικές αρωματικές ομάδες. Αλληλεπίδραση της συγχρωστικής μπορεί να συμβεί και με το ιόν φλαβυλίου και με την ανυδροβόση. Προσδίδει ένα μπλε-μωβ χρώμα και δεν συμβαίνει σε στοιχειομετρική αναλογία. Έχει προταθεί ότι η αλληλεπίδραση με συγχρωστικές μπορεί να προκαλείται από υδρόφοβη αλληλεπίδραση των αρωματικών πυρήνων της ανθοκυανίνης και του φλαβονοειδούς που ίσως ενισχύεται από δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των σακχάρων (Εικόνα 1.22) (Goto and Kondo 1991).



Οι ανθοκυανίνες δύνανται εμφανίζουν και ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, μεταξύ του κύριου αρωματικού τους πυρήνα και κάποιας ή κάποιων πλευρικών ομάδων. Παράγωγα του κινναμμικού οξέος όπως το p-κουμαρικό οξύ και το καφφεϊκό οξύ είναι αρκετά συχνά στις πολυακυλιωμένες ανθοκυανίνες. Συχνές είναι επίσης οι ανθοκυανίνες ακυλιωμένες ή και πολυακυλιωμένες με παράγωγα του βενζοϊκού οξέος ή με μηλονικό οξύ. Έχει



**Εικόνα 1.23:** Ενδομοριακή αλληλεπίδραση στην ανθοκυανίνη γεντιοδελφίνη.

Στην εικόνα φαίνεται η ενδομοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ των αρωματικών πυρήνων της ανθοκυανιδίνης και του κατάλοιπου καφφεϊκού οξέος, ύστερα από κατάλληλη στερεοδιαμόρφωση του μορίου (εικόνα από Ellestad 2006 βασισμένο στο Yoshida *et al.* 1992).

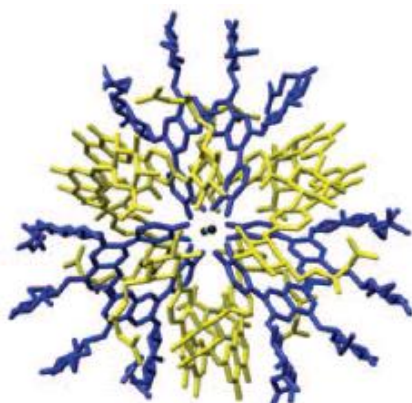
παρατηρηθεί ότι πολυακυλιωμένες ανθοκυανίνες μπορεί να είναι ασυνήθιστα σταθερές σε ασθενώς όξινο pH. Ως εξήγηση σε αυτό το φαινόμενο έχει προταθεί η σταθεροποίηση μέσω υδρόφοβης αλληλεπίδρασης του αρωματικού πυρήνα της ανθοκυανίνης και των αρωματικών ακυλομάδων (Εικόνα 1.23). Οι αρωματικές ομάδες συντάσσονται παράλληλα κατά μία μορφή «σάντουιτς» (Εικόνα 1.22). Αυτό προστατεύει την ψευδοβάση από ενυδάτωση (Goto and Kondo 1991). Επίσης οι ανθοκυανίνες που φέρουν μηλονικό είναι πιο σταθερές σε σχέση με άλλες ανθοκυανίνες πιθανώς γιατί το μηλονικό παρεμποδίζει την χημική μεταβολή της ανθοκυανίνης λόγω των όξινων ιδιοτήτων των ομάδων του μηλονικού (Saito *et al.* 1985 και Figueiredo *et al.* 1999 όπως αναφέρονται από Schwinn and Cavies 2004). Η σταθεροποίηση μέσω ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων έχει προταθεί και για την εμφάνιση μπλε χρώματος όπως στην περίπτωση της χρωστικής γεντιοδελφίνης (Goto and Kondo 1991, Ellestad 2006, Yoshida *et al.* 2009). Παρόμοια περίπτωση αποτελεί η ενδομοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ χρωμοφόρων ανθοκυανίνης και φλαβόνης ομοιοπολικά συνδεδεμένων με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του χρώματος (Toki *et al.* 1994 όπως αναφέρεται από Ellestad 2006). Επιπλέον σε ορισμένες περιπτώσεις έχει προταθεί η ταυτόχρονη συμβολή ενδομοριακών και διαμοριακών αλληλεπιδράσεων στη σταθεροποίηση (Yoshida *et al.* 2009).

#### 1.5.6.5 Αλληλεπιδράσεις με μέταλλα

Οι ανθοκυανίνες συμπλοκοποιούνται και με ιόντα μετάλλων, δομώντας μόρια γνωστά ως υπερμοριακές χρωστικές (supermolecular pigments). Τέτοια κατηγορία ενώσεων αποτελούν οι «μεταλλοανθοκυανίνες». Ως μεταλλοανθοκυανίνες αποκαλούνται αυτοσυσγκροτούμενα, υπερμοριακά σύμπλοκα χρωστικής, που αποτελούνται από ανθοκυανίνες, φλαβόνες και μεταλλικά ιόντα σε στοιχειομετρική αναλογία (Yoshida *et al.* 2009). Οι μεταλλοανθοκυανίνες έχουν συνδεθεί έντονα με τα άνθη μπλε χρώματος, αν και το φαινόμενο είναι ευρύτερο και πιο σύνθετο. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η μπλε χρωστική κομμελινίνη, που αποτελεί ένα σύμπλοκο συγκεκριμένης ανθοκυανίνης, συγκεκριμένης φλαβόνης και  $Mg^{2+}$  σε στοιχειομετρική αναλογία 6:6:2. Στη συγκεκριμένη χρωστική το ιόν μαγνησίου μπορεί να αντικατασταθεί από  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  και  $Mn^{2+}$  και το χρώμα που είναι μπλε ή μωβ. Σε άλλα είδη μεταλλοανθοκυανίνης έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν δύο



είδη μεταλλικών ιόντων, όπως στην πρωτοκυανίνη τα ιόντα  $Fe^{3+}$  και  $Mg^{2+}$  (Εικόνα 1.24).



**Εικόνα 1.24: Τρισδιάστατο μοντέλο της μεταλλοανθοκυανίνης πρωτοκυανίνης.** Με κίτρινο χρώμα εικονίζονται τα μόρια ανθοκυανίνης, με μπλε χρώμα τα μόρια φλαβόνης (γλυκοζίτες) και στο κέντρο ως κόκκινο σφαιρίδια τα  $Fe^{3+}$  και ως πράσινα σφαιρίδια τα  $Mg^{2+}$ . Διακρίνεται η σύνθετη δομή του συμπλόκου και η στενή σχέση των μορίων ανθοκυανίνης και φλαβόνης (εικόνα από Shiono *et al.* 2005 όπως παρατίθεται από Yoshida *et al.* 2009).

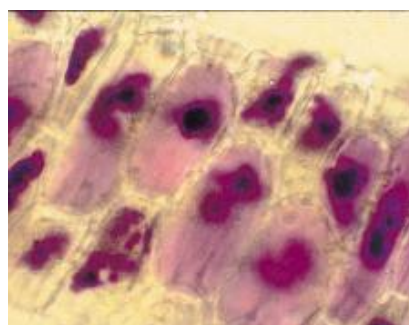
Στην πρωτοκυανίνη τα ιόντα μπορούν να αντικατασταθούν από  $Al^{3+}$ ,  $Ga^{3+}$ ,  $In^{3+}$ ,  $Co^{3+}$  (αντί για  $Fe^{3+}$ ) και  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  (αντί για  $Mg^{2+}$ ). Σε περίσσεια σιδήρου προκύπτει ένα μπλε-μαύρο χρώμα (Yoshida *et al.* 2009). Πιθανώς τα ιόντα αυτά να μεταφέρονται με ειδικούς μεταφορείς μέσα στο χυμοτόπιο, όπου και συγκροτούν τα σύμπλοκα (Glover 2014).

Σε μπλε πέταλα έχει βρεθεί ότι πολύ πιο συχνή από τις μεταλλοανθοκυανίνες είναι η σταθεροποίηση των ανθοκυανινών (με μικρότερη ισχύ από τις μεταλλοανθοκυανίνες, ωστόσο) σε σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα ως συγχρωστικές σε μη στοιχειομετρική αναλογία. Αυτές οι ενώσεις είναι μπλε μόνο σε υδατικό διάλυμα και όχι μετά από κρυστάλλωση. Σε τέτοιες ενώσεις μπορεί να συμμετέχουν ανθοκυανίνες, φλαβόνες ή φλαβονόλες και μεταλλικά ιόντα (π.χ.  $Al^{3+}$  στο φυτό *Hydrangea macrophylla*) (Yoshida *et al.* 2009). Έχουν βρεθεί και αλληλεπιδράσεις μετάλλων με άλλα φλαβονοειδή, όπως η περίπτωση του φυτού *Tagetes patula*, στο οποίο φλαβονοειδή συγγενή

της κερκετίνης (quercetin) δίνουν σκούρο πορτοκαλί χρώμα μετά από αλληλεπίδραση με χρώμιο και καφετί χρώμα μετά από αλληλεπίδραση με χαλκό, ενώ το φυσικό χρώμα είναι ανοιχτό κίτρινο (Miller *et al.* 2011).

#### 1.5.6.6 Χωρικός εντοπισμός ανθοκυανινών

Έχει παρατηρηθεί ότι σε ορισμένα φυτά οι ανθοκυανίνες συγκεντρώνονται σε μικρά σωματίδια, σχηματίζοντας σφαιρίδια στα χυμοτόπια ορισμένων ιστών. Αυτά τα σωματίδια έχουν αποκληθεί «ανθοκυανοπλάστες», αν και αυτή η ονομασία έχει εγκαταλειφθεί και πλέον ονομάζονται χυμοτοπιακά έγκλειστα ανθοκυανίνης (Anthocyanic Vacuolar Inclusions – AVIs) (Εικόνα 1.25). Αυτού του τύπου τα έγκλειστα έχουν παρατηρηθεί σε αρκετά άνθη και έχουν αισθητή επίδραση στο χρωματικό αποτέλεσμα είτε αυξάνοντας την ένταση, είτε μεταβάλλοντας τη χροιά. Μελέτη από τους Markham *et al.* (2000) σε μωβ άνθη του φυτού *Eustoma grandiflorum* έδειξαν ότι τα χυμοτοπιακά έγκλειστα ανθοκυανίνης, τα οποία δεν είναι παρόντα σε όλη την έκταση των πετάλων (Εικόνα 1.25),



**Εικόνα 1.25: Χυμοτοπιακά έγκλειστα ανθοκυανίνης (AVIs) από *Eustoma grandiflorum*.** Εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο περιοχής της άνω επιδερμίδας πετάλου του άνθους *Eustoma grandiflorum* που φέρει AVIs. Ακόμα και οπτικά διακρίνεται η χρωματική διαφορά στα AVIs και στον χυμοτοπιακό χυμό (εικόνα από Markham *et al.* 2000),

ευθύνονται για τοπική διαφοροποίηση του χρώματος (εν προκειμένω προς το μπλε). Τα σωματίδια αυτά δεν περιβάλλονται από μεμβράνη και είναι αδιάλυτα στα περισσότερα υδατικά διαλύματα, ακόμα και με χρήση κοινών ήπιων απορρυπαντικών. Ανάλυση έδειξε ότι τα σωματίδια αυτά αποτελούνται από πρωτεϊνικό στρώμα μίγματος πρωτεϊνών πάνω στο οποίο βρίσκονται προσδεμένες οι ανθοκυανίνες. Παρατηρήθηκαν ωστόσο διαφοροποιήσεις μεταξύ των ανθοκυανινών που είναι προσδεμένες στις πρωτεΐνες των εγκλείστων και των ανθοκυανινών που βρίσκονται διαλυμένες στον χυμοτοπιακό χυμό. Οι συγχρωστικές φλαβονόλες που αλληλεπιδρούν με τις ανθοκυανίνες του χυμοτοπιακού χυμού δεν εντοπίστηκαν στα έγκλειστα. Επιπλέον 4 από τις 9 ανθοκυανίνες του πετάλου εντοπίζονται μόνο στα έγκλειστα. Γενικά η πρόσδεση στις πρωτεΐνες του εγκλείστου γίνεται πολύ εκλεκτικά, αλλά με μηχανισμό στον οποίο δεν εμπλέκονται μεταλλικά ιόντα. Η μελέτη του συγκεκριμένου άνθους αποτελεί μια ιδέα για τη γενικότερη φύση των χυμοτοπιακών εγκλείστων ανθοκυανίνης. Πιθανώς η ισχυρή πρόσδεση να συμβαίνει με στερεοχημικά ευνοούμενους δεσμούς υδρογόνου, ιδιαίτερα για γλυκοζίτες ανθοκυανίνης με δισακχαρίτες, που εντοπίζονται μόνο στα έγκλειστα. Χυμοτοπιακά έγκλειστα ανθοκυανίνης έχουν βρεθεί και σε άλλα φυτά (Markham *et al.* 2000).

Στα άνθη οι ανθοκυανίνες εντοπίζονται συνήθως στα πέταλα, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις και στα σέπαλα ή στη σπάθη. Όλα τα φυτικά κύτταρα δύνανται να συνθέσουν φλαβονοειδή καθώς δεν απαιτούνται ιδιαίτερες δομές για τη σύνθεσή τους, αλλά η σύνθεσή τους βρίσκεται υπό αυστηρό χωρικό και χρονικό έλεγχο (Lee 2007). Οι ανθοκυανίνες εντοπίζονται συνήθως στα επιδερμικά κύτταρα, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις ορχιδέων και φυτών της οικογένειας Boraginaceae εντοπίζονται σε υπο-επιδερμικούς ιστούς. Υποκυτταρικά εντοπίζονται στο χυμοτόπιο, σε ορισμένες περιπτώσεις στα χυμοτοπιακά έγκλειστα ανθοκυανίνης (Schwinn and Cavies 2004, Lee 2007).

## 1.6 Δομικό χρώμα

Το χρώμα αποτελεί χαρακτηριστικό που εξαρτάται συνδυαστικά από τα χαρακτηριστικά του προς μελέτη σώματος αλλά και από το οπτικό σύστημα του παρατηρητή. Για παράδειγμα, όταν προσπίπτει σε ένα σώμα λευκό φως, ανακλάται μόνο το κόκκινο φως και απορροφάται το υπόλοιπο ορατό φάσμα (για χάρη του παραδείγματος περιοριζόμαστε στην περιοχή του ορατού φωτός), τότε ένας άνθρωπος θα το αντιληφθεί ως κόκκινο, αλλά από ένα ζώο που δεν έχει την ικανότητα αντίληψης (φωτοϋποδοχείς) του κόκκινου φωτός αυτό το σώμα θα φαινόταν μαύρο (Glover and Whitney 2010). Το χρώμα των σωμάτων συχνά προκύπτει από δύο μηχανισμούς. Ο ένας είναι το «χημικό χρώμα» (chemical colour) ή χρώμα χρωστικών (pigmentary colour), δηλαδή το χρώμα που οφείλεται σε κάποιες χρωστικές ουσίες. Χρωστικές ουσίες ονομάζονται οι χημικές ενώσεις που απορροφούν ή/και ανακλούν κάποια/ες περιοχή/ές από το ορατό φάσμα. Ο άλλος τρόπος παραγωγής είναι το «δομικό χρώμα» (structural colour) (Glover and Whitney 2010). Σε αυτή την περίπτωση το χρώμα οφείλεται σε οπτικές ιδιότητες (συμβολή, ανάλυση, ανάκλαση, σκέδαση, διάθλαση, περίθλαση) κατά την αλληλεπίδραση του φωτός με νανοδομές του σώματος, οι οποίες φέρουν διαστάσεις νανομέτρων και συχνά παρόμοιες σε μέγεθος με το μήκος κύματος του φωτός. Ωστόσο σε πολλές περιπτώσεις χρωστικές συνυπάρχουν με νανοδομές και δρουν συνεργατικά για να δώσουν το τελικό χρωματικό και οπτικό αποτέλεσμα.

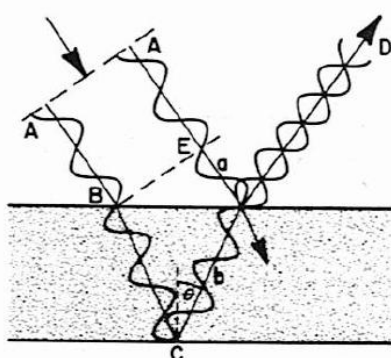
### 1.6.1 Γενικά στοιχεία και βασικές έννοιες

Το δομικό χρώμα (structural colour) παράγεται από οπτικές ιδιότητες (συμβολή, ανάλυση, ανάκλαση, σκέδαση, διάθλαση, περίθλαση) κατά την αλληλεπίδραση του φωτός με νανοδομές. Σε αντίθεση με το χρώμα των χρωστικών, το δομικό χρώμα έχει καθαρά φυσική προέλευση. Οι βασικοί μηχανισμοί από τους οποίους ή/και από συνδυασμούς των οποίων προκύπτει δομικό χρώμα στη φύση είναι οι ακόλουθοι: συμβολή σε λεπτά υμένα (thin-layer interference), πολύστρωμη συμβολή (multilayer interference), φαινόμενο φράγματος περίθλασης (diffraction grating effect), φωτονικοί κρύσταλλοι (photonic crystals) και σκέδαση του φωτός (light scattering) (Kinoshita and Yoshioka 2005, Kinoshita *et al.* 2008). Μια άλλη διαφορά του δομικού χρώματος σε σχέση με το χημικό χρώμα, είναι ότι στο δομικό χρώμα δεν είναι η απαραίτητη η απώλεια ενέργειας του φωτός κατά την αλληλεπίδρασή του με το σώμα, ενώ στην περίπτωση των χρωστικών ένα τμήμα της φωτεινής ενέργειας μεταφέρεται στα ηλεκτρόνια της χρωστικής (Kinoshita *et al.* 2008). Μία έννοια σχετική με το δομικό χρώμα είναι ο ιριδισμός (iridescence). Ιριδισμός ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο το χρώμα, και πιο συγκεκριμένα η απόχρωση (hue), που παρατηρείται μεταβάλλεται σε σχέση με τη γωνία παρατήρησης. (Kinoshita *et al.* 2008, Whitney *et al.* 2009, Glover and Whitney 2010). Το δομικό χρώμα μπορεί να συνεπάγεται ιριδισμό, μπορεί και όχι, αναλόγως με τον μηχανισμό που το δημιουργεί (Kinoshita *et al.* 2008). Ωστόσο αντίστροφα, ο ιριδισμός είναι μοναδική ιδιότητα του δομικού χρώματος και ως εκ τούτου η παρατήρηση ότι το χρώμα (ορατό ή και υπεριώδες) μεταβάλλεται σε σχέση με τη γωνία παρατήρησης, αποτελεί ισχυρή ένδειξη για παρουσία δομικού χρώματος (Glover and Whitney 2010). Επιπλέον, εν γένει, τα δομικά χρώματα φαίνονται πιο έντονα επειδή είναι πιο έντονα σε σχέση με τα χρώματα χρωστικών που φαίνονται πιο μουντά.

Αυτό συμβαίνει γιατί το δομικό χρώμα είναι πιο αποτελεσματικό στην επιλεκτική ανάκλαση συγκεκριμένου εύρους μήκους κύματος, σε σύγκριση με τις χρωστικές που επιτρέπουν συνήθως ανάκλαση ακτινοβολίας μεγαλύτερου εύρους (Glover and Whitney 2010, Glover *et al.* 2012).

### 1.6.2 Φυσικοί μηχανισμοί παραγωγής δομικού χρώματος

Η συμβολή σε λεπτά υμένα είναι ένας από τους σχετικά απλούς οπτικούς μηχανισμούς που οδηγούν σε δομικό χρώμα, και συνήθως σε ιριδισμό. Ας θεωρήσουμε μία μονοχρωματική ακτίνα που προσπίπτει υπό γωνία σε ένα λεπτό υμένο (Εικόνα 1.26). Κατά την πρόσπτωση ένα μέρος της ακτίνας θα ανακλαστεί και ένα μέρος της ακτίνας θα διαθλαστεί μέσα στο υμένο. Μέρος της ακτίνας που διαθλάται, σκεδάζεται (ανακλάται) μέσα στο υμένο (και εν μέρει πιθανώς να διαθλαστεί και εξέλθει). Έπειτα θα ξαναβρεθεί στην αρχική διεπιφάνεια

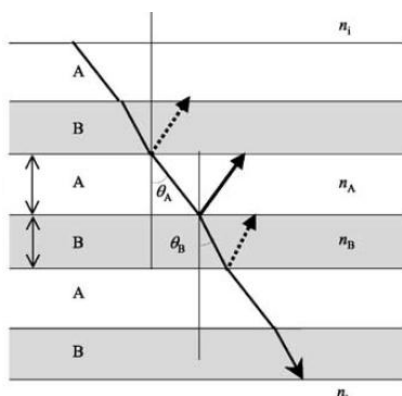


**Εικόνα 1.26: Συμβολή σε λεπτά υμένα.** Αρχικά οι (μονοχρωματικές) ακτίνες AB και AE βρίσκονται σε φάση. Η ακτίνα AED υφίσταται ανάκλαση επιφανειακά στο υμένο, ενώ η ακτίνα ABCD διαθλάται εισερχόμενη στο υμένο, ανακλάται εσωτερικά στην κάτω επιφάνειά του και διαθλάται εξερχόμενη. Η διαφορά στις οπτικές διαδρομές των δύο ακτίνων έχει ως αποτέλεσμα διαφορά στις φάσεις τους. Στην εικονιζόμενη περίπτωση η διαφορά είναι τέτοια ώστε να συμβάλλουν πλήρως αποσβεστικά (απουσία χρώματος) (εικόνα από Nassau 1983).

υμενίου-αέρα όπου ένα μέρος της θα ανακλαστεί και θα παραμείνει μέσα στο υμένο, και ένα μέρος της θα διαθλαστεί και θα εξέλθει στο εξωτερικό περιβάλλον (Εικόνα 1.26). Επομένως μία ακτίνα που ανακλάται κατευθείαν μπορεί να συμπέσει με μία άλλη ακτίνα που έχει διέλθει από το υμένο και σκεδαστεί (ανακλαστεί) μέσα στο υμένο, και κατά την απομάκρυνσή τους από το υμένο να συμβάλλουν (Εικόνα 1.26). Αυτές οι δύο ακτίνες θα έχουν διανύσει μια διαφορετικού μήκους (οπτική) διαδρομή η κάθε μία. Αυτή η διαφορά μεταξύ των διαδρομών τους καθορίζουν το είδος της συμβολής που θα έχουν. Η συμβολή μπορεί να οδηγήσει σε ενίσχυση της ακτίνας (ενισχυτική συμβολή), ή σε κατασίγαση της ακτίνας (αποσβεστική συμβολή), ακόμα και σε πλήρη κατασίγαση του φωτός (Εικόνα 1.26). Η (γεωμετρική) διαφορά στη διαδρομή (συμβολίζεται  $p$ ) εξαρτάται από τον δείκτη διάθλασης του υμενίου, τη γωνία πρόσπτωσης της ακτίνας και το πάχος του υμενίου (Αλεξόπουλος 1966, Nassau 1983). Στη συνέχεια διακρίνονται δύο περιπτώσεις: η πρώτη είναι αν πίσω από το υμένο βρίσκεται υλικό με μικρότερο δείκτη διάθλασης από το υμένο, και η δεύτερη αν πίσω

από το υμένο βρίσκεται υλικό με μεγαλύτερο δείκτη διάθλασης από το υμένο. Στην πρώτη περίπτωση ισχύει η σχέση  $p=m\lambda$ , ενώ στη δεύτερη ισχύει η σχέση  $p=(m-\frac{1}{2})\lambda$ , όπου  $\lambda$  το μήκος κύματος. Αν το  $m$  προκύπτει ακέραιος αριθμός προκαλείται πλήρως ενισχυτική συμβολή, ενώ αν προκύπτει ημιακέραιος προκαλείται πλήρως αποσβεστική συμβολή. Ως αποτέλεσμα ο παρατηρητής αντιλαμβάνεται μία ποικιλότητα στην ένταση του χρώματος - από μηδενική έως πολύ έντονη - πάνω στο υμένο, αφού η διαφορετική γωνία ανάκλασης (και αντίστοιχα η γωνία παρατήρησης) από κάθε σημείο, αντιστοιχεί σε διαφορετικό μήκος

διαδρομής και επομένως διαφορετική τιμή  $m$ . Στις εξισώσεις για τη διαφορά των διαδρομών μπορούν να θεωρηθούν ως διαφορετικές ακτίνες που συμβάλλουν ακόμα και δύο ανακλώμενες ακτίνες που έχουν προκύψει από την ίδια προσπίπτουσα ακτίνα. Σε αυτήν την περίπτωση οι δύο συμβάλλουσες ακτίνες έχουν προέλθει από την ανάκλαση της ίδιας προσπίπτουσας αλλά η μία έχει διέλθει πρώτα από το υμένιο και η άλλη όχι, και επομένως υπάρχει διαφορά στο μήκος της διαδρομής που έχει διανύσει η καθεμία. Σημειώνεται ότι σε κάθε περίπτωση η γωνία ανάκλασης ισούται με τη γωνία πρόσπτωσης (Nassau 1983) Στην περίπτωση του λευκού φωτός η κατάσταση είναι πιο σύνθετη, διότι για κάθε μήκος κύματος προκύπτει διαφορετική τιμή του αριθμού  $m$ , και κάθε μήκος κύματος αντιστοιχεί σε διαφορετική τιμή δείκτη διάθλασης. Δηλαδή, υπό συγκεκριμένη γωνία παρατήρησης άλλα χρώματα του λευκού φωτός φαίνονται ενισχυμένα και άλλα κατασιγασμένα. Επομένως τώρα από τη γωνία παρατήρησης εξαρτάται το ίδιο το χρώμα, δηλαδή παρατηρείται ιριδισμός (Αλεξόπουλος 1968, Nassau 1983). Ο λόγος για τον οποίον το υμένιο πρέπει να είναι ιδιαίτερα λεπτό (ενδεικτικά πλάτους  $0,5 \mu\text{m}$ ) προκειμένου να παρατηρηθεί χρωματικό αποτέλεσμα είναι ο ακόλουθος: Για ένα ορισμένο υμένιο πρέπει ο ακέραιος αριθμός  $m$  (αριθμός πλήθους αποσβεστικών συμβολών) να είναι μικρός. Με αυτόν τον τρόπο ο αριθμός των χρωμάτων (στην ορατή περιοχή) που λείπουν από το λευκό φως και αντίστοιχα των συμπληρωματικών που αναδεικνύονται δίνει ένα σαφές και αισθητό χρωματικό αποτέλεσμα. Αν το πάχος του υμενίου αυξηθεί (ενδεικτικά  $0,5 \text{mm}$ ), τότε ο αριθμός των χρωμάτων (στην ορατή περιοχή) που λείπουν είναι πάρα πολλά και ισοκατανεμημένα σε όλο το εύρος του ορατού φάσματος, με αποτέλεσμα να μην προκύπτει σαφής χρωματική απόχρωση αλλά να υπερισχύει το λευκό φως (Αλεξόπουλος 1966).



**Εικόνα 1.27: Πορεία μιας (μονοχρωματικής) ακτινοβολίας σε πολύστρωμη δομή.** Η ακτίνα διέρχεται διαδοχικά από τα στρώματα των δύο οπτικών υλικών. Σε κάθε διεπιφάνεια υφίσταται ανάκλαση και διάθλαση. Οποιοσδήποτε δύο ανακλώμενες συμβάλλουν, συντελούν στο οπτικό αποτέλεσμα (εικόνα από Kinoshita and Yoshioka 2005).

Η πολύστρωμη συμβολή αποτελεί έναν μηχανισμό παραγωγής δομικού χρώματος που φέρει κοινά σημεία με τη συμβολή σε λεπτά υμένια. Απαντάται σε πολύστρωμες δομές που αποτελούνται από διαδοχικά στρώματα από δύο υλικά A και B με διαφορετικούς δείκτες διάθλασης, τα οποία είναι τοποθετημένα εναλλάξ με περιοδικότητα (Εικόνα 1.27). Και πάλι η συνθήκη από την οποία κρίνεται αν δύο ανακλώμενες ακτίνες με διαφορετικό μήκος διαδρομής μέσα στη δομή αυτή εξαρτώνται από

τους δείκτες διάθλασης των δύο υλικών, το πάχος των στρωμάτων, τη γωνία πρόσπτωσης και από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Η μαθηματική έκφραση είναι, όπως αναμένεται, πιο σύνθετη. Προϋπόθεση για την πειραματική ανταπόκριση των βασικών

μαθηματικών εκφράσεων είναι η διαφορά ανάμεσα στους δείκτες διάθλασης των υλικών A και B να είναι μικρή. Μετρήσεις έχουν δείξει ότι καθώς αυξάνεται ο αριθμός των διαδοχικών στρωμάτων προκαλείται αύξηση της μέγιστης ανάκλασης, και ταυτόχρονη μείωση του εύρους μήκους κύματος που παρουσιάζει μέγιστη ανάκλαση. Επίσης η ανάκλαση αυξάνεται όταν ο λόγος μεταξύ των διαδρομών της ακτίνας στα μέσα A και B πλησιάζει το 1, δηλαδή όταν οι διαδρομές είναι παρόμοιες. Το δομικό χρώμα λόγω πολύστρωμης συμβολής ταυτίζεται συχνά με ιριδισμό (Kinoshita and Yoshioka 2005, Kinoshita *et al.* 2008).

Η μαθηματική μελέτη των οπτικών ιδιοτήτων των φωτονικών κρυστάλλων είναι σύνθετη. Οι φωτονικοί κρύσταλλοι αποτελούνται από μικρά όμοια σωματίδια σε κανονική διάταξη –σε

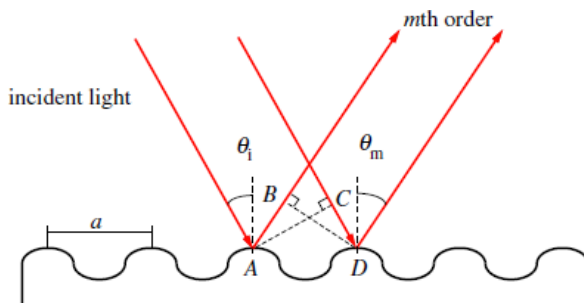


**Εικόνα 1.28:** Ηλεκτρονιογραφία από συνθετικό οπάλιο. Παράδειγμα τρισδιάστατου φωτονικού κρυστάλλου (εικόνα από Nassau 1983).

αντιστοιχία με έναν κρύσταλλο-τα οποία αλληλεπιδρούν με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που προσπίπτει πάνω τους. Όταν φως προσπίπτει σε έναν φωτονικό κρύσταλλο, σκεδάζεται στα σωματίδια του κρυστάλλου, με αποτέλεσμα συμβολή και δευτερογενείς εκπομπές σε κανονικές διευθύνσεις. Οι περιοδικές δομές των φωτονικών κρυστάλλων στη φύση μπορεί να είναι μίας, δύο ή τριών διαστάσεων (Kinoshita *et al.* 2008). Παράδειγμα ιριδισμού από τρισδιάστατο φωτονικό κρύσταλλο είναι ο οπάλιος (opal) που περιέχει σφαιρίδια πυριτίου (Εικόνα 1.28). Το χρώμα καθορίζεται από το μέγεθος και την κανονικότητα των σφαιριδίων (Glover and Whitney 2010).

Το φράγμα περίθλασης μπορεί να αναφέρεται σε φράγμα περίθλασης κατά την διέλευση (transmission grating) ή κατά την ανάκλαση (reflection grating) (Nassau 1983). Οι οπτικές δομές που οδηγούν σε δομικό χρώμα στους ζωντανούς οργανισμούς υπάγονται στην περίπτωση του φράγματος περίθλασης κατά την ανάκλαση. Για την παρατήρηση αυτού του φαινομένου απαιτείται μία επιφάνεια με πυκνές νανοδομές από παράλληλες γραμμώσεις (striations) που προεξέχουν σαν πτυχώσεις (ridges), και αντιστοίχως παράλληλα αυλάκια (grooves) (Εικόνα 1.29).

Όταν προσπίπτει σε αυτές λευκό φως υπό γωνία, τότε αναλύεται και κάθε μήκος κύματος σκεδάζεται υπό διαφορετική γωνία. Η γωνία σκέδασης εξαρτάται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, τη γωνία πρόσπτωσης και την πυκνότητα των γραμμώσεων (Nassau 1983, Glover and Whitney 2010, Vignolini *et al.* 2013b). Για δεδομένη γωνία πρόσπτωσης, η γωνία ανάκλασης (σκέδασης) αυξάνεται -εντός κάποιων ορίων- με αύξηση του μήκους κύματος (Nassau 1983, Glover and Whitney 2010). Για να είναι αποτελεσματικό το φαινόμενο πρέπει το εγκάρσιο



**Εικόνα 1.29:** Περίθλαση σε φράγμα ανάκλασης. Συνθήκη για ενισχυτική συμβολή είναι η διαφορά AB-CD να είναι πολλαπλάσιο του μήκους κύματος (Vignolini *et al.* 2013b).

πλάτος των πτυχώσεων να είναι κατά πολύ μικρότερο του μήκους κύματος (Vignolini *et al.* 2013b). Παράδειγμα ιριδισμού από ένα τέτοιο φαινόμενο αποτελεί η κάτω επιφάνεια ενός CD (Whitney *et al.* 2009, Glover and Whitney 2010). Κατά το τυπικό φράγμα περίθλασης προκύπτει ιριδισμός, γιατί ανακλώνται όλα τα μήκη κύματος (χρώματα) αλλά υπό διαφορετική γωνία (Wenzel and Vignolini 2018). Μια συγκριτική παρατήρηση που δείχνει την ποικιλότητα των οπτικών μηχανισμών που παράγουν δομικό χρώμα και ιριδισμό είναι ότι κατά το φράγμα περίθλασης η περιοδικότητα των πτυχώσεων βρίσκεται παράλληλα προς την επιφάνεια του αντικειμένου, ενώ στην πολύστρωμη συμβολή η περιοδικότητα των στρωμάτων βρίσκεται κάθετα προς την επιφάνεια του αντικειμένου (Parker 1998).

Διάφοροι χρωματισμοί μπορεί να οφείλονται σε φαινόμενα σκέδασης (scattering) του φωτός. Σκέδαση ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο μία δέσμη φωτός προσπίπτει σε έναν χώρο (π.χ. διάλυμα ή κolloειδές) που περιέχει μικρά σωματίδια, και μετά από αλληλεπίδραση με αυτά παρεκτρέπεται από την ευθύγραμμη πορεία της και διαχέεται προς όλες τις κατευθύνσεις (Αλεξόπουλος 1966). Βασική διαφορά στο δομικό χρώμα μέσω σκέδασης σε σχέση με το δομικό χρώμα λόγω άλλων μηχανισμών είναι ότι κατά το δομικό χρώμα λόγω σκέδασης βασίζεται στην ανομοιόμορφη κατανομή και την άτακτη νανοδομή, ενώ οι άλλοι μηχανισμοί βασίζονται στην περιοδικότητα και την κανονικότητα (Kinoshita and Yoshioka 2005, Kinoshita *et al.* 2008). Το μήκος κύματος του φωτός μπορεί να μεταβάλλεται κατά τη σκέδαση, αλλά μπορεί και όχι. Τρεις ιδιαίτερες περιπτώσεις σκέδασης κατά τις οποίες δεν αλλάζει το μήκος κύματος είναι η σκέδαση Rayleigh, η σκέδαση Mie και το μπλε Tyndall, το οποίο απαντάται συχνά σε βιολογικές δομές. Η σκέδαση Rayleigh συμβαίνει σε σωματίδια που αιωρούνται σε ένα μέσο (π.χ. στον ατμοσφαιρικό αέρα ή σε υδατικό διάλυμα). Σε αυτόν τον τύπο σκέδασης το φως σκεδάζεται κατά την αλληλεπίδρασή του με τα σωματίδια πλάγια, δηλαδή απομακρυνόμενο από την αναμενόμενη ευθύγραμμη πορεία του. Η σκέδαση είναι εντονότερη στα μικρά μήκη κύματος και με αυτόν τον τρόπο, στο σκεδαζόμενο φως υπερτερεί το μπλε ή μωβ χρώμα, ενώ στο διερχόμενο υπερτερεί το κοκκινωπό. Για να είναι αποτελεσματική μία μπλε σκέδαση Rayleigh, τα σωματίδια πρέπει να έχουν μικρότερο μέγεθος από το μήκος κύματος του ορατού φωτός. Η ακριβής απόχρωση εξαρτάται από τις ιδιότητες των σωματιδίων (μέγεθος, κατανομή, διευσθέτηση, σχήμα). Στη σκέδαση Rayleigh οφείλεται το γαλάζιο χρώμα του ουρανού το μεσημέρι αλλά και το κοκκινωπό το ξημέρωμα και σούρουπο (Αλεξόπουλος 1966, Nassau 1983). Όταν τα σωματίδια προσεγγίζουν ή και υπερβαίνουν το μήκος κύματος του φωτός συμβαίνει σκέδαση Mie. Η σκέδαση Mie είναι πολύ πιο σύνθετο φαινόμενο και μπορεί να οδηγήσει στην ταυτόχρονη εμφάνιση πολλών χρωμάτων (polychroism) με την προϋπόθεση ότι τα σωματίδια έχουν ακριβώς το ίδιο μέγεθος, αλλιώς προκύπτει λευκός χρωματισμός. Σε αυτό το φαινόμενο οφείλεται ο λευκωπός χρωματισμός της ομίχλης και των χαμηλών νεφών (Nassau 1983). Η σκέδαση που προκαλεί μπλε Tyndall οφείλεται σε μικρά κolloειδή σωματίδια. Απαραίτητες προϋποθέσεις για να θεωρηθεί ένα μέσο ικανό να δώσει το μπλε Tyndall είναι οι ακόλουθες: ανομοιογένειες στον δείκτη διάθλασης, διαστάσεις συγκρίσιμες με το μήκος κύματος του φωτός, σκέδαση για το μπλε χρώμα και διέλευση για το κόκκινο, χροιά του μπλε που εξαρτάται από το μέγεθος, πόλωση κατά τη σκέδαση, αντίστροφη αναλογία της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός με την τέταρτη δύναμη του μήκους κύματος (Mason 1923, 1926 όπως αναφέρονται από Kinoshita



et al. 2008). Κατά τη σκέδαση Tyndall δεν παρατηρείται μέγιστο στο φάσμα του ορατού κατά την ανάκλαση, αλλά μια βαθμιαία αύξηση στην ανάκλαση με τη μείωση του μήκους κύματος, η οποία συνεχίζεται και προς το υπεριώδες (Lee 2007). Το μπλε Tyndall φέρει αρκετές ομοιότητες με τη σκέδαση Rayleigh (Nassau 1983).

Προκειμένου να διαπιστωθούν τα δομικά χρώματα στις βιολογικές δομές έχουν διατυπωθεί κριτήρια, ορισμένα από τα οποία αποτελούν ισχυρές ενδείξεις για την παρουσία δομικού χρώματος. Ακολουθούν τα κριτήρια του Mason τροποποιημένα, επικαιροποιημένα και στη μορφή που παρουσιάζονται από τον Nassau (1983). Τα δομικά χρώματα από συμβολή ή περίθλαση αφορούν συνήθως ανακλώμενο φως, ενώ το περιεχόμενο του διερχόμενου φωτός οφείλεται συνήθως στις χρωστικές. Η λεύκανση (bleaching) του βιολογικού υλικού επηρεάζει μόνο τα χημικά χρώματα. Ακόμα και αν κάποια δομικά χρώματα φαίνεται να εξαφανίζονται, αυτά επανεμφανίζονται αν το υλικό αντιπαρατεθεί προς μαύρο φόντο. Η έκπλυση των χρωστικών με οργανικούς διαλύτες επιφέρει παρόμοια αποτελέσματα. Η εφαρμογή υγρού στο υλικό το οποίο δεν επιφέρει έκπλυση των χρωστικών και δεν αντιδρά



**Εικόνα 1.30: Δομικό χρώμα στα φτερά της πεταλούδας *Morpho rhetenor*.** Μια σταγόνα ακετόνης προκαλεί αλλαγή του χρώματος. Γενικά αν η εμπότιση ενός υλικού σε διαλύτη με άλλον δείκτη διάθλασης, προκαλέσει αλλαγή του χρώματος, και απομάκρυνση του διαλύτη προκαλεί επαναφορά του αρχικού χρώματος, τότε υπάρχει ισχυρή ένδειξη παρουσίας δομικού χρώματος (εικόνα από Nassau 1983).

*Columba livia*. Τα φτερά αυτά μπορεί να φαίνονται πρασινωπά ή μωβ αναλόγως την οπτική γωνία. Σε μικροσκοπικό επίπεδο οι μύστακες των πούπουλων αποτελούνται από έναν λεπτό έξω φλοιό που περικλείουν ακαθόριστα κατανεμημένα κοκκία μελανίνης στο

χημικά με αυτές, αλλά έχει παραπλήσιο δείκτη διάθλασης με αυτόν του βιολογικού υλικού, συνεπάγεται συνήθως «απομάκρυνση» των δομικών χρωμάτων, λόγω αλλαγών της πορείας των οπτικών ακτίνων (Εικόνα 1.30). Διάταση ή συμπίεση του υλικού πιθανώς επηρεάζει τα χρώματα αλλά δεν επηρεάζει τα χρώματα λόγω χρωστικών. Τα χρώματα λόγω συμβολής ή περίθλασης μεταβάλλονται με τη γωνία παρατήρησης (ιριδισμός) σε αντίθεση με τα χημικά χρώματα. Μικροσκοπικά επιφανειακά μοτίβα στο ανάγλυφο κατάλληλων διαστάσεων μπορεί να υποδεικνύουν φράγμα περίθλασης. Επίσης κατάλληλου μεγέθους μεμβρανώδεις δομές μπορεί να υποδεικνύουν περίθλαση από λεπτό υμένιο. Η ιδιότητα ενός υλικού να ανακλά το φως ως κυκλικά πολωμένο μπορεί να μαρτυρά την αντίστοιχη ειδική περίπτωση δομικού χρώματος (Nassau 1983).

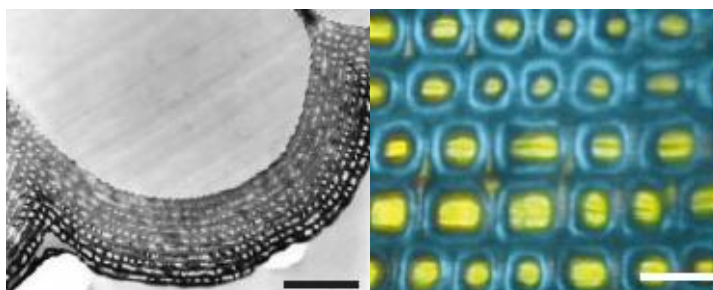
### 1.6.3 Δομικό χρώμα σε ζώα

Ο δομικός χρωματισμός έχει μελετηθεί εκτενώς στα ζώα. Υπάρχουν πολλές περιπτώσεις στις οποίες έχει διαπιστωθεί δομικός χρωματισμός, από πολύ διαφορετικά ζωικά φύλα και με πολλούς διαφορετικούς τρόπους βασιζόμενους στους φυσικούς οπτικούς μηχανισμούς που παρουσιάστηκαν. Ο απλούστερος μηχανισμός, αυτός της συμβολής σε λεπτά υμένια, οφείλεται για το δομικό χρώμα και τον ιριδισμό στα πούπουλα στον λαϊμό του περιστεριού



εσωτερικό του. Ο εξωτερικός φλοιός ευθύνεται για το ιριδίζον αποτέλεσμα (Yoshioka *et al.* 2008 όπως αναφέρεται από Kinoshita *et al.* 2008).

Πολύστρωμες δομές που ευθύνονται για δομικό χρώμα έχουν αναφερθεί σε πολλές περιπτώσεις ζωικών δομών. Εκτός από τα πολύ μελετημένα φτερά της πεταλούδας *Morpho rhetenor* (Εικόνα 1.30), στην οποία το μπλε χρώμα σχηματίζεται από αλληπάλληλα

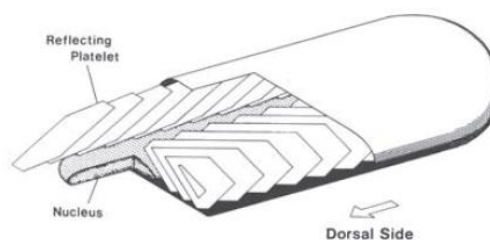


**Εικόνα 1.31: Μικροκοιλότητες στα φτερά του *Papilio palinurus*.** Αριστερά: Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης που φαίνεται σε εγκάρσια τομή η πολύστρωμη δομή που περιβάλλει την μικροκοιλότητα και οφείλεται για το πράσινο χρώμα των φτερών. Κλίμακα 1 μm. Δεξιά: Μικροσκοπική εικόνα που φαίνονται διακριτά η κίτρινη και η μπλε συνιστώσα του πράσινου χρώματος. Κλίμακα 6 μm. (εικόνα από Vukusik and Sambles 2003).

στρώματος επιδερμιδίου (cuticle) και αέρα (Vukusic and Sambles 2003, Kinoshita and Yoshioka 2005, Kinoshita *et al.* 2008). Άλλη περίπτωση πιο σύνθετης δομής βασιζόμενης στην πολύστρωμη συμβολή αποτελεί η πράσινη πεταλούδα *Papilio palinurus*. Τα λέπια των φτερών της φέρουν μικροσκοπικές κοιλότητες που περιβάλλονται από

πολύστρωμες δομές επιδερμιδίου και αέρα (Εικόνα 1.31). Όταν το φως πέφτει κάθετα στο βάθος της κοιλότητας ανακλάται επιλεκτικά το κίτρινο χρώμα, ενώ όταν πέφτει υπό γωνία στην περιφέρεια της κοιλότητας ανακλάται επιλεκτικά το μπλε χρώμα (Εικόνα 1.31). Από τον συνδυασμό τους προκύπτει μακροσκοπικά το πράσινο χρώμα που παρατηρείται. (Vukusik *et al.* 2000 όπως αναφέρεται από Vukusic and Sambles 2003 και από Kinoshita and Yoshioka 2005). Άλλο εντυπωσιακό παράδειγμα από τον χώρο των σπονδυλόζων είναι το ιριδίζον χρώμα σε κάποια τροπικά ψάρια.

Τα ψάρια αυτά φέρουν ιριδίζοντα κύτταρα με σειρές από αλληλοεπικαλυπτόμενα πλακίδια κρυστάλλων γουανίνης (Εικόνα 1.32). Τα πλακίδια αυτά βρίσκονται υπό νευρικό έλεγχο και δύνανται να μεταβάλλουν την κλίση τους. Εξωτερικός φωτισμός μειώνει τη μεταξύ τους απόσταση προκαλώντας ιριδισμό λόγω της πολύστρωμης δομής από κρυστάλλους γουανίνης και κυτταροπλάσματος που δημιουργείται. Ωστόσο το θέμα χρήζει περαιτέρω μελέτης (Nagaishi and Oshima 1992 όπως αναφέρεται από Kinoshita and Yoshioka 2005). Ιδιαίτερη περίπτωση αποτελούν γυαλιστερά ιριδίζοντα

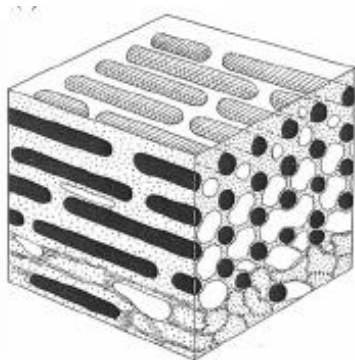


**Εικόνα 1.32: Διάταξη των πλακιδίων γουανίνης στα κύτταρα ψαριού.** Σχήμα που δείχνει τη δυναμικά αλληλοεπικαλυπτόμενη διάταξη των πλακιδίων κρυστάλλων γουανίνης. Η ράχη του ψαριού (κατεύθυνση προέλευσης φωτός) βρίσκεται κάτω αριστερά σύμφωνα με τον προσανατολισμό του σχήματος. Τα συγκεκριμένα κύτταρα περιβάλλουν την περιοχή της νωτιαίας χορδής (εικόνα από Kinoshita and Yoshioka 2005).

σκαθάρια της οικογένειας Scarabaeidae που φέρουν οπτικά ενεργές ελικοειδείς δομές στον εξωσκελετό των ελύτρων τους. Φέρουν πολύστρωμες δομές, στις οποίες κάθε στρώμα

αποτελείται από νανοϊνίδια χιτίνης τα οποία έχουν ελαφρώς περιστρεμμένη διεύθυνση σε σχέση με το προηγούμενο στρώμα. Εκτός από ιριδισμό, αυτή η δομή οδηγεί σε κυκλικά πολωμένο ανακλώμενο φως, και σε οπτικό μικροσκόπιο δίνει όψη μωσαϊκού (Wilts *et al.* 2014).

Φωτονικοί κρύσταλλοι δύο και τριών διαστάσεων έχουν βρεθεί σε αρκετές ομάδες ζωικών οργανισμών, όπως πουλιά, αρθρόποδα αλλά και μέδουσες και πολύχαιτους. Τυπικά παραδείγματα αποτελούν ο φωτονικοί κρύσταλλοι στα φτερά των πεταλούδων *Parides seostris*, *Thecla* sp. και *Vaga* sp. Σε αυτές τις περιπτώσεις ο κρύσταλλος έχει πολύπλοκη



**Εικόνα 1.33: Διάταξη φωτονικού κρυστάλλου στα μυστακίδια φτερού παγωνιού.** Στο σχήμα φαίνεται η διάταξη των ραβδίων μελανίνης κατά μήκος των μυστακιδίων του φτερού. Στην εγκάρσια τομή φαίνεται ο δισδιάστατος χαρακτήρας του κρυστάλλου (εικόνα του Durrer 1962 από Kinoshita *et al.* 2008).

τριδιάστατη περιοδική δομή και αποτελείται από χώρους αέρα μέσα σε μια μήτρα χιτίνης (Welch and Vigneron 2007). Άλλη περίπτωση φωτονικού κρυστάλλου -αυτή τη φορά δισδιάστατη- αποτελεί το φτερό του παγωνιού (Εικόνα 1.33). Οι μύστακες περιέχουν ραβδία μελανίνης, σε σχεδόν τετραγωνική διάταξη, τα οποία συνδέονται με γέφυρες κερατίνης (Εικόνα 1.33). Μεταξύ τους παρεμβάλλονται και χώροι αέρα. Και σε άλλες περιπτώσεις πουλιών τα κανονικά διατεταγμένα κοκκία μελανίνης συμβάλλουν με έναν ακόμα τρόπο στο χρώμα γιατί απορροφούν το φως που δεν ανακλάται ενισχύοντας ακόμα περισσότερο το δομικό χρώμα λόγω της αντίθεσης που προκύπτει (Kinoshita and Yoshioka 2005, Kinoshita *et al.* 2008). Εν γένει οι φυσικοί φωτονικοί κρύσταλλοι έχουν πολύ μικρότερους δείκτες διάθλασης σε σχέση με τους τεχνητούς (Welch and Vigneron 2007).

Το δομικό χρώμα λόγω φράγματος περίθλασης δεν θεωρείται ιδιαίτερα συνηθισμένο στα ζώα. Ωστόσο, έχει προταθεί για κάποια σκαθάρια, αράχνες, σφήκες και καρκινοειδή (Parker 1998, Glover and Whitney 2010).

Χαρακτηριστική διαφοροποίηση του χρωματισμού λόγω σκέδασης είναι ότι βασίζεται στην ανομοιογένεια και την ανομοιομορφία αντί στην κανονικότητα στη δομή (Kinoshita and Yoshioka 2005, Kinoshita *et al.* 2008). Η περίπτωση του χρώματος λόγω σκέδασης είναι τυπική περίπτωση δομικού χρώματος που δεν παρουσιάζει ιριδισμό. Στα βιολογικά υλικά προκαλείται από την αλληλεπίδραση του φωτός με κυστίδια αέρα μέσα στον ιστό ή σωματίδια όπως λίπους, πρωτεΐνης, κερατίνης ή κρυστάλλους γουανίνης, συνήθως πάνω από κάποια σκούρα ουσία, π.χ. μελανίνη. Κατά αυτόν τον τρόπο το φως που δεν σκεδάζεται από τα σωματίδια απορροφάται από το σκούρο υπόβαθρο και ο δομικός χρωματισμός γίνεται εμφανής. Αρκετές φορές ζωικοί μπλε χρωματισμοί έχουν αποδοθεί σε μπλε Tyndal. Έχει αποδοθεί σε ορισμένες μέδουσες, χταπόδια, έντομα, ερπετά, ψάρια πουλιά και θηλαστικά. Ο χρωματισμός στα φτερά των πουλιών οφείλεται συνήθως στην επιφάνεια των μυστακιδίων. Τα μυστακίδια από έξω προς τα μέσα αποτελούνται από έναν διαφανή φλοιό, μια στρώση από κυψελιδωτά κύτταρα (alveolar cells) και ένα σκούρο στρώμα από κύτταρα με μελανίνη. Τα κυψελιδωτά κύτταρα φέρουν κυστίδια με αέρα που σκεδάζουν το φως. Αν

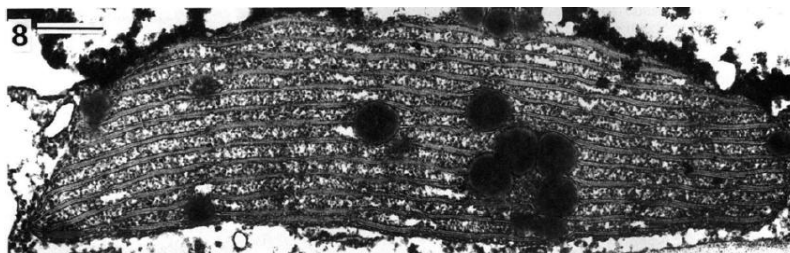
τα κυστίδια των κυττάρων γεμίζουν με αλκοόλη ή αν καταστραφούν μηχανικά το εμφανιζόμενο χρώμα φαίνεται μαύρο (αλλά όταν εξατμιστεί η αλκοόλη επανέρχεται το μπλε χρώμα). Επίσης αν απομακρυνθεί η μελανίνη το μπλε χρώμα εξαφανίζεται. Αυτή η περίπτωση αποτελεί παράδειγμα συνεργίας χρωστικών και δομής στο τελικό χρωματικό αποτέλεσμα (Nassau 1983). Ωστόσο έχουν διατυπωθεί αμφιβολίες για το κατά πόσο βιολογικά χρώματα τύπου Tyndal μπλε που αποδίδονται σε σκέδαση, οφείλονται όντως σε αυτήν, καθώς παρατηρούνται θεωρητικές και πειραματικές αναντιστοιχίες (Kinoshita and Yoshioka 2005, Kinoshita *et al.* 2008).

Βιβλιογραφικά αυτού του τύπου η σκέδαση μπορεί να αναφέρεται και ως μη συμπαγής σκέδαση (incoherent scattering) επειδή οι δομές που προκαλούν σκέδαση έχουν τυχαία κατανομή και η σχέση του μήκους κύματος των σκεδαζόμενων κυμάτων με τη φάση τους είναι τυχαία. Αντίθετα στη συμπαγή σκέδαση (coherent scattering) τα σωματίδια είναι κανονικά κατανεμημένα και υπάρχει συσχέτιση μεταξύ φάσης και μήκους κύματος στο σκεδαζόμενο φως. Με αυτήν την ορολογία, ως περιπτώσεις συμπαγούς σκέδασης θεωρούνται οι υπόλοιπες περιπτώσεις δομικού χρώματος, π.χ. συμβολή σε λεπτά υμένα (Glover and Whitney 2010).

#### 1.6.4 Δομικό χρώμα σε φυτά

Στο παρελθόν θεωρούσαν ότι η παρουσία δομικού χρώματος στα φυτά είναι αρκετά περιορισμένη (Vignolini *et al.* 2013a). Σήμερα δομικό χρώμα έχει παρατηρηθεί εκτός από ζώα, και σε πολλές άλλες ομάδες οργανισμών συμπεριλαμβανομένων (χερσαίων) φυτών, μακροφυκών, διατόμων, μυκητών, μυξομυκήτων, βακτηρίων και ιών (Chandler *et al.* 2017). Πριν γίνει μία επισκόπηση των δομικών χρωμάτων στα (ανώτερα) φυτά, θα γίνει μια αναφορά στα δομικά χρώματα των μακροφυκών, επειδή παρουσιάζουν ως έναν βαθμό κάποιες – μικρές – μορφολογικές - ανατομικές ομοιότητες με τα ανώτερα φυτά καθώς και φυλογενετική συγγένεια, σε ό,τι αφορά τα χλωροφύκη. Δομικά χρώματα και ιριδισμός έχει παρατηρηθεί σε εκπροσώπους και από τις τρεις κατηγορίες μακροφυκών, δηλαδή τα φαιοφύκη (Σταχυομαστιγωτά ή Αχυρότριχα-Stamenoriles), τα ροδοφύκη και τα χλωροφύκη (Φυτά-Plantae) (Ταξινόμηση σύμφωνα με Cock *et al.* 2010 όπως παρατίθεται από Chandler *et al.* 2017). Οι μηχανισμοί που ευθύνονται για τον χρωματισμό μπορεί να έχουν ενδοκυττάρια ή εξωκυττάρια προέλευση. Η εξωκυττάρια προέλευση του δομικού χρώματος έχει βρεθεί σε ροδοφύκη και περιλαμβάνει πολύστρωμες δομές παρόμοιες με τις αντίστοιχες των ανώτερων φυτών. Τέτοιες δομές είναι πλούσιες σε πρωτεΐνες και υδατάνθρακες, ενώ πιθανώς συμβάλλει συμπαγής καλυπτήρια εξωκυττάρια δομή από καραγενάνη. Ο ενδοκυττάριος μηχανισμός αντιθέτως έχει βρεθεί σε ροδοφύκη και φαιοφύκη. Κατά τον ενδοκυττάριο μηχανισμό παραγωγής του χρώματος συμμετέχουν τρισδιάστατα σφαιρικά μη περιοδικά σωματίδια. Πρόκειται για ιριδίζοντα σφαιρίδια πυκνής πρωτεϊνικής φύσης διασκορπισμένα στα κύτταρα της επιδερμίδας. Οι διαστάσεις της δομής με τα ιριδίζοντα σωματίδια είναι συγκρίσιμες με το μήκος κύματος του φωτός. Πιθανώς τα σωματίδια αυτά να σκεδάζουν επιλεκτικά το μπλε φως, αν και η συσχέτιση των σωματιδίων με το χρωματικό αποτέλεσμα δεν είναι απόλυτα επιβεβαιωμένη. Γενικά στα μακροφύκη το δομικό χρώμα συχνά αλληλεπιδρά με το χημικό χρώμα. Για παράδειγμα, σε ροδοφύκη χημικό κοκκινωπό χρώμα, συνδυαστικά με δομικό μπλε-πράσινο χρώμα μπορεί να οδηγεί σε ολικό μωβ χρωματισμό (ανασκόπηση από Chandler *et al.* 2017).

Οι πρώτες μελέτες δομικού χρώματος σε φύλλα έγιναν σε τροπικά μπλε πτεριδόφυτα του γένους *Selaginella*. Παρατηρήθηκε ότι ο μπλε χρωματισμός αυτών των φύλλων εξαφανιζόταν κατά τη βύθιση του φύλλου σε νερό και επανεμφανιζόταν μετά την εξάτμιση

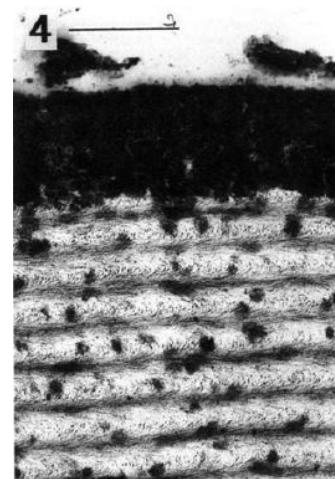


**Εικόνα 1.34:** Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης ιριδοπλάστη του φυτού *Phyllaganthis rotundifolia*. Διακρίνεται η σαφώς διαφοροποιημένη λεπτή δομή του ιριδοπλάστη σε σχέση με έναν τυπικό χλωροπλάστη. Είναι πιο επιμήκης και διακρίνεται η πολύ πυκνή διευθέτηση των, λεπτών σε πάχος, θυλακοειδών grana. Διακρίνονται οι διαδοχικές ηλεκτρονιόπυκνες και ηλεκτρονικά αραιότερες ζώνες που σχηματίζονται. Κλίμακα 0,5  $\mu\text{m}$  (εικόνα από Gould and Lee 1996).

αυξανόμενη ανάκλαση με μείωση του μήκους κύματος, καθώς και ανάλυση από φράγμα περιθλασης, το οποίο θα έδινε όλο το εύρος του ορατού φωτός. Με παρατήρηση των *Sellaginella willdenowii* και *Selaginella uncinata* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο βρέθηκαν δύο στρώσεις στο κυτταρικό τοίχωμα των επιδερμικών κυττάρων. Οι εν λόγω στρώσεις βρίσκονται μόνο στα μπλε και όχι στα πράσινα φύλλα των ειδών αυτών και έχουν το κατάλληλο πάχος ώστε να δίνουν με συμβολή το παρατηρηθέν μπλε χρώμα (Lee 2007).

Μελέτη δομικού χρώματος στα φυτά έχει πραγματοποιηθεί επιπλέον σε περιπτώσεις φύλλων, καρπών και ανθέων. Συγκεκριμένα μεταξύ των άλλων έχουν μελετηθεί περιπτώσεις μπλε ιριδισμού σε φύλλα φυτών. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν τα φύλλα του φυτού *Begonia ravanina* τα οποία φέρουν τροποποιημένα πλαστίδια, τους ιριδοπλάστες (iridoplasts). Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης σε εγκάρσια τομή οι ιριδοπλάστες φαίνεται να περιλαμβάνουν αλληπάλληλες στρώσεις ηλεκτρονικά ημιδιαφανών ζωνών (πλαστιδιακό στρώμα) και ηλεκτρονιόπυκνων ζωνών (θυλακοειδή) (Εικόνα 1.34). Υπολογίστηκε με μαθηματικά μοντέλα το θεωρητικό μήκος κύματος που ανακλάται σε ενισχυτική συμβολή από πολύστρωμη συμβολή μεταξύ των ζωνών. Το θεωρητικό αποτέλεσμα συμπίπτει με το πραγματικό χρώμα και επομένως στην συγκεκριμένη περίπτωση υπεύθυνοι είναι οι ιριδοπλάστες μέσω συμβολής από

του νερού. Το στοιχείο αυτό αποτέλεσε ισχυρή ένδειξη για την παρουσία δομικού χρώματος. Οπτικές μετρήσεις έδειξαν μία κορυφή στο φάσμα ανάκλασης γεγονός που απέκλεισε σκέδαση τύπου Tyndall, η οποία θα έδινε διαρκώς

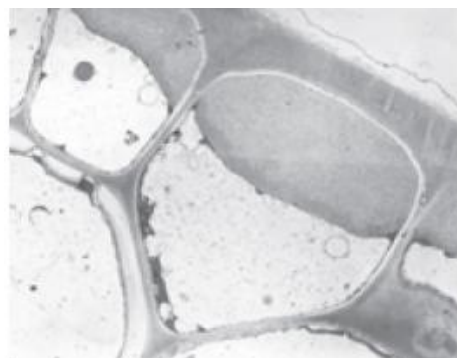


**Εικόνα 1.35:** Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης κυτταρικού τοιχώματος του φυτού *Diplazium tomentosum*. Εξωτερικό κυτταρικό τοίχωμα της άνω επιδερμίδας των φύλλων. Διακρίνεται η διαδοχική στρέψη των μικροϊνιδίων κυτταρίνης. Μεταξύ δύο ηλεκτρονιόπυκνων ζωνών μεσολαβεί στρέψει των μικροϊνιδίων κατά  $180^\circ$ . Κλίμακα 0,5  $\mu\text{m}$  (εικόνα από Gould and Lee 1996).

την πολύστρωμη δομή τους (Gould and Lee 1996). Υπάρχουν πειραματικές ενδείξεις ότι οι ιριδοπλάστες προσφέρουν στο φυτό φωτοπροστασία λόγω της αυξημένης ανάκλασης της υπεριώδους ακτινοβολίας (Lee 2007). Ιριδοπλάστες ευθύνονται για το ιριδίζον μπλε χρώμα και σε άλλα φυτά όπως η φτέρη *Trichomanes elegans* και το αγγειόσπερμο *Phyllaganthis rotundifolia* (Εικόνα 1.34) (Gould and Lee 1996, Glover and Whitney 2010). Επιπλέον υπάρχουν περιπτώσεις κατά τις οποίες εξειδικευμένες περιοχές του χλωροπλάστη συμβάλλουν στον ιριδισμό (Sheue *et al.* 2007 όπως αναφέρεται από Lee 2009).

Ο ιριδίζον μπλε χρωματισμός στα φύλλα άλλων φυτών όπως το *Diplazium tomentosum* φαίνεται να έχει άλλη προέλευση (Εικόνα 1.35). Τα εξωτερικά κυτταρικά τοιχώματα της προσαξονικής (επάνω) επιδερμίδας είναι ελικοειδή, δημιουργημένα από διαδοχικά στρώματα ινιδίων κυτταρίνης με διαφορετική γωνία σε σχέση με τις προηγούμενες στρώσεις (Εικόνα 1.35). Το μήκος κύματος με τη μέγιστη ανάκλαση όπως προκύπτει από την θεωρητική σχέση  $\lambda=2nt$  (όπου  $n$  ο δείκτης διάθλασης της ενυδατωμένης κυτταρίνης και  $t$  η κάθετη απόσταση για περιστροφή κατά  $180^\circ$  των ινιδίων) εμφανίζει μικρή απόκλιση από τις πραγματικές μετρήσεις των φύλλων (Gould and Lee 1996). Αυτός ο μηχανισμός οφείλεται και για τον ιριδισμό στα φύλλα άλλων φυτών όπως τα *Danae nodosa* και *Lindsaea lucida* (Glover and Whitney 2010).

Δομικός χρωματισμός σε φυτά προκύπτει και από σκέδαση. Σε σκέδαση τύπου Rayleigh πάνω σε εναποθέσεις κηρών, με διαστάσεις μικρότερες του μήκους κύματος, οφείλεται ο μπλε χρωματισμός των φύλλων στα φυτά *Picea pungens* και *Dudleya brittonii*. Οι δομές αυτές προσφέρουν πιθανώς φωτοπροστασία στο φυτό λόγω αυξημένης ανάκλασης της υπεριώδους ακτινοβολίας (Vogelmann 1993, Glover and Whitney 2010). Σωματίδια επιφανειακών κηρών σκεδάζουν κατά Tyndall το φως δίνοντας μπλε χρωματισμό στα φύλλα των *Picea ebgelmannii* και *Picea glauca* (Lee 2007, 2009).



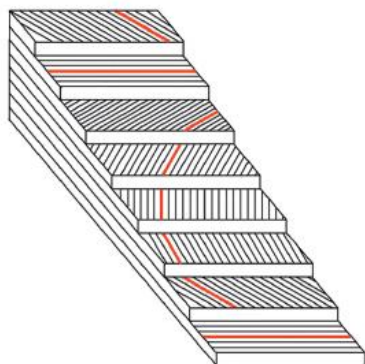
**Εικόνα 1.36:** Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης σε ιριδοσώμα επιδερμικού κυττάρου καρπού *Eleocharis angustifolius*. Φαίνεται η πολυσακχαρική πολύστρωμη δομή, υπεύθυνη για το μπλε χρώμα του καρπού. Τοποθετείται ανάμεσα στην πλασματική μεμβράνη και το εξωτερικό κυτταρικό τοίχωμα της επιδερμίδας (εικόνα από Lee 2007).

Ο δομικός χρωματισμός έχει παρατηρηθεί και μελετηθεί σε καρπούς των φυτών. Μεταξύ των καρπών που έχουν μελετηθεί είναι οι καρποί του *Pollia condensata*, *Margaritaria nobilis*, *Eleocharis angustifolius* (Εικόνα 1.36), *Delabrea michiana* (Vignolini *et al.* 2013b). Στο *Eleocharis* ο μπλε δομικός χρωματισμός προκύπτει από πολύστρωμη συμβολή σε ιριδοσώματα (iridosomes). Τα ιριδοσώματα αποτελούνται από αλληπάλληλες πολυσακχαρικές – εν μέρει κυτταρινικές – στρώσεις, οι οποίες σχηματίζουν ένα πλέγμα (lattice) μεταξύ της πλασματικής μεμβράνης και του κυτταρικού τοιχώματος των επιδερμικών κυττάρων (Εικόνα 1.36) (Lee 2007, Lee 1991 όπως αναφέρεται από Lee 2009, Glover and Whitney 2010 και Vignolini *et al.* 2013b). Παρόμοια ιριδοσώματα φαίνεται να ευθύνονται για τον μηχανισμό παραγωγής μπλε χρώματος στους καρπούς του *Delabrea*



*michieana* (Lee 2007, Lee *et al.* 2000 όπως αναφέρεται από Lee 2009, Glover and Whitney 2010 και Vignolini *et al.* 2013b).

Στις περιπτώσεις των *Pollia condensate* και *Margaritaria nobilis* ο μεταλλικός ιριδίζων μπλε



**Εικόνα 1.37: Μηχανισμός στρέψης των μικροϊνιδίων κυτταρίνης.** Έχει βρεθεί σε κυτταρικά τοιχώματα επιδερμίδας κυττάρων φύλλων και καρπών. Συνδέεται με δομικό ιριδίζον χρώμα και κυκλικά πολωμένο φως (εικόνα από Wilts *et al.* 2014).

χρωματισμός των καρπών προκύπτει από πολύστρωμες ελικοειδείς διατάξεις μικροϊνιδίων κυτταρίνης του κυτταρικού τοιχώματος. Θεωρείται ότι ο έντονος χρωματισμός των καρπών συμβάλλει στην αποτελεσματικότερη διασπορά τους, χωρίς να είναι απαραίτητη η έντονη γεύση ή αυξημένη διατροφική αξία (Vignolini *et al.* 2012c, Vignolini *et al.* 2016). Σε τέτοιου τύπου ελικοειδείς διατάξεις –ζωικής ή φυτικής προέλευσης από μικροϊνίδια κυτταρίνης, χιτίνης ή κερατίνης– προκύπτει δομικός χρωματισμός και ανακλάται κυκλικά πολωμένο φως (Εικόνα 1.37). Σε απλοποιημένη μορφή το μήκος κύματος του βέλτιστα ανακλώμενου φωτός  $\lambda=2\rho n$ , όπου  $n$  ο δείκτης διάθλασης του υλικού και  $\rho$  η περιοδικότητα της ημιπεριστροφής των μικροϊνιδίων. Απαραίτητη προϋπόθεση για εφαρμογή της εξίσωσης είναι να παραμένει μικρή η διαφορά ανάμεσα στους δείκτες διάθλασης των μικροϊνιδίων και του περιβάλλοντος

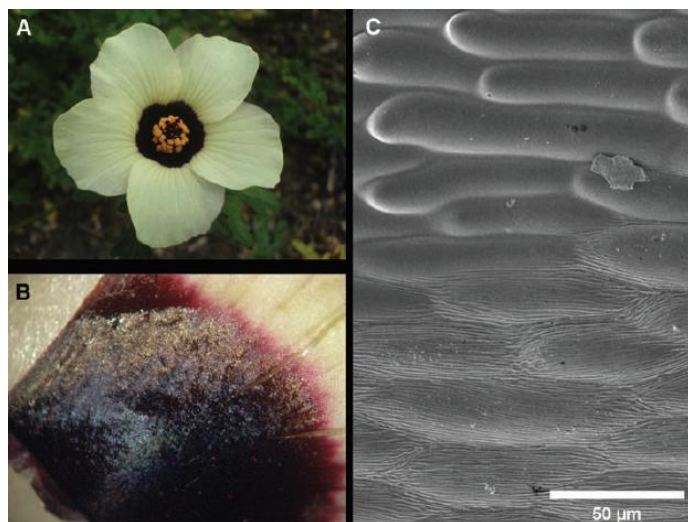
«στρώματος» (de Vries 1951 όπως αναφέρεται από Vignolini *et al.* 2012c, Wilts *et al.* 2014). Πιθανότατα το δομικό χρώμα δεν ευθύνεται μόνο για μπλε χρώματα καρπών, αλλά και για κόκκινα και άλλα, αλλά χρήζει περισσότερης μελέτης (Lee 2009).

### 1.6.5 Δομικό χρώμα σε άνθη

Μέσα στην τελευταία δεκαετία έχουν γίνει κάποιες μελέτες και έντονος διάλογος γύρω από τον δομικό χρωματισμό σε άνθη, και συγκεκριμένα στον δομικό χρωματισμό που προκύπτει από φράγμα περίθλασης ανάκλασης σε επιφανειακές ποικίσεις (γραμμώσεις) των πετάλων. Σε κάθε περίπτωση ο αναπτυξιακός έλεγχος των εφυμενδιακών αυτών ποικίσεων δεν είναι γνωστός (Glover 2014), αν και έχουν προταθεί σχετικά μοντέλα (Αντωνίου Kourouniotti *et al.* 2013). Για να παραχθεί ιριδισμός από φράγμα περίθλασης σε εφυμενδιακές νανοποικίσεις θα πρέπει τα κύτταρα να έχουν επίπεδη επιφάνεια (Glover *et al.* 2012, Αντωνίου Kourouniotti *et al.* 2013). Πολλές από τις μελέτες – και κριτικές και σχετικές επί αυτών – αφορούν στο άνθος του φυτού *Hibiscus trionum*, ή αναφέρονται σε αυτό (Whitney *et al.* 2009a, 2009b, Morehouse and Rutowski 2009, Lee 2009, Glover and Whitney 2010, Kolle 2011, Αντωνίου Kourouniotti *et al.* 2013, Vignolini *et al.* 2013a, van der Kooi *et al.* 2014, 2015, Glover 2014, Vignolini *et al.* 2015a, 2015b, Wenzel and Vignolini 2018).

Το άνθος του *Hibiscus trionum* φέρει πέντε πέταλα τα οποία στο μεγαλύτερο μέρος τους είναι λευκά αλλά στη βάση τους φέρουν μία σκούρα μωβ-μαύρη περιοχή (Εικόνα 1.38) (Whitney *et al.* 2009b, van der Kooi *et al.* 2014, 2015, Vignolini *et al.* 2015b). Αυτό το χρωματικό μοτίβο (pattern) υπόκειται σε ένα ευρύτερο πρότυπο μοτίβου των ανθέων, το

«bull's eye», κατά το οποίο το κέντρο του άνθους διαφοροποιείται σε χρωματισμό από την περιφέρεια. Με αυτόν τον τρόπο οι επικονιαστές διευκολύνονται στον εντοπισμό του άνθους από απόσταση και στον γενικότερο προσανατολισμό τους (Whitney *et al.* 2009a). Το ναοανάλυφο της επιφάνειας της επιδερμίδας διαφέρει δραματικά ανάμεσα στις δύο περιοχές καθώς τα κύτταρα της λευκής περιοχής φέρουν λεία επιφάνεια, ενώ τα κύτταρα



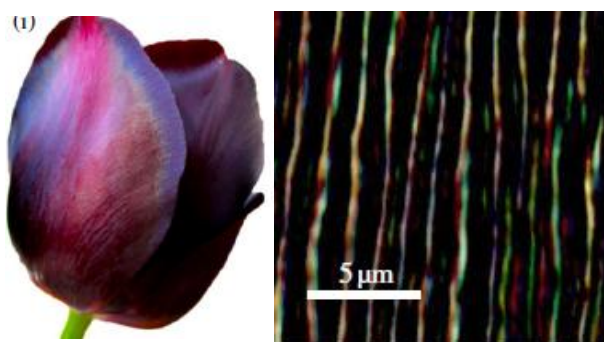
**Εικόνα 1.38: Μακροσκοπική και μικροσκοπική όψη της επιφάνειας του άνθους *Hibiscus trionum*.** Αριστερά: Μακροσκοπικές εικόνες των δίχρωμων πετάλων του άνθους. Δεξιά: Ηλεκτρονιογραφία σάρωσης της μεταβατικής ζώνης επιφάνειας του πετάλου. Πάνω δεξιά η λεία επιφάνεια αντιστοιχεί στη λευκή μη ιριδίζουσα περιοχή και κάτω δεξιά η αδρή επιφάνεια αντιστοιχεί στην σκούρα ιριδίζουσα (εικόνα από Whitney *et al.* 2009b).

της σκούρας περιοχής φέρουν έντονες παράλληλες επιφανειακές ποικίσεις (Εικόνα 1.38) (Whitney *et al.* 2009b, van der Kooi *et al.* 2014, 2015, Vignolini *et al.* 2015b). Στη σκούρα περιοχή παρατηρείται ιριδισμός, ορατός από το ανθρώπινο μάτι (Εικόνα 1.38). Ο ιριδισμός αυτός προκαλείται από φαινόμενο φράγματος περίθλασης κατά την ανάκλαση του φωτός στις ποικίσεις και διατηρείται και σε αντίγραφα των πετάλων χωρίς χρωστική. (Whitney *et al.* 2009b). Ωστόσο υπάρχουν αμφιβολίες ως προς τη δυνατότητα του ιριδισμού να γίνεται αντιληπτός σε

συνθήκες φυσικού φωτισμού (van der Kooi *et al.* 2014). Επιπλέον ο ιριδισμός, σε συνθήκες φυσικού ή τεχνητού φωτισμού, δεν παρατηρείται σε όλους τους αντιπροσώπους του *Hibiscus trionum*, στοιχείο που μαρτυρά πιθανώς διακριτά υποείδη (van der Kooi *et al.* 2015). Από την άλλη πλευρά υπάρχουν στοιχεία που μαρτυρούν ότι ο ιριδισμός είναι εμφανώς αισθητός και σε συνθήκες φυσικού φωτισμού (Vignolini *et al.* 2015b) και ότι αντικρουόμενες παρατηρήσεις οφείλονται πιθανώς σε ιδιαιτερότητα ή κακή μεταχείριση του φυτικού υλικού (Vignolini *et al.* 2015a). Λόγω της παρέκκλισης από την απόλυτη κανονικότητα στις γραμμώσεις για μεγάλες περιοχές, έχει υποστηριχθεί πειραματικά ότι το οπτικό αποτέλεσμα που προκύπτει δεν είναι ιριδισμός αλλά ένας λευκωπός χρωματισμός που προκύπτει από την ανάμιξη των ανακλώμενων χρωμάτων (van der Kooi *et al.* 2014), αν και τα εν λόγω πειράματα έχουν αμφισβητηθεί ως προς την ποιότητα του φυτικού υλικού (Vignolini *et al.* 2015a). Ωστόσο άλλα πειράματα δείχνουν εμφανώς διακριτά χρώματα κατά τον ιριδισμό (Vignolini *et al.* 2015b). Πειράματα με υμενόπτερα *Bombus terrestris* δείχνουν πιθανώς ότι το δομικό χρώμα συμβάλλει στην αποτελεσματικότερη επικονίαση (Whitney *et al.* 2009b), αν και η συγκεκριμένη υπόθεση έχει δεχθεί έντονη κριτική για διάφορους λόγους και η ορθότητά της παραμένει αμφίβολη (Morehouse and Rutowski 2009, van der Kooi *et al.* 2014, 2015, 2018). Υπάρχει η άποψη ότι η διαφοροποίηση στο δομικό χρώμα (ιριδισμός λόγω φράγματος περίθλασης) που υπάρχει ακριβώς πάνω από τη

διαφοροποίηση στο χημικό χρώμα ενισχύει και μέσα από την παράμετρο του δομικού χρώματος το μοτίβο του bull's eye (Whitney *et al.* 2009a). Παρόμοιες ταυτόχρονες διαφοροποιήσεις σε χημικό χρώμα και μικρομορφολογία, σε μερικές περιπτώσεις αποδεδειγμένα και δομικό χρώμα, προς το κέντρο του άνθους, έχουν παρατηρηθεί σε άνθη των *Nolana paradoxa* και *Tulipa humilis*. Αυτά τα δεδομένα ενισχύουν την υπόθεση συνεργείας χημικού και δομικού χρώματος για τον σχηματισμό μοτίβου bull's eye. Η υπόθεση αυτή μπορεί να επεκταθεί και στην περιοχή του υπεριώδους φάσματος (Whitney *et al.* 2009a).

Παρόμοιου τύπου ποικίλλει είναι αρκετά συνηθισμένες και απαντώνται στο περιάνθιο σε αρκετές οικογένειες αγγειόσπερμων (Kolle 2011, Vignolini *et al.* 2013a). Μπορεί να



**Εικόνα 1.39: Μακροσκοπική και μικροσκοπική όψη της επιφάνειας του άνθους της τουλίπας *Queen of the Night*.** Αριστερά: Μακροσκοπική εικόνα του άνθους στην οποία ο ιριδισμός της εξωτερικής επιφάνειας των τεπέλων είναι εμφανής. Δεξιά: Εικόνα της επιδερμίδας σε οπτικό μικροσκόπιο. Ο ιριδισμός (σε όλο το εύρος του ορατού φάσματος) πάνω στις ποικίλλει είναι εμφανής και μαρτυρά τη δομική προέλευσή του (εικόνα από Vignolini *et al.* 2013b).

συναντώνται σε κανονική, ημικανονική ή ακανόνιστη διάταξη. Επίσης μπορεί να έχουν διεύθυνση παράλληλη ή σπανιότερα κάθετη προς τον επιμήκη άξονα του κυττάρου, ή να απαντώνται πάνω σε θηλοειδή κύτταρα. Σε αρκετές περιπτώσεις έχουν συνδεθεί με ιριδισμό, αλλά η σύνδεση σε καμία περίπτωση δεν είναι απόλυτη (Kolle 2011, van der Kooi *et al.* 2014). Εν γένει η περιοδικότητα των ποικίλλει δεν είναι σταθερή πάνω στο πέταλο (van der Kooi *et al.* 2014). Ιριδισμός λόγω ποικίλλει παρατηρείται σε αρκετούς αντιπροσώπους του γένους *Tulipa*, όπως η *Tulipa kolpakowskiana*, αν

και ο ιριδισμός φαίνεται στον άνθρωπο μόνο όταν απομακρυνθεί η χρωστική, όπως γίνεται κατά την κατασκευή άχρωμων αντιγράφων (Whitney *et al.* 2009b). Συχνά έντονος ιριδισμός παρατηρείται στην άπω ιώδη – εγγύς υπεριώδη περιοχή του φάσματος. Αυτή η περιοχή του φάσματος είναι ορατή από τα έντομα επικονιαστές και μάλιστα συχνά υπάρχουν στα άνθη υπεριώδη σήματα για τους επικονιαστές προερχόμενα από αντίστοιχες χρωστικές. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι μπορεί να υπάρχουν στο άνθος μοτίβα δομικού αντί χημικού χρώματος που να κατευθύνουν υπεριώδη σήματα τους επικονιαστές. Αυτή η υπόθεση έχει ενισχυθεί από τη μελέτη του άνθους *Menntzelia lindleyi*, στο οποίο χημικό και δομικό χρώμα (γραμμώσεις) αλληλεπιδρούν με σύνθετο τρόπο δημιουργώντας χρωματικά μοτίβα, πιθανώς κατευθυντήρια (Kolle 2011).

Εμφανής είναι ο ιριδισμός στην εξωτερική (κάτω) επιφάνεια των τεπέλων, της καλλιεργητικής ποικιλίας μαύρης τουλίπας «Queen of the Night» (Εικόνα 1.39). Το σκουρόχρωμο μαύρο χρώμα υποβάθρου αποτελεί χημικό χρώμα και οφείλεται σε ανθοκυανίνες. Ωστόσο ο ιριδισμός αποτελεί δομικό χρώμα και οφείλεται στο νανοανάλυφο της επιφάνειας των τεπέλων και οφείλεται σε φράγμα περίθλασης κατά την ανάκλαση σε ποικίλλει της επιφάνειας. Ο ιριδισμός είναι εμφανής κατά την παρατήρηση



μεμονωμένης επιδερμίδας επάνω σε νερό (Εικόνα 1.39) (Vignolini *et al.* 2013a, 2013b). Ο ιριδισμός παρατηρείται μόνο στην έξω (κάτω) επιφάνεια των τεπέλων, τα οποία φέρουν και κανονικές νανοποικίλσεις επιδερμίδας. Η εσωτερική (άνω) επιδερμίδα φέρει διάχυτες ακανόνιστες ποικίλσεις και δεν παρουσιάζει ιριδισμό (Αντωνίου Κουρουνησιότι *et al.* 2013). Ιριδισμός έχει παρατηρηθεί και σε μέρη του άνθους σε πολλά είδη του γένους *Ophrys* (Whitney and Glover 2007 όπως αναφέρεται από Whitney *et al.* 2009a).

Όταν οι γραμμώσεις δρουν ως φράγματα περίθλασης ανακλούν εν γένει όλα τα χρώματα (δηλαδή τα μήκη κύματος) αλλά σε διαφορετική γωνία το καθένα, και με αυτόν τον τρόπο

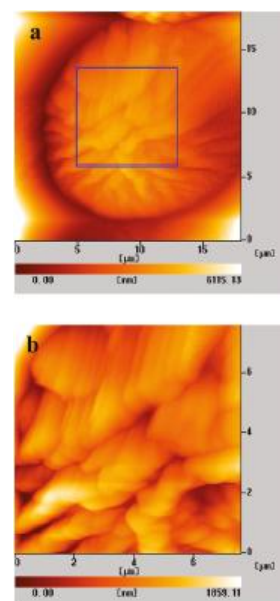


**Εικόνα 1.40: Μακροσκοπική άποψη του φαινομένου blue halo στο άνθος *Ursinia speciosa*.** Φαινόμενο blue halo στην εσωτερική σκουρόχρωμη περιοχή των περιφερικών πετάλων της ταξιανθίας. Η μπλε-μωβ χροιά του blue halo είναι εμφανής (εικόνα από Wenzel and Vignolini 2018).

προκύπτει ο ιριδισμός. Βρέθηκε, ωστόσο, ότι ημι-περιοδικές ποικίλσεις σε άνθη, όπως η *Ursinia speciosa*, ανακλούν με επιλεκτικό τρόπο την μπλε και υπεριώδη περιοχή του φάσματος, και μάλιστα σε μεγαλύτερο γωνιακό εύρος. Αυτό το φαινόμενο ονομάστηκε «blue halo» (Εικόνα 1.40). Βιομιμητικές επιφάνειες επιβεβαίωσαν τη σχέση δομής και οπτικού αποτελέσματος. Αυτό το φαινόμενο δείχνει ότι η μη-κανονικότητα, αυτή η «αστάθεια», στις ποικίλσεις των ανθέων μπορεί να έχει πράγματι λειτουργικό χαρακτήρα. Όταν κάτω από τις γραμμώσεις υπόκειται μαύρο χημικό χρώμα, τότε στο πλαίσιο του ορατού φωτός ανακλάται μόνο το μπλε χρώμα λόγω φαινομένου blue halo, αφού τα υπόλοιπα χρώματα απορροφώνται από τη χρωστική. Σε αυτή την περίπτωση, η αντίθεση καθιστά το φαινόμενο αυτό ευδιάκριτο στον άνθρωπο (Εικόνα 1.40). Πιθανώς το blue halo ενυπάρχει και σε διάφορα έντονα χρωματισμένα κίτρινα ή κόκκινα άνθη, αλλά δεν γίνεται εύκολα αναγνωρίσιμο. Η ανάκλαση στη υπεριώδη περιοχή πιθανώς καθιστά το άνθος πιο ευδιάκριτο στους επικονιαστές (Wenzel and Vignolini 2018).

Παράμετρος δομικού χρώματος έχει βρεθεί και σε πέταλα ανθέων κόκκινων τριαντάφυλλων του εμπορίου. Η μικρομορφολογία της επιφάνειας των πετάλων, όπως προέκυψε από μελέτη σε μικροσκόπιο ατομικής διακριτικότητας (AFM), περιλαμβάνει μικροθηλές (micropapillae) με νανοπτυχώσεις (nanofolders) στην κορυφή κάθε μικροθηλής και επιπλέον περιοδικά νανοραβδία (nanorods) πάνω σε κάθε νανοπτυχώση (Εικόνα 1.41). Ως αποτέλεσμα αυτών των μικρο- και νανοδομών η επιφάνεια

προκύπτει ο ιριδισμός. Βρέθηκε, ωστόσο, ότι ημι-περιοδικές ποικίλσεις σε άνθη, όπως η *Ursinia speciosa*, ανακλούν με επιλεκτικό τρόπο την μπλε και υπεριώδη περιοχή του φάσματος, και μάλιστα σε μεγαλύτερο γωνιακό εύρος. Αυτό το φαινόμενο ονομάστηκε «blue halo» (Εικόνα 1.40). Βιομιμητικές επιφάνειες επιβεβαίωσαν τη σχέση δομής και οπτικού αποτελέσματος. Αυτό το φαινόμενο δείχνει ότι η μη-κανονικότητα, αυτή η «αστάθεια», στις ποικίλσεις των ανθέων



**Εικόνα 1.41: Μικροδομή και νανοδομή των πετάλων σε τριαντάφυλλο.**

Διαδοχικές μεγεθύνσεις από AFM που φαίνονται μια μικροθηλή, νανοπτυχώσεις και νανοραβδία. Πιθανώς η δομή συμβάλλει στο τελικό χρώμα (εικόνα από Feng *et al.* 2010).

είναι υπερευαίσθητη (Feng *et al.* 2008 όπως αναφέρεται από Feng *et al.* 2010, Feng *et al.* 2010). Επιπλέον οι διαστάσεις και η περιοδικότητα των νανοραβδίων μαρτυρούν δομή φωτονικού κρυστάλλου. Συγκριτική μελέτη των οπτικών ιδιοτήτων από αποχρωματισμένα πέταλα εμποτισμένα με διαφορετικούς διαλύτες (διαφορετικοί δείκτες διάθλασης) σε συνδυασμό με μαθηματικά μοντέλα μαρτυρούν την ύπαρξη δομικού χρώματος. Επιπλέον βιομιμητικές αντιγραφές του μικρο- και νανοαναγλύφου σε μεμβράνες (films) πολυβινυλικής αλκοόλης (PVA) και πολυστυρενίου (PS) χωρίς τη χρήση χρωστικών, εμφάνιζαν ιδιότητες δομικού χρώματος και υδροφοβικότητας. Επομένως είναι πολύ πιθανό το ολικό οπτικό και χρωματικό αποτέλεσμα του άνθους να αποτελεί συνδυασμό χημικού και δομικού χρώματος (Feng *et al.* 2010).

Μια ενδιαφέρουσα περίπτωση δομικού «χρώματος» από περιανθικούς ιστούς είναι το τρίχωμα των βράκτειων του *Leontopodium nivale* subsp. *alpinum*. Μεγάλο μέρος του υπέργειου τμήματος του φυτού και ιδίως τα βράκτεια που περιβάλλουν την ταξιανθία περιβάλλονται από πυκνό άσπρο τρίχωμα. Λόγω της γενικότερα ακανόνιστης δομής του ανακλά διάχυτα όλο το ορατό τμήμα της ορατής ακτινοβολίας. Ωστόσο το τρίχωμα απορροφά πολύ αποτελεσματικά την περιοχή της UVA υπεριώδους ακτινοβολίας (περίπου 320-400 nm). Αυτό οφείλεται σε φαινόμενα περίθλασης του φωτός πάνω σε περιοδικές νανογραμμώσεις της επιφάνειας των τριχιδίων, απόστασης περίπου 180 nm. Μεταξύ των άλλων εικάζεται ότι η δομή αυτή προσφέρει και φωτοπροστατευτική λειτουργία για τα υποκείμενα κύτταρα. Επιπρόσθετα παρατηρείται και ελαφρός ιριδισμός των τριχιδίων όταν διέρχεται από αυτά πολωμένο φως (Vigneron *et al.* 2005).

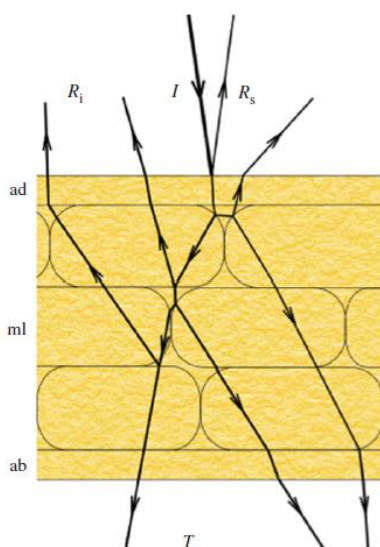
Ενδείξεις για δομικό χρώμα έχουν βρεθεί και σε άνθη της ελληνικής χλωρίδας. Μελέτη με μικροσκόπιο ατομικής διακριτικότητας (AFM) αποκάλυψε συγκεκριμένες περιοδικές δομές σε περιοχές των τεπάλων του *Asphodelus ramosus* και των πετάλων της *Capparis spinosa*. Η περιοδικότητα αυτή αντιστοιχεί σε ενισχυτική συμβολή σε μήκη κύματος που αντιστοιχούν σε κορυφές των φασμάτων ανάκλασης από άθικτα πέταλα, υπονοώντας συνιστώσα δομικού χρώματος (Χειμώνα 2015). Επιπλέον σύγκριση των φασμάτων απορρόφησης από άθικτα πέταλα *Lysimachia arvensis* και από εκχυλίσματα πετάλων καταδεικνύουν παρουσία πραγματικού δομικού χρώματος και όχι μόνο διαφορές λόγω εσωτερικής ανατομίας (Γκίκας 2016). Αυτό το συμπέρασμα για τη *Lysimachia arvensis* αντικατοπτρίζεται και στη νανοδομή των εφυμενιδιακών ποικίσεων της επιδερμίδας των πετάλων. Εμφανίζονται επιφανειακές δομές της τάξης των nm, πολύ μικρότερες από το μήκος κύματος του ορατού φωτός, οι οποίες μπορούν να ανακλούν επιλεκτικά τα μικρότερα μήκη κύματος και να παράγουν μπλε χρώματα (Rhizoroulou *et al.* 2015). Επιφανειακές ποικίσεις με περιοδικότητα συγκρίσιμη με αυτή του μήκους κύματος του ορατού φωτός έχουν παρατηρηθεί στα άνθη του *Oxalis pre-caprae* και είναι πιθανό ότι συμβάλλουν στις οπτικές ιδιότητες του πετάλου (Argiropoulos and Rhizoroulou 2012a). Κατά αντιστοιχία οι εφυμενιδιακές ποικίσεις του *Chaenomeles japonica*, που εμφανίζουν διαφορετικό πρότυπο διευθέτησης στην άνω και την κάτω πλευρά του άνθους, είναι πιθανό να συμβάλλουν στο οπτικό αποτέλεσμα του άνθους, ίσως προάγοντας την παγίδευση του φωτός (Argiropoulos *et al.* 2017).

## 1.7 Οπτικές ιδιότητες στα άνθη

### 1.7.1 Διέλευση, ανάκλαση, απορρόφηση, διάθλαση & σκέδαση

Κατά την πρόσπτωση μιας ακτίνας φωτός πάνω σε ένα ανθικό όργανο, αυτή μπορεί να έχει διάφορες πορείες. Κατά τη διάρκεια μιας τέτοιας πορείας η ακτίνα αλληλεπιδρά με το άνθος και μπορεί να διαπερνάει επιφάνειες ή/και να υποστεί ανάκλαση, απορρόφηση, διάθλαση ή/και σκέδαση σε διάφορα σημεία και επιφάνειες του οργάνου. Λόγω αυτών των ποικίλων αλληλεπιδράσεων του φωτός με τους φυτικούς ιστούς τα φύλλα και τα άνθη μπορούν να θεωρηθούν ως «οπτικά όργανα» (optical organs) (Lee 2007). Έχουν γίνει αρκετές μελέτες υπό αυτό το πρίσμα οι οποίες αφορούν, κυρίως, τις οπτικές ιδιότητες των φύλλων, και ως έναν βαθμό των ανθών. Ωστόσο οι βασικές (φυσικές) οπτικές αρχές της αλληλεπίδρασης που διέπουν τα φύλλα και τα άνθη είναι ίδιες, ανεξαρτήτως του φυτικού ιστού.

Για τη σωστή μελέτη της ανάκλασης, της διέλευσης και της απορρόφησης ενός σχετικά μεγάλου τεμαχίου φυτικού ιστού, είναι απαραίτητη η χρησιμοποίηση σφαίρας ολοκλήρωσης, γιατί με αυτόν τον τρόπο συμπεριλαμβάνονται στις μετρήσεις όλες οι αποκλίνουσες ακτίνες (Vogelmann 1993, Lee 2007). Με δεδομένα διέλευσης (transmittance - T), ανάκλασης (reflectance - R) και απορρόφησης (absorbance - A), η σχέση που ισχύει είναι  $T+A+R = 1 = 100\%$  (Εικόνα 1.42). Δηλαδή το σύνολο της φωτεινής ακτινοβολίας είτε ανακλάται, είτε απορροφάται, είτε διέρχεται (van der Kooi *et al.* 2016).

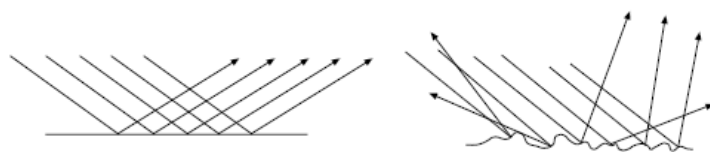


**Εικόνα 1.42: Πορεία μιας ακτίνας φωτός σε εγκάρσια τομή πετάλου.** Από την ακτίνα που προσπίπτει (I) ένα μέρος ανακλάται από την εφυμενίδα πριν εισέλθει στο πέταλο ( $R_s$ ), ένα μέρος ανακλάται (σκεδάζεται) σε διεπιφάνειες από τα ενδότερα στρώματα του πετάλου ( $R_i$ ) και ένα μέρος διαπερνάει το πέταλο (T). Η διαφορά  $I-R_s-R_i-T$  αντιπροσωπεύει το κλάσμα της ακτίνας που απορροφάται (εικόνα από van der Kooi *et al.* 2016).

Αυτή η άποψη προσεγγίζεται πειραματικά με τη χρήση σφαίρας ολοκλήρωσης. Μια ακόμα βασική προσέγγιση για τον έλεγχο της συνεισφοράς της δομής στο χρώμα είναι η σύγκριση των φασμάτων απορρόφησης, διέλευσης ή/και ανάκλασης από άθικτους ιστούς σε σχέση με τα φάσματα εκχυλισμάτων χρωστικών .

Κατά την πρόσπτωση του φωτός στο φυτό, η πρώτη επιφάνεια που συναντά είναι η διεπιφάνεια αέρα και επιδερμίδας/εφυμενίδας. Κατά αυτήν την αλληλεπίδραση ένα μέρος του φωτός ανακλάται και ένα μέρος διέρχεται (Εικόνα 1.42). Αν η εφυμενίδα είναι αρκετά λεία, το φως ανακλάται κατοπτρικά (Εικόνα 1.43) και εν γένει δεν αλλάζει η φασματική σύσταση (απόχρωση) του και συνήθως πολώνεται. Παράλληλα ένα μέρος του προσπίπτοντος φωτός έχει εισέλθει ήδη στο εσωτερικό του οργάνου, και αφού διανύσει κάποια διαδρομή στο εσωτερικό, σκεδάζεται προς τα πίσω (Εικόνα 1.42). Σε αυτήν την περίπτωση συνήθως έχει μεσολαβήσει φασματική τροποποίηση (modulation) της ακτινοβολίας από τη χρωστική και δεν έχει πραγματοποιηθεί πόλωση. Το

υπόλοιπο κλάσμα της ακτινοβολίας που ούτε ανακλάται/σκεδάζεται και ούτε απορροφάται, διέρχεται από το όργανο (Εικόνα 1.42) (Vogelmann 1993, Lee 2007, van der Kooi *et al.* 2016, 2018). Στην περίπτωση που υπάρχουν σημαντικές ποσότητες κηρών,



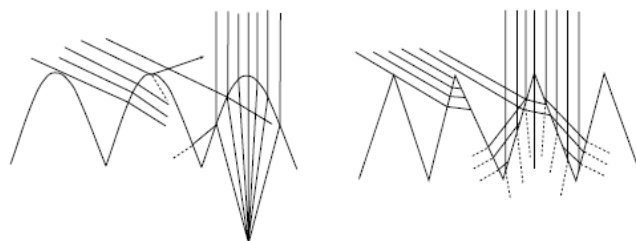
**Εικόνα 1.43: Τύποι ανάκλασης του φωτός στη φυτική επιδερμίδα.** Κατά την πρόσπτωση του φωτός σε μία λεία επιφάνεια το φως ανακλάται κατοπτρικά (αριστερά), ενώ όταν προσπίπτει σε ανώμαλη επιφάνεια η ανάκλαση είναι διάχυτη (δεξιά) (εικόνα από Lee 2007).

αλάτων, ή τρίχωμα στην επιδερμίδα οι παραπάνω γενικεύσεις αλλάζουν. Μπορεί να αυξάνουν την ανάκλαση, όπως συμβαίνει σε ερημικά είδη με λευκό χρώμα (Vogelmann 1993, Lee 2007). Αποθέσεις στην επιδερμίδα μπορεί να

οδηγούν και σε χρωματισμό λόγω εκλεκτικής σκέδασης κατά Rayleigh (Vogelmann 1993). Επιπλέον οι τρίχες μπορεί να φέρουν χρωστικές, όπως ταννίνες, επηρεάζοντας το χρώμα της επιφάνειας (Lee 2007). Η μικρομορφολογία της επιφάνειας έχει μεγάλη σημασία για το οπτικό αποτέλεσμα. Όπως αναφέρθηκε μία πλήρως λεία εφυμενίδα οδηγεί σε κατοπτρική ανάκλαση του φωτός και έχει ως μακροσκοπικό αποτέλεσμα την αίσθηση της στιλπνότητας (Εικόνα 1.43). Όταν υπάρχουν ανωμαλίες στην επιφάνεια, η ανάκλαση είναι διάχυτη και όχι κατοπτρική, και συνήθως μη πολωμένη (Lee 2007). Το τραχύ μικροανάγλυφο έχει συνδεθεί με την εντονότερη διάχυτη ανάκλαση (Εικόνα 1.43), και κατά συνέπεια με την ανάδειξη του χρώματος, και σε άνθη του Ελληνικού οικοσυστήματος όπως το *Asphodelus ramosus* (Chimona *et al.* 2018).

Ιδιαίτερη περίπτωση αποτελούν τα κύτταρα της επιδερμίδας που λειτουργούν ως μικροσκοπικοί φακοί. Κύτταρα με προεξέχον εξωτερικό κυτταρικό τοίχωμα είναι αποτελεσματικότερα κατά τη συλλογή του διάχυτου φωτός.

Στα κύτταρα με οξείες προεξοχές, είναι πιθανότερο να απορροφηθεί ο πλάγιος φωτισμός, και πιο εύκολο να διοχετευθεί προς γειτονικά κύτταρα ο κάθετος φωτισμός (Εικόνα 1.44) (Lee 2007). Τα κύτταρα με πιο αποστρογγυλεμένες προεξοχές μπορούν να δρουν ως συγκλίνοντες επιτεδόκυρτοι (rhapsonvex) φακοί, οι οποίοι επικεντρώνουν την κάθετα

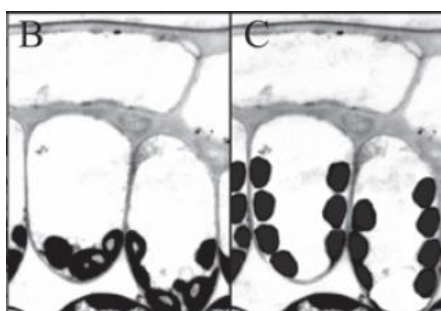


**Εικόνα 1.44: Αλληλεπίδραση του φωτός με προεξέχοντα επιδερμικά κύτταρα.** Όταν τα προεξέχοντα κύτταρα είναι αποστρογγυλεμένα (αριστερά) δρουν ως συγκλίνοντες φακοί και είναι αποτελεσματικότερα στη συλλογή του άμεσου φωτισμού. Όταν οι προεξοχές είναι οξείες συλλέγονται ο πλάγιος και ο κάθετος φωτισμός είτε από το ίδιο κύτταρο, είτε τρέπουν την πορεία του φωτός προς κάποιο γειτονικό κύτταρο (εικόνα από Lee 2007).

προσπίπτουσα ακτινοβολία σε μία εστία (Εικόνα 1.44) (Vogelmann 1993, Lee 2007), αλλά δεν είναι τόσο αποτελεσματικά στη συλλογή του διάχυτου φωτισμού (Εικόνα 1.44) (Lee 2007). Ο βαθμός της συγκέντρωσης από αυτά τα κύτταρα εξαρτώνται από την κυρτότητα του τοιχώματος, το πλάτος του κυττάρου και τις ποσότητες του φωτός που σκεδάζονται και απορροφώνται από τους επιδερμικούς και τους υποκείμενους ιστούς. Κατά τέτοιους

τρόπους το φως μπορεί να επικεντρώνεται στα σημεία που βρίσκονται οι χλωροπλάστες (Vogelmann 1993). Τέτοιου τύπου φύλλα συναντώνται σε σκιάβια και τροπικά φυτά (Vogelmann 1993). Ως συγκλίνοντες φακοί μπορούν να λειτουργήσουν και σταγόνες νερού που παγιδούνται σε επιδερμικά τριχώματα (Vogelmann 1993).

Μία ακτίνα φωτός κατά την πορεία της μέσα σε ένα φυτικό κύτταρο ή ένα φυτικό όργανο συναντά διαφορετικά οπτικά μέσα με διαφορετικούς δείκτες διάθλασης. Ο δείκτης διάθλασης του αέρα είναι 1,00. Ο δείκτης διάθλασης της πλήρως ενυδατωμένης κυτταρίνης είναι περίπου 1,40 (Lee 2007), αν και ο δείκτης διάθλασης του κυτταρικού τοιχώματος μπορεί να είναι και μεγαλύτερος έως και 1,472 (Vogelmann 1993). Το νερό έχει δείκτη διάθλασης 1,30, και το κυτταρόπλασμα λόγω των διαλυμένων ουσιών έχει δείκτη διάθλασης περίπου 1,34. Οι διαφορές μεταξύ των διεπιφανειών ευθύνονται για τις γωνίες που ακολουθεί το φως κατά την πορεία του αλλά και για μικρούς σκεδασμούς (ανακλάσεις) του φωτός σε κάθε διεπιφάνεια (Lee 2007).



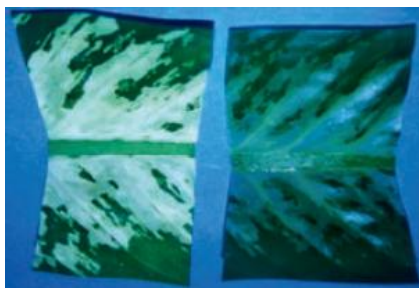
**Εικόνα 1.45: Διαφορική διάταξη χλωροπλάστων σε φύλλο του φυτού *Triolena hirsuta*.** Η διάταξη των χλωροπλάστων μπορεί να γίνεται στην εσωτερική περικλινή πλευρά (αριστερά) ή στα αντικλινή τοιχώματα (δεξιά). Στη δεύτερη περίπτωση ο βαθμός αλληλεπίδρασης του φωτός με τους χλωροπλάστες είναι μειωμένες και κατά συνέπεια ο χρωματισμός είναι και πιο άτονος. Οι χλωροπλάστες μπορούν να κινούνται μέσα στα κύτταρα μεταξύ των δύο διατάξεων σύμφωνα με περιβαλλοντικά ερεθίσματα (εικόνα από Lee 2007).

Ενδοκυτταρικά, οι χρωστικές μπορεί να συγκεντρώνονται σε υποκυτταρικά διαμερίσματα, όπως οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή στα πλαστίδια (Εικόνα 1.45) και οι ανθοκυανίνες στα χυμοτοπιακά έγκλειστα ανθοκυανίνης (AVIs). Η θέση των «σωματιδίων» αυτών μέσα στο κύτταρο, επηρεάζει την αλληλεπίδραση με το φως και εν τέλει το χρώμα. Όταν τοποθετούνται προς τα πλευρικά περιφερειακά (αντικλινή) τοιχώματα του κυττάρου, διέρχεται περισσότερο φως χωρίς να αλληλεπιδρά μαζί τους και το χρώμα ατονεί. Όταν τοποθετούνται προς τα περικλινή τοιχώματα του κυττάρου, ο βαθμός αλληλεπίδρασης φωτός και χρωστικής αυξάνεται και το χρώμα γίνεται εντονότερο (Εικόνα 1.45) (Lee 2007). Η κίνηση των «σωματιδίων» είναι αποτελεσματικός τρόπος τροποποίησης των οπτικών ιδιοτήτων και κίνηση των χλωροπλάστων έχει παρατηρηθεί και στα ανώτερα φυτά (Vogelmann 1993, Lee 2007).

Πολύ μεγάλη σημασία έχει η πορεία που ακολουθεί το φως μέσα στο φυτικό όργανο. Όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος της διαδρομής που διανύει το φως χωρίς αλληλεπίδραση με κάποιο οπτικό υλικό, τόσο μικρότερη είναι η απορρόφηση. Όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος της διαδρομής από διαδοχικές σκεδάσεις στο εσωτερικό του οργάνου, τόσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση (Vogelmann 1993). Οι μεσοκυττάριοι χώροι έχουν μεγάλη σημασία για τις οπτικές ιδιότητες ενός οργάνου (Lee 2007). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση των φύλλων του *Dieffenbachia picta*. Τα φύλλα του φυτού αυτού φέρουν λευκές περιοχές, οι οποίες χαρακτηρίζονται ανατομικά από εκτεταμένους μεσοκυττάριους χώρους και παρουσία ελάχιστης ποσότητας χλωροφύλλης (Εικόνα 1.46). Το αποτέλεσμα είναι η αρκετά



αυξημένη ανάκλαση από τις λευκές περιοχές. Όταν ο αέρας (δείκτης διάθλασης 1,00) των μεσοκυττάρων χώρων αντικαταστάθηκε με νερό (δείκτης διάθλασης 1,30), αυξήθηκε σημαντικά η διέλευση του φωτός και μειώθηκε σημαντικά η ανάκλαση (Εικόνα 1.46). Η μείωση της διαφοράς των δεικτών διάθλασης μεταξύ κυττάρων και μεσοκυττάρου χώρου, μείωσε τον βαθμό των εσωτερικών ανακλάσεων του φωτός στους μεσοκυττάρους χώρους και οδήγησε στις αντίστοιχες αλλαγές στην ολική διέλευση και ανάκλαση του φωτός (Lee 2007). Σε περιπτώσεις όπως η ανώτερη, στις οποίες οι μεσοκυττάριοι χώροι βρίσκονται κοντά στην επιδερμίδα, τότε, συνήθως, υπάρχει μια έντονη σκέδαση (ανάκλαση) του φωτός



**Εικόνα 1.46: Επίδραση των μεσοκυττάρων χώρων στις οπτικές ιδιότητες.** Τμήμα φύλλων *Dieffenbachia picta* σε φυσική κατάσταση (αριστερά) και μετά από αντικατάσταση του αέρα των μεσοκυττάρων χώρων από νερό (δεξιά). Το λευκό χρώμα οφείλεται στην εκτεταμένη εσωτερική σκέδαση του φωτός στους μεσοκυττάρους χώρους του μεσόφυλλου. Με την μείωση της διαφοράς του δείκτη διάθλασης μεταξύ κυττάρων και μεσοκυττάρου χώρου (πλήρωση με νερό) μειώνεται το τμήμα του φωτός που ανακλάται, και αντί αυτού διέρχεται δημιουργώντας ένα ημιδιαφανές αποτέλεσμα (εικόνα από Lee 2007).

προς τα πίσω για όλα τα μήκη κύματος, πριν το φως προλάβει να αλληλεπιδράσει με τις χρωστικές. Αυτό ταυτόχρονα συνεπάγεται μειωμένη διέλευση και μια πιο ασημένια όψη (Εικόνα 1.46). Σε παρόμοιο φαινόμενο σκεδάσεων πάνω στους κρυστάλλους οφείλεται και το λευκό χρώμα του χιονιού. Αντίθετα όταν οι μεσοκυττάριοι χώροι βρίσκονται πιο εσωτερικά και περιβάλλονται από χρωστικές, τότε όλη η πορεία διαδοχικών σκεδάσεων (ανακλάσεων) του φωτός πάνω στις χρωστικές, αυξάνει το βαθμό αλληλεπίδρασης μαζί τους και επομένως την φασματικά επιλεκτική απορρόφηση (Lee 2007). Γενικά λόγω των διαφορών στους δείκτες διάθλασης μεταξύ του αέρα και του εσωτερικού του οργάνου, ένα μέρος του φωτός μπορεί να «παγιδευτεί μέσα στο όργανο» (light traps) (Vogelmann 1993).

Ιστορικά έχουν γίνει διάφορες απόπειρες μοντελοποίησης των οπτικών ιδιοτήτων φυτικών οργάνων (π.χ. φύλλα), αλλά χωρίς ικανοποιητικά αποτελέσματα. Αυτό οφείλεται στην εξαιρετικά σύνθετη πολυπλοκότητα της δομής τους, η οποία με την πάροδο του χρόνου γίνεται ολοένα και πιο εμφανής. Η πολυπλοκότητα αυτή ενέχεται εν μέρει στην απρόβλεπτη εσωτερική (γεωμετρική)

ανομοιογένεια του οργάνου και σε όλα τα πιθανά ενδεχόμενα για τις γωνίες πρόσπτωσης των ακτίνων στις εσωτερικές διεπιφάνειες (Lee 2007).

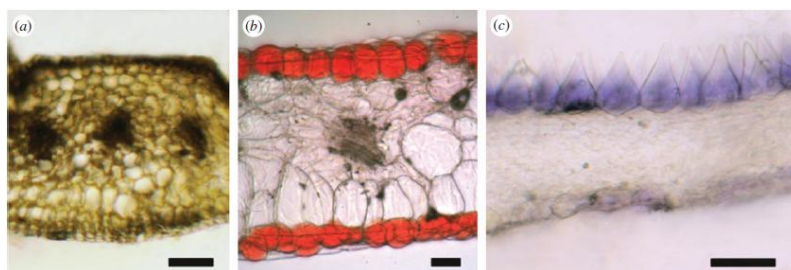
Πιο συγκεκριμένα για τα άνθη, ο χρωματισμός είναι αποτέλεσμα του φάσματος απορρόφησης των χρωστικών, των δομών που προκαλούν σκέδαση και του πάχους του πετάλου (van der Kooi *et al.* 2016). Σε μικρά και μεγάλα μήκη κύματος η διέλευση είναι μεγαλύτερη της ανάκλασης. Επιπλέον σε μεγάλα μήκη κύματος (>800 nm) η απορρόφηση λόγω χρωστικών είναι ελάχιστη, και η όποια σκέδαση οφείλεται σε δομές. Τα λευκά άνθη, σε αντίθεση με τα έγχρωμα, συνήθως έχουν μικρή ανάκλαση στο υπεριώδες (van der Kooi *et al.* 2016). Τα κυτταρικά διαμερίσματα στα άνθη γίνεται να εμφανίζουν διακριτές οπτικές συμπεριφορές. Αν θεωρηθεί για παράδειγμα επιδερμικός ιστός, με υψηλή συγκέντρωση φλαβονοειδών στα χυμοτόπια. Τα φλαβονοειδή απορροφούν στην υπεριώδη ακτινοβολία.

Το κλάσμα της υπεριώδους ακτινοβολίας που προσπίπτει στα χυμοτόπια απορροφάται γρήγορα, ενώ το κλάσμα που προσπίπτει στους αντικλινείς αποπλαστικούς και κυτταροπλασματικούς χώρους, και κυρίως γύρω από τους «αρμούς» των επιδερμικών κυττάρων, εισχωρεί βαθύτερα στον επιδερμικό ιστό (Gorton and Vogelmann 1996).

Οι μεσοκυττάριοι χώροι του μεσόφυλλου συμβάλλουν σημαντικά στο οπτικό αποτέλεσμα του άνθους. Για παράδειγμα απουσία χρωστικών η ανάκλαση, σκέδαση και διάχυση που παθαίνουν οι ακτίνες του φωτός καθώς έρχονται σε επαφή με εκτενείς και ακανόνιστες δομές κυττάρων και αέρα (μεσοκυττάρων χώρων) ενισχύει το λευκό χρώμα του πετάλου. Ενδιαφέρουσα είναι η περίπτωση των λευκών περιοχών του πετάλου της ορχιδέας *Blc. 'Hillary Rodham Clinton'*, στην οποία όταν ο αέρας του μεσόφυλλου αντικατασταθεί με νερό το πέταλο μεταβάλλεται σε πολύ διαφανές (Lee 2007). Σε αυτό το σημείο φαίνεται η αναλογία ανάμεσα στις οπτικές ιδιότητες των φύλλων και των πετάλων. Επιπλέον τα πέταλα με χαλαρό μεσόφυλλο και εκτενείς, δηλαδή, μεσοκυττάρους χώρους έχουν πιο έντονο χρωματικό αποτέλεσμα (Lee 2007, Argiropoulos and Rhizoroulou 2012a, 2012b, Gkikas *et al.* 2015). Σύμφωνα με οπτικά μοντέλα η σκέδαση φαίνεται να είναι εντονότερη σε έγχρωμες παρά σε άχρωμες στρώσεις του πετάλου, επειδή τα κοκκία της χρωστικής εντείνουν την ανομοιογένεια (Stavenga and van der Kooi 2016 όπως αναφέρεται από van der Kooi *et al.* 2016). Υπάρχει η υπόθεση ότι τα πολύ λεπτά πέταλα τείνουν να έχουν πιο ανομοιογενές εσωτερικό και με αυτόν τον τρόπο αντισταθμίζουν το λεπτό τους πάχος σε ένταση χρώματος (van der Kooi *et al.* 2016). Η παρατήρηση αυτή έχει πραγματοποιηθεί και σε άνθη της Ελληνικής χλωρίδας τα οποία είτε είναι πολύ λεπτά είτε έχουν πολύ σύντομη διάρκεια ζωής (Argiropoulos and Rhizoroulou 2012a, 2012b). Η ύπαρξη εκτεταμένων μεσοκυττάρων χώρων (χαλαρό παρέγχυμα του μεσόφυλλου) ανάμεσα σε έγχρωμες επιδερμίδες, εικάζεται ότι εντείνει το χρώμα του άνθους του *Oxalis pre-caprae*. Τα κίτρινα πέταλα αυτού του άνθους είναι πολύ λεπτά με ευρείς μεσοκυττάρους χώρους. Εικάζεται ότι οι μεσοκυττάριοι αυτοί χώροι προκαλούν εκτεταμένες σκεδάσεις του φωτός και κατά συνέπεια αυξημένη αλληλεπίδραση με τις χρωστικές. Στο αποτέλεσμα εικάζεται ότι συνεισφέρουν τα κωνικά επιθηλιακά κύτταρα της άνω επιδερμίδας (Argiropoulos and Rhizoroulou 2012a). Παρόμοιοι οπτικοί μηχανισμοί ανάδειξης του χρώματος έχουν προταθεί για τα βραχύβια άνθη της Ελληνικής χλωρίδας των φυτών *Cistus creticus*, *Cistus salviifolius*, *Eruca sativa* και *Sinapis arvensis* (Argiropoulos and Rhizoroulou 2012b), και πιθανώς για το *Nerium oleander* (Argiropoulos and Rhizoroulou 2013) και το εισαχθέν *Chainomeles japonica* (Argiropoulos *et al.* 2017).

Στα πέταλα των ανθέων συνήθως συνυπάρχουν διάφορα είδη χρωστικών τα οποία συνεισφέρουν στο τελικό χρωματικό αποτέλεσμα (Lee 2007, Glover 2014). Ενδοκυτταρικά οι διαφορετικές χρωστικές μπορεί να εντοπίζονται στο ίδιο υποκυτταρικό διαμέρισμα (π.χ. χυμοτόπιο), σε διαφορετικά (π.χ. χυμοτόπιο και πλαστίδια) (Glover 2014), ή και σε διαφορετικά κύτταρα (π.χ. επιδερμικός και υπο-επιδερμικός ιστός) (Lee 2007). Συνήθως οι ορατές χρωστικές του άνθους αποτελούνται από ανθοκυανίνες οι οποίες εντοπίζονται στο χυμοτόπιο των επιδερμικών κυττάρων. Μερικές φορές η χρωστική μπορεί να εντοπίζεται σε εσωτερικούς ιστούς αμέσως κάτω από την επιδερμίδα (Lee 2007). Στα πέταλα των ανθέων συνήθως συνυπάρχουν διάφορα είδη χρωστικών τα οποία συνεισφέρουν στο τελικό χρωματικό αποτέλεσμα (Lee 2007, Glover 2014). Ενδοκυτταρικά οι διαφορετικές χρωστικές μπορεί να εντοπίζονται στο ίδιο υποκυτταρικό διαμέρισμα (π.χ. χυμοτόπιο), σε διαφορετικά

(π.χ. χυμοτόπιο και πλαστίδια) (Glover 2014), ή και σε διαφορετικά κύτταρα (π.χ. επιδερμικός και υπο-επιδερμικός ιστός) (Lee 2007). Συνήθως οι ανθοκυανίνες και άλλα φλαβονοειδή εντοπίζονται αποκλειστικά στην επιδερμίδα ενώ τα καροτενοειδή απαντώνται και στην επιδερμίδα και στο μεσόφυλλο (van der Kooi *et al.* 2016). Γενικά τα πρότυπα χωρικής κατανομής της χρωστικής περιλαμβάνουν συμμετρική κατανομή στις δύο επιδερμίδες (άνω και κάτω), ασύμμετρη κατανομή στις δύο επιδερμίδες και ομοιόμορφη κατανομή σε όλο το μεσόφυλλο (σπάνιο) (Εικόνα 1.47) (van der Kooi *et al.* 2016). Επιπλέον είναι συχνό η μορφολογία και το σχήμα των επιδερμικών κυττάρων να διαφέρουν μεταξύ



**Εικόνα 1.47: Διαφορετικά πρότυπα χωρικού εντοπισμού των χρωστικών στα πέταλα.** Εικονίζονται εγκάρσιες τομές πετάλων *Oenothera biennis* (a), *Phaseolus coccineus* (b) και *Browallia americana* (c). Στο *Oenothera biennis* φαίνεται ομοιόμορφη κατανομή των χρωστικών σε όλο το πάχος του πετάλου (σπάνιο). Στο *Phaseolus coccineus* φαίνεται η περίπτωση της ίσης κατανομής χρωστικής στις δύο επιδερμίδες. Στο *Browallia americana* φαίνεται τοποθέτηση της χρωστικής μόνο στην άνω επιδερμίδα, και επιπλέον στη συγκεκριμένη περίπτωση διακρίνεται η διαφορετική μορφολογία ανάμεσα στις δύο επιφάνειες. Κλίμακα 50  $\mu\text{m}$  (εικόνα από van der Kooi *et al.* 2016).

της άνω και της κάτω επιδερμίδας (Εικόνα 1.47)

(Αργυρόπουλος 2009, Argiropoulos and Rhizoroulou 2012a, 2012b, 2013, Argiropoulos *et al.* 2017). Σύμφωνα με μετρήσεις σε μοντέλα πετάλων, η ανάκλαση, σε αντίθεση με τη διέλευση, εμφανίζει σημαντική εξάρτηση από το πρότυπο χωρικής κατανομής

της χρωστικής στο πέταλο (van der Kooi *et al.* 2016). Η στρατηγική αύξησης της έντασης του χρώματος υπερτερεί ως έναν βαθμό προς την σύνθεση αυξημένης χρωστικής, η οποία είναι δαπανηρή ενεργειακά, και προς το αυξημένο πάχος πετάλου, το οποίο απαιτεί και ανάλογη μηχανική υποστήριξη (van der Kooi *et al.* 2016).

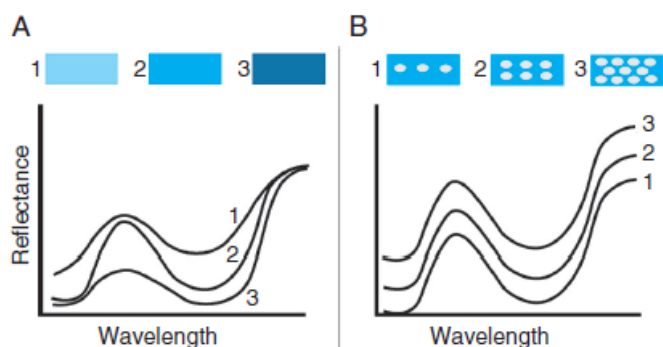
### 1.7.2 Άλλες οπτικές ιδιότητες των ανθέων

Στο οπτικό μήνυμα του άνθους, και κατ' ουσίαν στο χρώμα του, εμπλέκονται μια σειρά από παράγοντες εκτός από την καθαρά φασματική του απόχρωση (hue), όπως αυτή προκύπτει από τις κορυφές των φασμάτων ανάκλασης. Μία σημαντική παράμετρος του χρώματος του άνθους, ανεξάρτητη από την απόχρωση (hue) και τον κορεσμό (saturation), είναι η λαμπρότητα (brightness). Δεν αποτελεί ένα απόλυτο χαρακτηριστικό, αλλά εξαρτάται εν μέρει από το οπτικό σύστημα του δέκτη. Εκφράζει κατά πόσο «λευκωπό» ή «σκουρογκιζωπό» είναι ένα χρώμα. Ενδέχεται να φέρει, μάλλον μικρή, σημασία κατά την επικονίαση, ιδιαίτερα συγκριτικά με την λαμπρότητα του υποβάθρου. Η λαμπρότητα αντικατοπτρίζεται από το πλάτος (amplitude) της καμπύλης ανάκλασης (reflectance curve) (Εικόνα 1.48), η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από τις χρωστικές, τις διαφορές στους δείκτες διάθλασης, την εσωτερική ανομοιογένεια (Εικόνα 1.48) και το πάχος του πετάλου. Εν γένει η ανάκλαση αυξάνεται από τη μεγάλη διαφορά στους δείκτες διάθλασης μεταξύ



δύο επιφανειών. Επιπλέον η ανάκλαση ευνοείται από την εσωτερική ανομοιογένεια ή/και το μεγάλο πάχος του πετάλου (van der Kooi *et al.* 2018).

Άλλο χαρακτηριστικό του χρώματος στα άνθη είναι ο κορεσμός (saturation) του χρώματος. Η έννοια αυτή αποκρίνεται στο κατά πόσο «καθαρό» φαίνεται το χρώμα. Εν γένει, έντονος κορεσμός για ένα μήκος κύματος αντικατοπτρίζεται από έντονες κλίσεις γύρω από αυτό στην καμπύλη ανάκλασης (Εικόνα 1.48). Αυτό προκύπτει γιατί μια πιο ήπια κλίση σε μια κορυφή του φάσματος ανάκλασης δείχνει ότι ανακλώνται σε σημαντικό βαθμό και τα χρώματα (μήκη κύματος) που βρίσκονται δίπλα από το μέγιστο, με ένα πιο «ασαφές»



**Εικόνα 1.48: Επίδραση της συγκέντρωσης χρωστικής και της εσωτερικής ανομοιογένειας σύμφωνα με το φάσμα ανάκλασης σε μοντέλα πετάλων.** Α. Αυξανόμενη συγκέντρωση χρωστικής προκαλεί μείωση της λαμπρότητας (brightness) του χρώματος, δηλαδή μείωση του πλάτους της καμπύλης ανάκλασης. Μια έντονη αλλά ενδιάμεση συγκέντρωση χρωστικής προκαλεί τον εντονότερο κορεσμό (saturation) δηλαδή την περισσότερη «καθαρότητα» του χρώματος. Ο έντονος κορεσμός αντικατοπτρίζεται με πιο απότομες κορυφές στο φάσμα ανάκλασης. Σε κάθε περίπτωση η συγκέντρωση της χρωστικής δεν επηρεάζει την απόχρωση (hue) του χρώματος, δηλαδή τη θέση των μεγίστων ανάκλασης. Β. Η εσωτερική ανομοιογένεια προκαλεί εντονότερη ανάκλαση και επομένως μεγαλύτερη ανάκλαση και περισσότερη λαμπρότητα του χρώματος. Αυτό οφείλεται στην αυξημένη σκέδαση των ακτίνων φωτός πάνω στα σωματίδια που προκαλούν την ανομοιογένεια (εικόνα από van der Kooi *et al.* 2018).

χρωματικό αποτέλεσμα. Ο κορεσμός καθορίζεται από τις χρωστικές, αλλά όχι από το είδος τους. Καθορίζεται από τον βαθμό από τον οποίο το φως απορροφάται από τη χρωστική, και πιο συγκεκριμένα καθορίζεται από τη συγκέντρωση και τη χωρική διευσθέτηση της χρωστικής. Κατά βάση ο κορεσμός ευνοείται με αύξηση της συγκέντρωσης της χρωστικής και κατά την τοποθέτησή της στις επιδερμίδες. Κατά την τοποθέτηση της χρωστικής στην άνω επιδερμίδα το εσωτερικά ανακλώμενο φως αλληλεπιδρά δυο φορές με τη χρωστική, μία καθώς εισέρχεται και μία καθώς εξέρχεται από το πέταλο. Επίσης πολύ μεγάλη συγκέντρωση χρωστικής μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του κορεσμού (Εικόνα 1.48),

γιατί οι χρωστικές απορροφούν σε ένα ευρύτερο φάσμα και πολύ επιλεκτικά σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Ο κορεσμός του χρώματος μπορεί να αυξηθεί και από το σχήμα των επιδερμικών πετάλων. Και η απόχρωση και ο κορεσμός φαίνεται να έχουν σημασία κατά την επικοινωνία (van der Kooi *et al.* 2018).

Ένα ακόμα οπτικό χαρακτηριστικό ορισμένων ανθών είναι η στιλπνότητα (gloss). Η στιλπνότητα οφείλεται στην κατευθυνόμενη (μη διάχυτη) ανάκλαση του φωτός, η οποία συμβαίνει μη επιλεκτικά ως προς το μήκος κύματος. Στιλπνή όψη μπορεί να προκληθεί από την κατοπτρική ανάκλαση των ακτίνων του φωτός σε πολύ λείες επιφάνειες πετάλων που δημιουργούνται είτε από πολύ λεία εφυμενίδα είτε από πολύ λεία επιδερμίδα. Επιπλέον και η εσωτερική ανατομία του πετάλου ενδέχεται να ευνοεί τη στιλπνότητα. Εφυμενιδιακές

μικροδομές ή κωνικά επιδερμικά κύτταρα παρεμποδίζουν την στυλπνότητα. Στυλπνότητα γίνεται να παρατηρηθεί σε συγκεκριμένες μόνο περιοχές του πετάλου (Mouyroud and Glover 2016, van der Kooi *et al.* 2018).

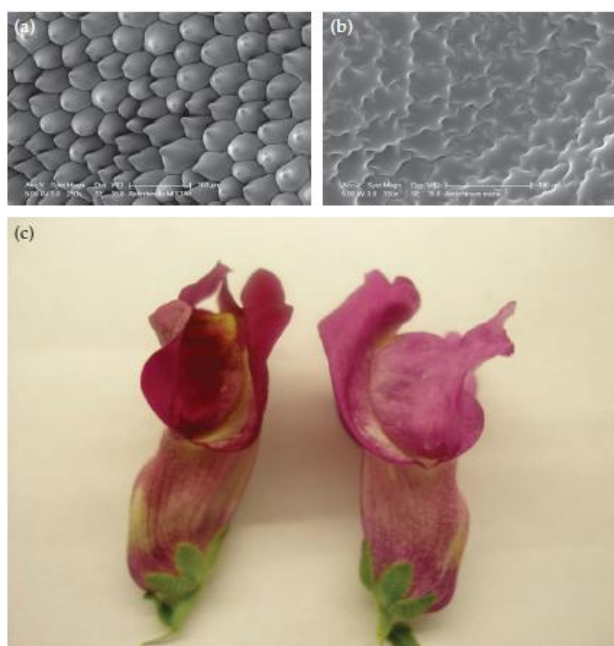
Το ηλιακό φως είναι μη πολωμένο, αλλά μπορεί να υποστεί έντονη πόλωση (polarization) κατά την ανάκλασή του στην λεία επιφάνεια ενός πετάλου, ενώ παραμένει μη πολωμένο κατά την ανάκλασή του στην ανώμαλη επιφάνεια ενός πετάλου (π.χ. με κωνικά επιδερμικά κύτταρα). Τα άνθη συχνά δημιουργούν μοτίβα (patterns) πολωμένου φωτός, τα οποία προέρχονται πιθανώς από διαφορές στο ανάγλυφο της επιδερμίδας (Mouyroud and Glover 2016, van der Kooi *et al.* 2018). Ένα άλλο οπτικό χαρακτηριστικό ορισμένων ανθών αποτελεί ο ιριδισμός, ο οποίος είναι προϊόν δομικού χρώματος. Ιριδισμός σημαίνει το παρατηρούμενο μήκος κύματος του ανακλώμενου φωτός να εξαρτάται από τη γωνία παρατήρησης (Mouyroud and Glover 2016, van der Kooi *et al.* 2018). Ένα χαρακτηριστικό κάποιων χρωστικών είναι ο φθορισμός (fluorescence), δηλαδή η εκπομπή ακτινοβολίας μικρότερου μήκους κύματος από μία ουσία, όταν προσπίπτει σε αυτήν φωτεινή ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος. Αν και έχει προταθεί φθορισμός σε πέταλα, νέκταρ και γύρη, πιθανότατα αυτός δεν γίνεται αισθητός υπό φυσικές συνθήκες (van der Kooi *et al.* 2018).

### 1.7.3 Περιπτώσεις δομικής ενίσχυσης του χρώματος σε άνθη

Δομικοί παράγοντες που συμβάλλουν στο χρώμα, και στο οπτικό αποτέλεσμα εν γένει, των πετάλων είναι το σχήμα και το μικροανάλυφο των επιδερμικών κυττάρων. Αυτό γίνεται και σε πολλές άλλες περιπτώσεις, εκτός από αυτές του καθαρά δομικού χρώματος.

Ένας συχνός τύπος των επιδερμικών κυττάρων είναι ο κωνικός-θηλώδης (conical-papillate). Έχει προταθεί ότι αυτός ο τύπος αυξάνει την απορρόφηση του φωτός από τη χρωστική ενισχύοντας το χρωματικό αποτέλεσμα (Kay *et al.* 1981, όπως αναφέρεται από Glover 2014). Έχει αποδειχθεί ότι τα κωνικά-θηλώδη κύτταρα αυξάνουν την ένταση του χρώματος σε σχέση με μη φυσιολογικά μεταλλάγματα επίπεδων κυττάρων (Εικόνα 1.49). Τα εν λόγω μεταλλάγματα έχουν πιο άτονα χρώματα και μειωμένη αναπαραγωγική επιτυχία (Lee 2007, Glover 2014). Στο *Antirrhinum majus* η αδρανοποίηση ενός μόνο γονιδίου, του MIXTA, προκαλεί αλλαγή του σχήματος των κυττάρων της άνω επιδερμίδας από κωνικά θηλώδη, σε πολύ ελαφρά κυρτά-σχεδόν επίπεδα (Εικόνα 1.49). Τα mixta<sup>-</sup> άνθη φέρουν πιο άτονα χρώματα σε σχέση με τα Mixta<sup>+</sup> άνθη (Gorton and Vogelmann 1996, Glover 2014, Noda 1994 όπως αναφέρεται από Mouyroud and Glover 2016). Σε αυτό συμβάλλει και το σχήμα των επιδερμικών κυττάρων με τον ακόλουθο τρόπο: Τα επιδερμικά κύτταρα φέρουν χυμοτόπια γεμάτα με υδατοδιαλυτές ανθοκυανίνες. Τα κωνικά-θηλώδη κύτταρα στα Mixta<sup>+</sup> άνθη φέρουν πολύ μεγάλη κυρτότητα και λειτουργούν –αποδεδειγμένα πειραματικά - ως μικροσκοπικοί κυρτοί, έντονα συγκλίνοντες, φακοί. Σε αντίθεση τα mixta<sup>-</sup> άνθη φέρουν πολύ μικρή κυρτότητα και η λειτουργία τους ως φακοί είναι πιο άτονη (Gorton and Vogelmann 1996). Τα κωνικά-θηλώδη κύτταρα καταλαμβάνουν, κατ' αρχήν, μεγαλύτερο όγκο λόγω του προεξέχοντος σχήματός τους, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διαδρομή του φωτός μέσα από το χυμοτόπιο του κυττάρου και να αυξάνεται η απορρόφηση. Επιπλέον η έντονη κυρτότητα προκαλεί έντονη κάμψη των ακτίνων που προσπίπτουν στο κύτταρο, αυξάνοντας με ακόμα έναν τρόπο τη διαδρομή του φωτός μέσα από τις χρωστικές και

επομένως τον βαθμό αλληλεπίδρασης τους. Τέλος, σε ό,τι αφορά το ορατό φως, η κυρτότητα των κυττάρων στα *Mixta*<sup>+</sup> είναι τέτοια ώστε το εστιακό κέντρο του φωτός (σημείο στο οποίο συγκλίνουν όλες οι ακτίνες ίδιου μήκους κύματος) να βρίσκεται μέσα στο

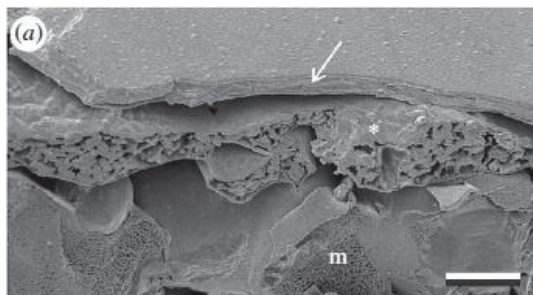


**Εικόνα 1.49: Μακρομορφολογική και μικρομορφολογική εικόνα άνθους *Antirrhinum majus* άγριου τύπου και μεταλλάγματος *mixta*<sup>-</sup>. Πάνω εικονίζονται εικόνες SEM της μικρομορφολογίας της επιδερμίδας ανθέων άγριου τύπου (αριστερά) και του μεταλλάγματος (δεξιά). Τα κύτταρα του άγριου τύπου είναι κωνικά ενώ του μεταλλάγματος σχεδόν επίπεδα. Κάτω εικονίζονται οι μακροσκοπικές όψεις των ανθέων άγριου τύπου (αριστερά) και του μεταλλάγματος (δεξιά). Το μετάλλαγμα φέρει εμφανώς πιο άτονο χρώμα. Η γονιδιακή μετάλλαξη αφορά μόνο στο σχήμα των κυττάρων και όχι στις βιοσυνθετικές οδούς των χρωστικών (εικόνα από Glover 2014).**

ανομοιομορφίες στη δομή τους. Αυτές αφορούν κυρίως ανομοιογένεια των κωνικών κυττάρων μεταξύ τους ως προς το ύψος, τη θέση και τον προσανατολισμό. Μοντέλα προσομοίωσης βασισμένα στην επιδερμίδα τριαντάφυλλου έδειξαν ωστόσο ότι αυτή η ανομοιογένεια δεν επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τον μηχανισμό συλλογής του φωτός (Fritz *et al.* 2017). Έχει προταθεί ότι το άνοιγμα των ανθέων μπορεί να συγχρονίζεται με την ημερήσια φωτοπερίοδο ώστε να γίνεται εκμετάλλευση του καταλληλότερου φωτεινού καθεστώτος για την εστίαση του φωτός και κατ' επέκταση την ανάδειξη του χρώματος (Gkikas *et al.* 2015). Τα κωνικά-θηλώδη κύτταρα μπορεί επίσης να συμβάλλουν σε υδροφοβικότητα (Lee 2009, Stratakis *et al.* 2009, Whitney *et al.* 2011), να προσφέρουν καλύτερη πρόσφυση στους επικονιαστές (Lee 2007, Whitney *et al.* 2011, Glover 2014, Mourgoud and Glover 2016), αύξηση της θερμοκρασίας – αν και αυτό τίθεται υπό αμφισβήτηση (Whitney *et al.* 2011) - και αυξημένη εξάτμιση του νέκταρος και οσμής- αν και αυτό τίθεται επίσης υπό αμφισβήτηση (Whitney *et al.* 2011, Glover 2014).

χυμοτόπιο των επιδερμικών κυττάρων, δηλαδή στο σημείο που υπάρχουν οι ανθοκυανίνες. Αντιθέτως, η κυρτότητα των κυττάρων στα *mixta*<sup>-</sup> είναι μικρότερη με αποτέλεσμα οι ακτίνες να εστιάζονται στους άχρωμους ιστούς του μεσόφυλλου. Όλα αυτά συμβάλλουν στην αύξηση της απορρόφησης, και κατά συνέπεια της έντασης του χρώματος (Εικόνα 1.49) (Gorton and Vogelmann 1996). Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η ανάκλαση στα αντίστοιχα μήκη κύματος (Gorton and Vogelmann 1996, Lee 2007). Η εστίαση του φωτός από κωνικά επιδερμικά κύτταρα μέσα σε σημεία του χυμοτοπίου τους, έχει επιβεβαιωθεί και με μαθηματικά υπολογιστικά μοντέλα σε άνθη των μεσογειακών φυτών *Nerium oleander* και *Oxalis prescaryae*, με αποτέλεσμα την αύξηση της έντασης του χρώματος (Gkikas *et al.* 2015). Οι πραγματικές ανθικές επιδερμίδες με κωνικά κύτταρα παρουσιάζουν πολλές «ατέλειες»-

Μια ακόμα περίπτωση άνθους στην οποία η δομή συμβάλλει στο οπτικό αποτέλεσμα, χωρίς να πρόκειται ωστόσο για καθαρά δομικό χρώμα, είναι τα άνθη ορισμένων *Ranunculus spp.* όπως π.χ. το *Ranunculus repens*. Τα συγκεκριμένα άνθη είναι κίτρινου χρώματος και επιπλέον χαρακτηρίζονται από έντονη στιλπνότητα, δηλαδή κατοπτρική ανάκλαση των ακτίνων του προσπίπτοντος φωτός (Vignolini *et al.* 2012b, van der Kooi *et al.* 2017). Η



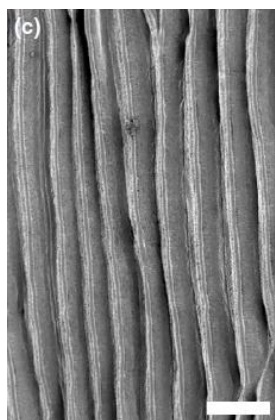
**Εικόνα 1.50:** Εικόνα SEM από διατομή της άνω επιφάνειας του πετάλου *Ranunculus acris*. Διακρίνονται οι εξαιρετικά λεία εφυμενίδα της άνω επιφάνειας και η πολύ λεπτή και ομοιόμορφη άνω επιδερμίδα (βέλος). Στη συνέχεια φαίνεται το υποκείμενο στρώμα αέρα που διακόπτεται μόνο περιστασιακά από τη σύνδεση αμυλούχου στρώματος και άνω επιδερμίδας. Από κάτω φαίνεται το στρώμα ακανόνιστων κυττάρων με πολλά κοκκία αμύλου (\*) και παρακάτω τα ακανόνιστα μεγαλύτερα κύτταρα του μεσόφυλλου (m). Κλίμακα 10  $\mu\text{m}$  (εικόνα από van der Kooi *et al.* 2017).

ανατομία του πετάλου από την άνω προς την κάτω πλευρά περιλαμβάνει την άνω επιδερμίδα, ένα στρώμα αμυλούχων κυττάρων, τα κύτταρα του μεσόφυλλου και την κάτω επιδερμίδα (Εικόνα 1.50). Η άνω επιφάνεια των πετάλων είναι εξαιρετικά λεία και προκύπτει από τα επίπεδα επιδερμικά κύτταρα και από την ομοιόμορφη κατανομή της εφυμενίδας (Εικόνα 1.50). Τα κύτταρα της άνω επιδερμίδας είναι λεπτά σε πάχος, τοπικά ισοπαχή, και περιλαμβάνουν καρροτενοειδή. Πιο εσωτερικά τα αμυλούχα κύτταρα είναι λευκά, ανομοιογενή, ακανόνιστου σχήματος και περιέχουν κοκκία αμύλου. Μεταξύ του στρώματος των αμυλούχων κυττάρων και της άνω επιδερμίδας παρεμβάλλεται ένα λεπτό αλλά κυμαινόμενου πάχους στρώμα αέρα (Εικόνα 1.50). Η άνω επιδερμίδα συνδέεται

μόνο περιστασιακά με το στρώμα των κυττάρων του αμύλου. (Vignolini *et al.* 2012b, van der Kooi *et al.* 2017). Τα κύτταρα του μεσόφυλλου και η κάτω επιδερμίδα φέρουν καρροτενοειδή και χλωροφύλλη α και ανάμεσά τους παρατηρούνται ακανόνιστοι μεσοκυττάριοι χώροι (van der Kooi *et al.* 2017). Η στιλπνότητα του άνθους (δηλαδή η κατοπτρική ανάκλαση του προσπίπτοντος φωτός) εκτείνεται σε όλη την περιοχή του ορατού φάσματος και εκτείνεται και στο υπεριώδες, και συνυπάρχει με τον γενικότερο κίτρινο χρωματισμό (Vignolini *et al.* 2012b). Ο τρόπος με τον οποίο η ανατομία του άνθους συμβάλλει σε αυτό είναι ο ακόλουθος: Αρχικά ένα τμήμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, ανεξάρτητα του μήκους κύματος, ανακλάται κατοπτρικά από την εξαιρετικά λεία εφυμενίδα και δεν εισέρχεται καν στο πέταλο. Στη συνέχεια ένα κλάσμα της ακτινοβολίας που διασχίζει την επιδερμίδα ανακλάται πάλι πίσω στη διεπιφάνεια με το στρώμα αέρα και εξέρχεται λόγω της παρουσίας του στρώματος αέρα (και επομένως της έντονης διαφοράς στον δείκτη διάθλασης). Αυτό συμβάλλει επιπλέον στην κατοπτρική ανάκλαση του προσπίπτοντος φωτός (στιλπνότητα) αλλά πλέον δεν αφορά όλο το ορατό φάσμα αφού έχει μεσολαβήσει αλληλεπίδραση με τις χρωστικές. Ένα ακόμα μέρος του φωτός που διέρχεται από την επιδερμίδα σκεδάζεται προς τα πίσω από υποκείμενους ιστούς (αμυλούχο στρώμα, και μεσόφυλλο) και συμβάλλει στη δημιουργία μιας διάχυτης κίτρινης ανάκλασης. Στις δύο τελευταίες περιπτώσεις ανακλάται κίτρινο χρώμα το οποίο είναι και αρκετά έντονο γιατί το φως αλληλεπιδρά δύο φορές με τις χρωστικές της άνω επιδερμίδας, μία εισερχόμενο και μία εξερχόμενο κατά την ανάκλαση (κατοπτρική ή διάχυτη) (Vignolini *et al.* 2012b, van der

Κοοί *et al.* 2017). Ωστόσο, λόγω της καμπυλότητας του άνθους, η στιλπνότητα είναι ορατή μόνο από συγκεκριμένο σημεία του πετάλου στα οποία η γωνία πρόσπτωσης του φωτός είναι η κατάλληλη (van der Kooi *et al.* 2017). Ενδέχεται αυτές οι οπτικές ιδιότητες του άνθους να συμβάλλουν άμεσα ή έμμεσα στην επικονίαση (Vignolini *et al.* 2012b, van der Kooi *et al.* 2017).

Ένα άλλο άνθος στο οποίο η δομή ενισχύει το χρώμα των χρωστικών είναι ορχιδέες του γένους *Ophrys*, όπως το *Ophrys speculum*. Στο άνθος του, στο κέντρο του χείλους (labellum) φέρει έναν πολύ στιλπνό μπλε θυρεό (speculum). Τα κύτταρα του θυρεού φέρουν κάποια μπλε χρωστική η οποία βασίζεται στην κυανιδίνη και ταυτοχρόνως φέρει και κάποιες φλαβονόλες. Επιπλέον η επάνω επιδερμίδα του θυρεού φέρει εξαιρετικά λεία εφυμενίδα και επιφάνεια. Από οπτικές παρατηρήσεις φαίνεται ότι στη συγκεκριμένη επιφάνεια υπάρχει μια διάχυτη ανάκλαση του μπλε και υπεριώδους φωτός, η οποία οφείλεται στις χρωστικές και μια στιλπνή κατοπτρική ανάκλαση του λευκού φωτός που οφείλεται στην εξαιρετικά λεία εφυμενίδα (Vignolini *et al.* 2012a).



**Εικόνα 1.51:** Ηλεκτρονιογραφία SEM της άνω επιφάνειας πετάλου *Eschscholzia californica*. Διακρίνεται η εξαιρετικά σπάνια μικρομορφολογία των πρισματικών κυττάρων, τα οποία φέρουν στην επιφάνειά τους και διαμήκεις εφυμενιδιακές ποικίλλσεις. Κλίμακα 20  $\mu\text{m}$  (εικόνα από Wilts *et al.* 2018).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι οπτικές ιδιότητες και η μικρομορφολογία των πετάλων του άνθους του *Eschscholzia californica* (Εικόνα 1.51). Τα άνθη του φέρουν έντονα κίτρινα-πορτοκαλί χρώματα λόγω καροτενοειδών και επιπλέον εμφανίζουν υψηλή ανάκλαση προσδίδοντας μια μεταξένια (silky) όψη. Οι δύο επιδερμίδες, και ιδίως η άνω, εμφανίζουν ένα πολύ ιδιαίτερο ανάγλυφο καθώς τα κύτταρά του προεξέχουν με τέτοιο τρόπο που σχηματίζουν μια πρισματική δομή (prism-like) (Εικόνα 1.51). Η προεξοχή αυτή οφείλεται σε διαφορεική πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος και φέρει μία πολύ μικρή διόγκωση στην άκρη της. Οι προεξοχές γειτονικών κυττάρων οργανώνονται σε προεξέχουσες «πτυχές» (ridges) οι οποίες έχουν πρισματικό σχήμα. Οι πλευρές έχουν ύψος περίπου 8  $\mu\text{m}$  και βρίσκονται σε κανονική διάταξη σχηματίζοντας γραμμώσεις καθώς βρίσκονται τοποθετημένες παράλληλα σε σταθερές αποστάσεις (Εικόνα 1.51). Έχει δειχθεί ότι η δομή αυτή προκαλεί σύγκλιση των προσπίπτουσων ακτίνων φωτός στη βάση των επιδερμικών κυττάρων όπου βρίσκονται συναθροισμένα τα πλαστίδια με τις χρωστικές, συντελώντας προς ένα εντονότερο χρώμα. Επιπλέον η ιδιαίτερη αυτή επιδερμική μορφολογία θεωρείται ότι συμβάλλει στην κατευθυνόμενη ανάκλαση του φωτός συντελώντας στη μεταξένια υφή (Wilts *et al.* 2018).



## 1.8 Μαύρος χρωματισμός σε άνθη

### 1.8.1 Φύση του μαύρου χρώματος στα φυτά με έμφαση στα άνθη

Στους υγιείς φυτικούς ιστούς, μαύρο χρώμα μπορεί να παρατηρηθεί σε σπέρματα, καρπούς, σπανιότερα άνθη και ακόμα πιο σπάνια σε φύλλα. Ωστόσο πραγματικά μαύρο χρώμα στα φυτά είναι πολύ σπάνιο και συχνά πρόκειται για κάποιο πολύ σκούρο καφέ ή πολύ σκούρο μωβ (Lee 2007). Καφέ χρωματισμός και συγκεκριμένα, σκούρος καφέ χρωματισμός που τείνει προς το μαύρο, προκύπτει συχνά από συνύπαρξη διαφορετικών χρωστικών που απορροφούν σε διαφορετικά μέρη του οπτικού φάσματος. Από αυτή την αλληλοεπικάλυψη, και σε εξάρτηση προς τη συγκέντρωσή τους, προκύπτει καφέ-μαύρος χρωματισμός. Σε μη ανθικούς ιστούς μπορεί να προκύψει επίσης καφέ-μαύρος χρωματισμός από μόρια με καφέ-μαύρο χρωματισμό. Αυτά τα μόρια έχουν προκύψει από την σύντηξη/πολυμερισμό μικρότερων μορίων, όπως συμβαίνει σε τραυματισμένους ιστούς, στους οποίους ο σκούρος χρωματισμός οφείλεται σε παράγωγα ταννινών (Lee 2007). Σκούρος μωβ προς μαύρος χρωματισμός μπορεί να εμφανιστεί σε φυτικούς ιστούς από υψηλή συγκέντρωση ταννινών ή ανθοκυανινών (Lee 2007).

Πραγματικά μαύρες χρωστικές σπανίζουν στα φυτά. Ένα σπάνιο είδος μαύρης χρωστικής που απαντάται στα φυτά σε περιορισμένο βαθμό είναι οι φυτομελανίνες (phytomelanins) (Davies 2004b, Kumar and Kumar 2013). Απαντώνται κυρίως ως μία στρώση (phytomelanin layer) που αναπτύσσεται σε σχιζογενείς μεσοκυττάριους χώρους προς το εξωτερικό του μεσοκαρπίου σε κάποιες ομάδες των Compositae, συνήθως ακριβώς κάτω από το επικάρπιο. Η ύπαρξη φυτομελανίνης έχει αναφερθεί και σε άλλες οικογένειες. Πρόκειται για ένα μαύρο, σκληρό και μη υδατοδιαλυτό στρώμα. Η χημική του σύσταση είναι άγνωστη και κατά διαστήματα έχει προταθεί ότι είναι πολύ πλούσιο σε άνθρακα, πολυβινυλική ακοόλη, ή κάποιο ρητινώδες, παρόμοιο με ταννίνες ή άμορφο υλικό. Όταν η στρώση είναι συνεχής φαίνεται να αποτρέπει τις μολύνσεις και να συμβάλλει στην επιβολή ληθάργου, ενώ όταν είναι ασυνεχής συμμετέχει στην ανταλλαγή νερού και αερίων μέσω των ασυνεχειών τής (Kumar and Kumar 2013). Πάντως δεν φαίνεται να έχει παρόμοια δομή με τις ζωικές μελανίνες (Davies 2004b).

Σπάνια μαύρος χρωματισμός μπορεί να εμφανιστεί και σε φύλλα. Η περίπτωση αυτή παρουσιάζει κάποιο ενδιαφέρον για τη συγκεκριμένη εργασία, γιατί τα πέταλα των ανθέων προέρχονται εξελικτικά από μεταμόρφωση φύλλων και ως εκ τούτου φέρουν αρκετές ομοιότητες στην ανατομία και ως έναν βαθμό στη βιοχημεία των χρωστικών τους. Ο μαύρος χρωματισμός φύλλων είναι σπάνιος στη φύση αν και απαντάται σε καλλιεργητικές ποικιλίες, όπως ποικιλίες από *Colocasia esculenta* και *Capsicum annuum*. Μαύρος φωτοσυνθετικός ιστός απαντάται σε βρυόφυτα, όπως τα *Cephalomitrium aterrimum*, *Isophyllaria murrayana* και *Marsupella alpina*, τα οποία αποτελούν συνήθως σπάνιες χρωματικές μορφές των πληθυσμών τους (Hatier and Gould 2007). Το μαύρο χρώμα των φύλλων και των καρπών του *Capsicum annuum* έχει αποδοθεί σε μεγάλες συγκεντρώσεις χλωροφυλλών, ανθοκυανινών και καροτενοειδών (Lightborn *et al.* 2008 όπως αναφέρεται από Hosaka *et al.* 2012). Το *Ophiopogon planiscapus* 'Nigrescens' αποτελεί το φυτό με τα πιο έντονα μαύρα φύλλα (Εικόνα 1.52), και άγριοι πληθυσμοί του αναπτύσσονται στην Ιαπωνία. Αποτελεί ένα ανθεκτικό και ηλιόφιλο φυτό. Συγκριτική μελέτη των μαύρων με

άλλους πράσινους πληθυσμούς του φυτού από τους Hatier and Gould (2007) κατέδειξε ότι οι δύο μορφές έχουν εν γένει ίδια ανατομία στα φύλλα τους. Ως προς τις χρωστικές, τα



**Εικόνα 1.52:** Τμήμα πράσινου και μαύρου φύλλου του *Ophiopogon planiscapus* 'Nigrescens'. Η εντυπωσιακή διαφορά στο χρώμα οφείλεται μόνο σε διαφορές απορρόφησης στην πράσινη περιοχή του ορατού φάσματος. Κλίμακα 5mm (εικόνα από Hatier et al. 2013).

επίπεδα καροτενοειδών είναι παρόμοια στις δύο περιπτώσεις, αλλά οι χλωροφύλλες έχουν σαφώς μεγαλύτερη συγκέντρωση στα μαύρα φύλλα, και αντίστοιχα οι ανθοκυανίνες στα μαύρα φύλλα αφθονούν ενώ στα πράσινα απουσιάζουν. Θεωρείται ότι το μαύρο χρώμα οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση ανθοκυανινών και χλωροφυλλών στο μεσόφυλλο (Πίνακας 1.2). Η απορρόφηση άθικτων μαύρων φύλλων του φυτού είναι πολύ υψηλή και σταθερή περίπου στο 95% για όλη την έκταση του ορατού φάσματος 400-700 nm. Η ουσιώδης διαφορά τους σε σχέση με τα αντίστοιχα πράσινα φύλλα αφορά στη διαπερατότητα του πράσινου φωτός (501-600 nm) του οποίου η διέλευση αναχαιτίζεται πολύ πιο έντονα και νωρίς κατά την πορεία του μέσα στα μαύρα φύλλα. Επιπλέον, δεν παρατηρούνται κωνικά επιδερμικά κύτταρα που να συγκεντρώνουν το φως και να αυξάνουν την απορρόφηση και δεν εντοπίστηκαν καθόλου μαύρες χρωστικές στους ιστούς (π.χ. φυτομελανίνες) (Hatier and Gould 2007). Η σύνθεση των ανθοκυανινών είναι εντονότερη σε άτομα που εκτίθενται σε φωτεινό καθεστώς με έντονη ακτινοβολία. Ως εκ τούτου έχουν διατυπωθεί διάφορες υποθέσεις για τους τρόπους με τους οποίους οι

ανθοκυανίνες μπορούν να συμβάλλουν, τουλάχιστον μερικώς, σε φωτοπροστασία (Hatier et al. 2013).

Η ομάδα των ανθικών χρωστικών που ευθύνεται για τον μωβ-μπλε χρωματισμό είναι οι ανθοκυανίνες (Glover 2014). Μεταξύ των μαύρων ανθικών ιστών (αν και όχι πέταλο ή τέπαλο) οι οποίοι έχουν μελετηθεί για την προέλευση του χρώματός τους περιλαμβάνεται η σπάθη (spathe) του φυτού *Zantedeschia hybrida* (Araceae). Η σπάθη αποτελεί χαρακτηριστική περιανθική δομή αυτής της οικογένειας και πρόκειται για ένα έγχρωμο μεταμορφωμένο φύλλο που περιβάλλει την ταξιανθία του σπάδικα. Οι Lei et al. (2017) διεξήγαγαν συγκριτική μελέτη για το χρώμα της σπάθης και την προέλευσή του σε πολλές ποικιλίες του φυτού, διάφορων χρωμάτων, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται και έξι μαύρες ποικιλίες ('Mirages', 'Jack', 'Chocolate', 'Cantor', 'Black Girl' και 'Prado'). Ανάλυση χρωστικών έδειξε ότι οι μαύρες ποικιλίες χαρακτηρίζονται από τις συγκριτικά υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικών ανθοκυανινών (485-1180 µg/g) ενώ η συγκέντρωση ολικών φλαβονών και φλαβονολών κυμαίνεται (7010-9600 µg/g). Δεν εντοπίστηκαν καροτενοειδή και ο δείκτης αλληλεπίδρασης με συγχρωστικές (copigmentation index - CI), δηλαδή ο λόγος ολικών φλαβονών και φλαβονολών προς ολικές ανθοκυανίνες είναι αρκετά υψηλός (8-15). Ως εκ τούτου υπάρχει έντονη ένδειξη για την ύπαρξη δράσης των φλαβονών και φλαβονολών ως συγχρωστικών. Οι ανθοκυανίνες αποτελούν όλες παράγωγα κυανιδίνης, και ανάλυση φλαβονοειδών στο 'Black Girl' έδειξε εννιά φλαβονοειδή (εκτός ανθοκυανινών), τα αφθονότερα από τα οποία είναι με διαφορά και κατά φθίνουσα σειρά η

επικατεχίνη (epicatechin), η καιμπφερόλη (kaempferol), η διυδροκαιμπφερόλη (dihydrokaempferol) και η κατεχίνη (catechin). Στις μαύρες ποικιλίες η χρωστική κατανέμεται και στις δύο επιδερμίδες και σε 2-3 στρώσεις υποεπιδερμικού ιστού του μεσόφυλλου, και εν γένει παρατηρήθηκε ότι όσο παχύτερη είναι η έγχρωμη ζώνη στη σπάθη, τόσο εντονότερο είναι το χρώμα. Στην ποικιλία 'Black Girl' (με την υψηλότερη συγκέντρωση ανθοκυανινών) θεωρείται ότι πιθανώς η βιοσύνθεση των ανθοκυανινών δρα ανταγωνιστικά εις βάρος της βιοσύνθεσης των φλαβονών. Ανακεφαλαιώνοντας, το μαύρο χρώμα στη *Zantedeschia* οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση ανθοκυανινών, σε πιθανή δράση συγχρωστικών (φλαβόνες και φλαβονόλες) και στις πολλές στρώσεις έγχρωμου ιστού (Πίνακας 1.2) (Lei *et al.* 2017).

Σχετικά με την προέλευση του μαύρου χρώματος σε πέταλα και τέπαλα έχουν μελετηθεί καλλιεργητικές ποικιλίες φυτών αλλά και άγριοι τύποι, αν και τα μαύρα άνθη στη φύση είναι εξαιρετικά σπάνια. Κάποιες μελέτες έχουν γίνει πάνω σε τουλίπες. Έχει αναφερθεί ότι μαύρος χρωματισμός μπορεί να παρατηρηθεί κάτω από συγκεκριμένο φωτισμό, όπως του κάτω μέρους των τεπάλων της *Tulipa julia* και η καλλιεργητική ποικιλία 'Queen of the Night' (Markham *et al.* 2004). Θεωρείται ότι σε ορισμένα άνθη ή περιοχές ανθέων από καλλιεργημένες ποικιλίες από τουλίπες το μαύρο χρώμα οφείλεται σε υψηλές συγκεντρώσεις ανθοκυανίνης και ειδικά παραγώγων δελφινιδίνης (Πίνακας 1.2) (Glover 2014). Σε μελέτη του χρώματος σε τουλίπες από πολλές καλλιεργητικές ποικιλίες, συμπεριλήφθηκαν και πέντε περιπτώσεις με μαύρα άνθη. Τα μέσα επίπεδα ανθοκυανινών τους ήταν 50% δελφινιδίνη, 29% κυανιδίνη και 21% πελαργονιδίνη. Για την τουλίπα 'Queen of the Night' ο κύριος γλυκοζίτης δελφινιδίνης ήταν η τουλιπανίνη (tulipanin), δηλαδή 3-γλυκοραμνοσίτης δελφινιδίνης (Shibata and Ishikura 1960 όπως αναφέρεται από Markham *et al.* 2004). Σε άλλες μελέτες για το μαύρο χρώμα ποικιλιών πανσέ, έχει προταθεί ότι η υπεύθυνη χρωστική είναι γλυκοζυλιωμένο παράγωγο δελφινιδίνης (ρ-κουμαροϋλτριγλυκοσίδης) στην ποικιλία *Viola* 'Jet Black' (Takeda and Hayashi 1965 όπως αναφέρεται από Markham *et al.*, 2004) και για ποικιλία μαύρου πανσέ *Viola tricolor* η υπεύθυνη χρωστική έχει ταυτοποιηθεί ως βιολανίνη, ένας ακόμα γλυκοζίτης δελφινιδίνης (Goto *et al.* 1978 όπως αναφέρεται από Markham *et al.* 2004). Άλλο παράδειγμα άνθους με πολύ σκούρο καφέ-μαύρο χρώμα είναι το *Gastrolobium melanopetalum* (Mlodzinska 2009).

Το φυτό *Lisianthus nigrescens* είναι ιδιαίτερο γιατί φέρει μαύρα άνθη (Εικόνα 1.53) παρόλο



**Εικόνα 1.53: Μαύρα άνθη του *Lisianthus nigrescens*.** Αποτελεί αυτοφυές φυτό και έχει χαρακτηριστεί ως το πιο μαύρο άνθος (εικόνα από Mlodzinska 2009).

που αποτελεί ένα άγριο είδος που φύεται στην περιοχή του Μεξικού. Σε μελέτη από τους Markham *et al.* (2004) με οπτικές και χρωματογραφικές τεχνικές στα πέταλα του φυτού, τα μόνα στοιχεία που εμφάνιζαν απορρόφηση προσδιορίστηκαν ως τρεις κύριες και τρεις δευτερεύουσες φλαβόνες, μία κύρια και μία δευτερεύουσα ανθοκυανίνη, και καμία άλλη χρωστική. Εικάζεται ότι στο τελικό χρωματικό αποτέλεσμα συνεισφέρουν και οι άχρωμες φλαβόνες ως συγχρωστικές. Οι δύο ανθοκυανίνες

που εντοπίστηκαν αναγνωρίστηκαν ως γλυκοζίτες δελφινιδίνης και τα μέγιστα απορρόφησης καταδεικνύουν ότι η κύρια μόνο ανθοκυανίνη είναι γλυκοζυλιωμένη στο 3-



υδροξύλιο. Γλυκοζίτες επίσης αποδείχθηκαν και όλες οι φλαβόνες, και συγκεκριμένα βασισμένες στην απιγενίνη (apigenin) και στη λουτεολίνη (luteolin). Υπολογίστηκε ότι οι ολικές ανθοκυανίνες αποτελούν το 24% της ξηρής βιομάζας (dry weight) των πετάλων, γεγονός που υποδεικνύει πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση ανθοκυανινών σε σχέση με αντίστοιχο υδατικό διάλυμα χυμοτοπιακού pH. Εικάζεται ότι σε αυτό συμβάλλουν πρωτεΐνες προσδεόμενες στις ανθοκυανίνες που επιτρέπουν την αύξηση της συγκέντρωσής τους. Το μαύρο χρώμα του άνθους εικάζεται ότι οφείλεται στην πολύ υψηλή συγκέντρωση των ανθοκυανινών και στην αλληλεπίδρασή τους με C-γλυκοζίτες φλαβονών (Πίνακας 1.2).



**Εικόνα 1.54: Μαύρα άνθη του *Alcea rosea* 'Nigra'.** Το μαύρο χρώμα του οφείλεται πιθανώς μόνο σε επικάλυψη φασμάτων απορρόφησης και υψηλές συγκεντρώσεις ανθοκυανινών και όχι σε φαινόμενο σύγχρωσης (εικόνα από Hosaka et al. 2012).

4'-Ο-γλυκοζίτης φλαβονόλης (λουτεολίνης). Επιπλέον εντοπίστηκαν μικρές ποσότητες χλωροφύλλης και καροτενοειδών αλλά δεν φαίνεται να επηρεάζουν το χρώμα. Το pH του κυτταρικού χυμού μετρήθηκε 4,5. Εικάζεται ότι το χρώμα των πετάλων στο συγκεκριμένο φυτό οφείλεται στην συνύπαρξη πολλών ειδών ανθοκυανίνης σε μεγάλη συγκέντρωση, το καθένα από τα οποία έχει ελαφρώς μετατοπισμένα μέγιστα απορρόφησης, και όχι σε συγχρωστικές. Το αποτέλεσμα είναι η απορρόφηση να εκτείνεται σε όλο το ορατό φάσμα (Πίνακας 1.2) (Hosaka et al. 2012).

Άλλη περίπτωση μαύρου άνθους που έχει μελετηθεί είναι μαύρες καλλιεργητικές ποικιλίες ντάλιας (*Dahlia variabilis*), με όπως οι ποικιλίες 'Black Barbara', 'Arabian Night', 'Auroras Kiss', 'Black Jack', 'Chat Noir', 'Charles de Gaule', 'Karma Choc' 'Kenora Macop B' (Εικόνα 1.55), 'Magic Night',

Επίσης εικάζεται ότι το είδος αυτό ακολουθεί μια πολύ ιδιαίτερη τακτική επικοινωνίας (Markham et al. 2004).

Στα μαύρα πέταλα των ανθέων του φυτού *Alcea rosea* 'Nigra' (Εικόνα 1.54) οι ανθικές χρωστικές απομονώθηκαν και προσδιορίστηκαν με χρωματογραφικές και φασματοφωτομετρικές τεχνικές, σε μελέτη από τους Hosaka et al. (2012). Εντοπίστηκαν εννέα ανθοκυανίνες οι οποίες ευθύνονται για το σκούρο μωβ-μαύρο χρώμα των πετάλων. Ποσοτικά υπερτερούν τα παράγωγα δελφινιδίνης (35,2%), μαλβιδίνης (26,7%) και πετουινιδίνης (20,6%) ενώ ανιχνεύθηκαν και μικρότερες ποσότητες παράγωγου κυανιδίνης (2,7%). Όλες οι ανθοκυανίνες είναι Ο-γλυκοζυλιωμένες με γλυκόζη, ραμνοσυγλυκόζη (ramnosylglucose) ή ρουτινόζη (rutinose) στην 3<sup>η</sup> θέση. Ανιχνεύθηκαν επιπλέον τρία Ο-γλυκοζυλιωμένα

παράγωγα φλαβονών (μυρικετίνης και καιμπφερόλης) και ένας

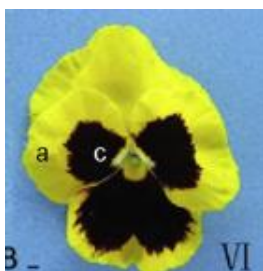
4'-Ο-γλυκοζίτης φλαβονόλης (λουτεολίνης). Επιπλέον



**Εικόνα 1.55: Άνθος μαύρης ντάλιας 'Kenora Macop B'.** Διακρίνεται ότι μόνο τα νεότερα πέταλα είναι μαύρα-μωβ, ενώ τα γηραιότερα είναι κόκκινα. Αυτό αποτελεί ένα παράδειγμα που το χρώμα (και επομένως οι χρωστικές) του άνθους δεν είναι χρονικά σταθερό, αλλά μπορεί να μεταβάλλεται κατά την ωρίμασή του (εικόνα από Thill et al. 2012).

‘Meteor’, ‘Nathal’, ‘Negerkopf’, ‘Stefanie Hertel’ και ‘Tisa’. Στα άνθη αυτά τα νεότερα πέταλα έχουν μαύρο χρώμα ενώ τα γηραιότερα τείνουν περισσότερο προς το σκούρο κόκκινο (Εικόνα 1.55). Σε μελέτη από τους Thill *et al.* (2012), στα πέταλα των συγκεκριμένων ποικιλιών εντοπίστηκαν υψηλές συγκεντρώσεις ανθοκυανίνης από 7 έως 32  $\mu\text{mol/g}$  νωπού ιστού. Οι ανθοκυανίνες που βρέθηκαν βασίζονται στην κυανιδίνη και την πελαργονιδίνη. Το ποσοστό της κυανιδίνης σε σχέση με τις ολικές ανθοκυανίνες ποικίλλει από 9% έως 80% ανάλογα με την ποικιλία, αν και στις περισσότερες περιπτώσεις είναι πάνω από 50%. Επομένως το χρώμα οφείλεται περισσότερο στην ποσότητα παρά στην ακριβή σύσταση του συνόλου των ανθοκυανινών (Πίνακας 1.2). Επίσης στις μαύρες ποικιλίες βρέθηκαν μικρότερες συγκεντρώσεις φλαβονών σε σύγκριση με ποικιλίες άλλων χρωμάτων. Αυτό στη συντριπτική τους πλειονότητα συνοδεύεται με μειωμένη έκφραση και ενεργότητα του ενζύμου που προκαλεί τη μετατροπή των φλαβανονών (flavanones) σε φλαβόνες (συνθάση της φλαβόνης II - FNS II), με αποτέλεσμα μεγαλύτερη ποσότητα φλαβανονών να διοχετεύεται προς την οδό σύνθεσης ανθοκυανίνης. Το χρωματικό αποτέλεσμα των ανθοκυανινών φαίνεται να ενισχύεται μέσω αλληλεπίδρασης των μορίων ανθοκυανίνης με τις φλαβόνες και φλαβονόλες (συγχρωστικές) που υπάρχουν στον ιστό (Πίνακας 1.2) (Thill *et al.* 2012).

Σύμφωνα με άλλη μελέτη, οι καλλιεργητικές ποικιλίες μαύρης ντάλιας (*Dahlia variabilis*) χαρακτηρίζονται, σε σχέση με τις άλλες ποικιλίες, από μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών ανθοκυανινών, μεγαλύτερη αναλογία ανθοκυανινών κυανιδίνης και μικρότερη



**Εικόνα 1.56:** Άνθος πανσέ *Viola x wittrockiana* ‘Mengdie’. Διακρίνονται τα δίχρωμα πέταλα τα οποία είναι σκούρα προς το εσωτερικό και κίτρινα προς την περιφέρεια. Αυτό αποτελεί ένα παράδειγμα που το χρώμα (και επομένως οι χρωστικές) του άνθους δεν είναι χωρικά σταθερό, αλλά μπορεί να μεταβάλλεται κατά τις διάφορες περιοχές του πετάλου (εικόνα από Li *et al.* 2014).

συγκέντρωση φλαβονών. Επιπλέον σε ορισμένες περιπτώσεις θεωρείται πιθανή η σύγχρωση ανάμεσα σε ανθοκυανίνες και φλαβόνες (Degushi *et al.* 2013 όπως αναφέρεται από Degushi *et al.* 2016). Από συγκριτική χρωματογραφική ανάλυση χρωστικών σε τέσσερις μαύρες ποικιλίες ντάλιας (‘Black Cat’, ‘Fidalgo Blacky’, ‘Kokuchō’ και ‘Ms. Noir’) αλλά και σε ποικιλίες άλλων χρωμάτων, από τους Degushi *et al.* (2016), προέκυψε ότι δεν υπάρχει κάποια κύρια χρωστική (ανθοκυανίνη) αποκλειστικά για τις μαύρες ποικιλίες. Αντιθέτως βρέθηκαν τέσσερις επικρατούσες χρωστικές, οι οποίες αντιστοιχούν σε δύο γλυκοζίτες κυανιδίνης και δύο γλυκοζίτες πελαργονιδίνης. Στις μαύρες ποικιλίες μετρήθηκαν υψηλά ποσά συγκέντρωσης ολικών ανθοκυανινών (2,3-3,4  $\text{mg}$  ανά 100  $\text{mg}$  νωπής μάζας), ενώ η σχετική αναλογία των ανθοκυανινών κυανιδίνης εμφανίζει διακύμανση μεταξύ των μαύρων ποικιλιών. Εικάζεται ότι η αυξημένη ολική ποσότητα των ανθοκυανινών και οι σχετικές αναλογίες μεταξύ τους ευθύνονται για το μαύρο χρώμα αν και δεν έχουν εξαχθεί πλήρως σαφή συμπεράσματα (Πίνακας 1.2). Έντονη σημασία φαίνεται να έχει το pH και στις ποικιλίες που μελετήθηκαν δεν βρέθηκαν χυμοτοπιακά έγκλειστα ανθοκυανίνης. Ωστόσο με γονιδιακή κατασίγαση πιθανώς συγκροτούνται χυμοτοπιακά έγκλειστα ανθοκυανίνης και προκαλείται ένα μαύρο διαφορετικού είδους, με μεταλλική υφή

(Degushi *et al.* 2016).

Ένα ακόμα άνθος που έχει μελετηθεί ως προς το χρώμα του είναι ο πανσές της καλλιεργητικής ποικιλίας *Viola x wittrockiana* 'Mengdie' (Εικόνα 1.56). Στο άνθος αυτό τα πέταλα είναι δίχρωμα, με την περιφέρειά τους να είναι κίτρινη και το εσωτερικό τους πολύ σκουρόχρωμο (Εικόνα 1.56), αν και στη συγκεκριμένη μελέτη από τους Li *et al.* (2014) δεν χαρακτηρίζεται ως μαύρο. Οι χρωστικές της σκούρας περιοχής συγκεντρώνονται στην άνω επιδερμίδα. Η επιδερμίδα δεν εμφανίζει έντονη διαφοροποίηση μεταξύ των δύο περιοχών (σκούρα και κίτρινη) και αποτελείται από κωνικά κύτταρα στην άνω επιδερμίδα, και αποστρογγυλεμένα στην κάτω. Η σκούρα περιοχή φέρει ανθοκυανίνες με μέγιστη συγκέντρωση έως 7,37 mg/g σύστασης κατά 83% βασισμένες σε κυανιδίνη και 17% βασισμένες σε δελφινιδίνη. Οι ανθοκυανίνες συσσωρεύονται σταδιακά μέχρι το πλήρες άνοιγμα των πετάλων, και κατά το τέλος της άνθισης αποικοδομούνται. Στην κίτρινη περιοχή δεν εντοπίστηκαν ανθοκυανίνες (Πίνακας 1.2) (Li *et al.* 2014).

Πίνακας 1.2: Σύνοψη παραγόντων που συμβάλλουν στο μαύρο χρώμα σε διάφορα άνθη			
Φυτό	Κύριες χρωστικές υπεύθυνες για το μαύρο χρώμα	Στοιχεία που συμβάλλουν στο χρώμα	Βιβλιογραφική Αναφορά
<i>Ophiorogon planiscapus</i> 'Nigrescens' (φύλλα)	Χλωροφύλλες, ανθοκυανίνες	Υψηλή συγκέντρωση χλωροφυλλών και ανθοκυανινών	Hatier and Gould 2007
<i>Zantedeschia hybrid</i>	Παράγωγα κυανιδίνης	Υψηλή συγκέντρωση ανθοκυανινών, συγχρωστικές, πάχος ιστού	Lei <i>et al.</i> 2017
Ποικιλίες μαύρης τουλίπας	Παράγωγα δελφινιδίνης (κυρίως), κυανιδίνης, πελαργονιδίνης	-	Shibata and Ishikura 1960 όπως αναφέρεται από Markham <i>et al.</i> 2004
Τουλίπα 'Queen of the Night'	Παράγωγο δελφινιδίνης	-	Shibata and Ishikura 1960 όπως αναφέρεται από Markham <i>et al.</i> 2004
<i>Viola</i> 'Jet Black'	Παράγωγο δελφινιδίνης	-	Takeda and Hayashi 1965 όπως αναφέρεται από Markham <i>et al.</i> 2004
<i>Viola tricolor</i>	Παράγωγο δελφινιδίνης	-	Goto <i>et al.</i> 1978 όπως αναφέρεται από Markham <i>et al.</i> 2004
<i>Lisianthus nigrescens</i>	Παράγωγα δελφινιδίνης	Πολύ υψηλή συγκέντρωση ανθοκυανινών, συγχρωστικές, πιθανή αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες	Markham <i>et al.</i> 2014
<i>Alcea rosea</i> 'Nigra'	Παράγωγα δελφινιδίνης (κυρίως), μαλβιδίνης, πετουινιδίνης	Υψηλή συγκέντρωση ανθοκυανινών, επικάλυψη φασμάτων	Hosaka <i>et al.</i> 2012
<i>Dahlia variabilis</i>	Παράγωγα κυανιδίνης (συνήθως επικρατούν), πελαργονιδίνης	Υψηλή συγκέντρωση ανθοκυανινών, συγχρωστικές	Thill <i>et al.</i> 2012, Degushi <i>et al.</i> 2016



<b><i>Viola x wittrockiana</i></b> <b>'Mengdie'</b>	Παράγωγα κυανιδίνης (κυρίως), δελφινιδίνης	Υψηλή συγκέντρωση ανθοκυανινών, κωνικά επιθηλιακά κύτταρα	Li et al. 2014
--	--	---	----------------

### 1.8.2 Ποικιλότητα των μαύρων ανθέων

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως τα μαύρα άνθη είναι σπάνια στη φύση, αλλά πιο συχνά ως ανθρωπογενείς καλλιεργητικές ποικιλίες. Στη φύση συναντώνται τα μαύρα άνθη του



**Εικόνα 1.57: Μαύρη πετούνια 'Black Velvet'.** Η ποικιλία αυτή προέκυψε αποκλειστικά από επιλεκτικές διασταύρωσεις χωρίς γενετική μηχανική (εικόνα από <https://www.dailymail.co.uk/sciencetech/article-1332642/Black-colour-Scientists-create-black-petunia->

*Lisianthus nigrescens* στην Κεντρική Αμερική και *Gastrolobium melanopetalum* στην Αυστραλία. Επιπλέον υπάρχουν μαύρες καλλιεργητικές ποικιλίες αλτέας *Alcea rosea* 'Nigra', τουλίπας *Tulipa* 'Queen of the Night', διάφορες καλλιεργητικές ποικιλίες κάλλας *Zantedeschia hybrida*, διάφορες καλλιεργητικές ποικιλίες ντάλιας *Dahlia variabilis*, και διάφορες καλλιεργητικές ποικιλίες πανσέ *Viola*, όπως αναφέρθηκαν προηγουμένως. Μετά από σχετική αναζήτηση στο διαδίκτυο, και ιδιαίτερα σε ιστότοπους πώλησης σπόρων βρέθηκαν και κάποιες ακόμα

περιπτώσεις καλλιεργητικών ποικιλιών.

Συγκεκριμένα για τον πανσέ (*Viola*) εκτός από την ποικιλία 'Jet Black', εντοπίστηκαν οι ποικιλίες



**Εικόνα 1.59: Άνθος του *Iris tuberosa*.** Διακρίνονται οι μαύρες άκρες των τεπέλων (εικόνα του Γιώργου Κοφινά από <https://www.greekflora.gr/el/flowers/0303/Iris-tuberosa>).

'Black moon', 'Black King', 'Black Magic' 'Black Knight', 'Black Accord', 'Black Devil', 'Bowles Black', 'Black Star'. Υπάρχουν οι βαθυκόκκινες-μαύρες ποικιλίες τριαντάφυλλου (*Rosa*) 'True Blood', 'Black Baccara' και 'Black Beauty'. Οι ποικιλίες λίλιουμ (*Lilium*) 'Black Charm' φέρει μαύρα άνθη και η ποικιλία 'Mariposa' βαθυκόκκινα-μαύρα άνθη. Χαρακτηριστικές είναι και οι μαύρες ποικιλίες πετούνιας και σερφίνιας (*Petunia*) όπως 'Black cherry', 'Black Mamba',



**Εικόνα 1.58: Ταξιανθία του *Dracunculus vulgaris*.** Διακρίνεται η βαθυκόκκινη σπάθη και ο μαύρος σπάδικας (εικόνα του Νίκου Νικητίδη από <https://www.greekflora.gr/el/flowers/0239/Dracunculus-vulgaris>).

'Black Velvet' (Εικόνα 1.57), 'Black Cat', 'Black Magic', 'Back to black' και η δίχρωμες 'Phantom' και 'Pinstripe'. Κάποιες από αυτές τις ποικιλίες είναι αρκετά καινούργιες, όπως η ποικιλία

'Black Velvet' η οποία μάλιστα έχει προκύψει μόνο από παραδοσιακές μεθόδους

επιλεκτικές διασταύρωσης ανάμεσα σε ήδη υπάρχουσες ποικιλίες, χωρίς παρεμβάσεις γενετικής μηχανικής (Εικόνα 1.57) (Daily Mail reporter 2010).

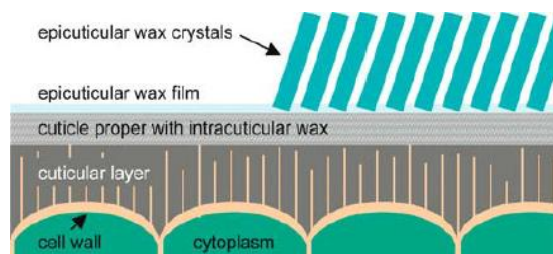
Στην άγρια Ελληνική χλωρίδα δεν συναντώνται μαύρα άνθη. Συναντώνται όμως άνθη με μαύρες, βαθυκόκκινες-μαύρες ή καφέ-μαύρες περιοχές. Ένα από αυτά τα άνθη είναι η παπαρούνα *Papaver rhoeas* που φέρει μαύρα πέταλα με μαύρη κηλίδα στη βάση τους, η οποία αποτελεί και το αντικείμενο του ερευνητικού τμήματος αυτής της εργασίας. Με βάση μια έρευνα στο φωτογραφικό υλικό του ιστότοπου <https://www.greekflora.gr/> εντοπίστηκαν ελληνικά φυτά τα οποία φέρουν άνθη με μαύρες ή πολύ σκούρες περιοχές. Από όσα βρέθηκαν ξεχωρίζουν το *Dracunculus vulgaris* (δρακοντιά ή φιδόχορτο) και το *Iris tuberosa* πρώην *Hermodactylus tuberosus* (ερμοδάκτυλος). Το *Dracunculus vulgaris* (Araceae) φέρει ταξιανθία τύπου σπάδικα με το χρώμα της σπάθης να είναι βαθυκόκκινο και το χρώμα του σπάδικα μαύρο-βαθυκόκκινο (Εικόνα 1.58). Το *Iris tuberosa* φέρει λευκοπράσινο άνθος αλλά τα εξωτερικά του τέπαλα κάμπτονται και η πάνω τους επιφάνεια έχει μια βελούδινη μαύρη όψη (Εικόνα 1.59). Κάποια ακόμη ελληνικά άνθη με μαύρες περιοχές είναι τα *Arum nigrum*, *A. elongatum*, *A. dioscoridis*, *Biarum tenuifolium idomenaeum*, *B. rhopalospadix* (Araceae), *Aristolochia cretica*, *A. incisae*, *A. hirta*, *A. guhardii* (Aristolochiaceae), *Glaucium corniculatum*, *Papaver hybridum*, *P. lecoqii*, *P. nigrotinctum*, *P. somniferum subsp. segiterum* (Papaveraceae), *Ophrys ferrum-equinum*, *O. spuneri*, *O. sphegodes cretensis*, *O. reinholdii reinholdii*, *O. omegaifera*, *O. candida* και *O. cretica ariadnea* (Orchideaceae).

## 1.9 Στοιχεία βιολογίας της εφυμενίδας

### 1.9.1 Βασική δομή και βιοχημεία της εφυμενίδας

Η εφυμενίδα (cuticle) αποτελεί ένα λιπόφιλο στρώμα που περιβάλλει εξωτερικά την επιδερμίδα όλων των υπέργειων οργάνων των αγγειωδών φυτών, και σε μερικές περιπτώσεις των βρούφυτων. Στα ανώτερα φυτά με εφυμενίδα περιβάλλεται η επιδερμίδα των φύλλων, των ανθέων, των καρπών, των βλαστών (όχι όμως αυτών που έχουν υποστεί δευτερογενή ανάπτυξη), αλλά όχι της ρίζας. Η εφυμενίδα αποτελεί ένα συνεχές στρώμα στην επιφάνεια των υπέργειων τμημάτων του φυτού, η οποία διακόπτεται από τους στοματικούς πόρους. Στα φύλλα περιβάλλει την άνω και κάτω επιφάνεια, εισέρχεται από την περιφέρεια του στοματικού πόρου, καλύπτει συχνά τις ελεύθερες επιφάνειες της υποστοματικής κοιλότητας (substomatal cavity), αλλά συνήθως δεν εκτείνεται στο μεσόφυλλο. Λόγω της υψηλής υδροφοβικότητας της επιδερμίδας, δύο βασικές ιδιότητές της είναι ο περιορισμός των απωλειών νερού λόγω εξάτμισης και η απομάκρυνση του εξωτερικού από την επιφάνεια. Τραχύτητα σε μικροσκοπική κλίμακα εντείνει την υδροφοβικότητα σε σημείο που οι σταγόνες νερού στην επιφάνεια μπορεί να έχουν σχεδόν απόλυτα σφαιρικό σχήμα. Ιδιαίτερη σημασία έχει η εφυμενίδα και στις βιοτικές σχέσεις του οργανισμού με μικροοργανισμούς και ασπόνδυλα (ανασκοπήσεις από Müller and Riederer 2005 και Jeffree, 2006).

Η χημική σύσταση της εφυμενίδας είναι σύνθετη και ποικίλη. Αποτελεί ένα σύνθετο λιπόφιλο μίγμα με κύριο συστατικό την υμενίνη (cutin), η οποία είναι ένα πολυμερές τύπου



**Εικόνα 1.60: Σχηματική απεικόνιση της δομής της εφυμενίδας.** Διακρίνεται η δίστρωμη δομή της εφυμενίδας, με το εσωτερικό στρώμα να περιέχει στοιχεία του κυτταρικού τοιχώματος. Εξωτερικά περιβάλλεται από κάλυμμα επιεφυμενιδιακών κηρών σε μορφή υμενίου και μορφή κρυστάλλων (εικόνα από Riederer 2005).

πολυεστέρα. Αποτελείται από λιπαρά οξέα που προκύπτουν από τροποποίηση κοινών κορεσμένων  $C_{16}$  και ακόρεστων  $C_{18}$  λιπαρών οξέων, τα οποία συνδέονται – συνήθως – με εστερικούς δεσμούς. Η σύσταση και η ποσότητα της υμενίνης ποικίλλει ανά είδος, ανά όργανο και ανά οντογενετικό όργανο. Στο λιπόφιλο κλάσμα της υμενίνης περιλαμβάνονται υμενιακοί κηροί (cuticular waxes) (Εικόνα 1.60) οι οποίοι είναι στέρες λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας με αλκοόλες μακράς αλυσίδας. Στην εφυμενίδα περιλαμβάνονται επίσης ποσότητες από

αλειφατικές ενώσεις όπως αλκάνια, αλκοόλες, λιπαρά οξέα, αλδεΐδες, κετόνες, δικετόνες, εστέρες, όλα με πολλά άτομα άνθρακα. Επιπλέον μπορεί να περιλαμβάνονται κυκλικές οργανικές ενώσεις παράγωγα βενζοϊκών οξέων, πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος, φλαβονοειδή και γλυκοζίτες φλαβονοειδών (ανασκοπήσεις από Müller and Riederer 2005 και Jeffree 2006).

Η εφυμενίδα εμφανίζει δίστρωμη δομή, και τα δύο στρώματα (Εικόνα 1.60) μπορεί να διαφέρουν ως προς τη χημική σύσταση, τη λεπτή δομή και την οντογένεση. Ως προς τη λεπτή δομή τα στρώματα μπορεί να έχουν άμορφη εμφάνιση, μορφή δικτύου (reticulate) ή

μορφή παράλληλων ελασμάτων (lamellate). Η εφυμενίδα αρχίζει να εμφανίζεται νωρίς στην οντογένεση της επιδερμίδας. Το εξωτερικό στρώμα συντίθεται πρώτο από τα επιδερμικά κύτταρα και αποτελείται από υμενίνη, με ενδοϋμενιακούς κηρούς



**Εικόνα 1.61: Ποικιλομορφία στη διάταξη των ποικίσεων σε πέταλα ανθέων.** Διακρίνονται φυγόκεντροι ποικίσεις σε κωνικά κύτταρα στο *Matricaria chamomilla* (άνω), κάθετες ποικίσεις σε επίπεδα κύτταρα στο *Bellis perennis* (μέσον) και διαμήκεις ποικίσεις στο *Hibiscus trionum*. Κλίμακα 20  $\mu\text{m}$  (εικόνα από van der Kooi et al. 2014).

(intracuticular waxes) (Εικόνα 1.60). Σε μερικές περιπτώσεις αποτελείται εν μέρει από υμενίνη χωρίς εστερικούς δεσμούς προσφέροντας προστασία απέναντι σε εστεράσες μυκήτων. Το εσωτερικό στρώμα προκύπτει στη συνέχεια από προσρόφηση στοιχείων του κυτταρικού τοιχώματος από την υμενίνη, και επομένως περιέχει ποσότητες από πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος (Εικόνα 1.60). Εξωτερικά η υμενίνη μπορεί να καλύπτεται από επιεφυμενιακούς κηρούς (Εικόνα 1.60) (epicuticular waxes) οι οποίοι μπορεί να έχουν μορφή υμενίου (film) ή κρυστάλλων. Αναλυτικότερα μπορεί να έχουν μορφή κόκκων (grains), ραβδίων (rods), νηματίων (filaments), πλακιδίων (plates), λεπιών (scales), υμενίου (film), καλύμματος (crust) ή και υγρή (fluid) μορφή. Η παρουσία εφυμενιακών κηρών ευθύνεται για χαρακτηριστικές εικόνες της επιδερμίδας στο μικροσκόπιο. Η δομή και η σύσταση της εφυμενίδας εξαρτάται από πολλούς εξωγενείς (εποχικότητα, θερμοκρασία, διάβρωση, φως, ατμοσφαιρική ρύπανση) και ενδογενείς (οντογενετικό στάδιο, εξειδίκευση ανά όργανο, εξειδίκευση στη θέση μέσα στο όργανο) παράγοντες (ανασκοπήσεις από Müller and Riederer 2005 και Jeffree, 2006).

### 1.9.2 Εφυμενιδιακές ποικίσεις

Η μορφολογία της επιφάνειας της εφυμενίδας έχει ιδιαίτερα σημασία για τις οπτικές ιδιότητες των φυτών, μεταξύ των οποίων το δομικό χρώμα σε πέταλα. Δομικό χρώμα μπορεί να εμφανιστεί σε πέταλα ανθέων από κανονικές ή ημι-κανονικές ποικίσεις στην επιφάνεια της εφυμενίδας τους. Ανεξάρτητα από την παραγωγή δομικού χρώματος, τέτοιου τύπου ποικίσεις μπορούν να συμβούν κατά φυγόκεντρο διεύθυνση σε κωνικά κύτταρα και σε επιμήκη κύτταρα σε διαμήκη ή εγκάρσια διεύθυνση (Εικόνα 1.61) (van der Kooi et al. 2014). Σε ανάλυση ανθέων 50 ειδών από 17 οικογένειες για ποικίσεις με μορφή γραμμώσεων (ridges) από τους van der Kooi et al.

(2014) βρέθηκε ότι το 9% των επιδερμικών κυττάρων ήταν κωνικά με ακανόνιστες ποικίσεις, το 8% κωνικά με κανονικές, το 17% επίπεδα με ακανόνιστες και το 25% επίπεδα με κανονικές (20% διαμήκεις και 5% κάθετες) και η απόσταση στις κανονικές ποικίσεις ποίκιλε από 0,9 έως 3,0  $\mu\text{m}$ . Στις υπόλοιπες περιπτώσεις τα άνθη έφεραν λεία εφυμενίδα.



Σε όλες τις περιπτώσεις η περιοδικότητα ποίκιλλε μέσα στο ίδιο πέταλο (van der Kooij *et al.* 2014). Οι ποικίλλεις της εφυμενίδας ή/και οι επιφανειακές νανοδομές του πετάλου μπορεί να διαφέρουν ανάμεσα στην άνω και κάτω επιφάνεια του πετάλου ή μεταξύ διαφορετικών περιοχών του πετάλου (π.χ. βάση – άκρο πετάλου, ή πάνω από τον αγωγό ιστό). Ως ενδεικτικές περιπτώσεις αναφέρονται τα άνθη των φυτών *Capparis spinosa* (Chimona *et al.* 2012), *Asphodelus ramosus* (Chimona *et al.* 2018) *Oxalis pre-caprae* (Argiropoulos and Rhizorouliou 2012a) και *Chaenomeles japonica* (Argiropoulos *et al.* 2017).

Έχουν διατυπωθεί υποθέσεις σχετικά με τη δημιουργία των ποικίλλσεων. Ενδεχομένως να αποτελούν παραπροϊόν (by-product) της κυτταρικής επιμήκυνσης. Τα εφυμενιδιακά στοιχεία πιθανόν εκκρίνονται και αυτοσυγκροτούνται στην επιφάνεια κατά την επιμήκυνση του κυττάρου, και οι μηχανικές πιέσεις να προκαλούν τις ποικίλλσεις. Ωστόσο αυτή η υπόθεση δεν είναι πλήρως ικανοποιητική γιατί αυτές μπορεί να εμφανίζονται μετά την ολοκλήρωση της κυτταρικής επιμήκυνσης ή να εμφανίζονται κάθετα στον άξονα επιμήκυνσης του κυττάρου. Επομένως φαίνεται ότι σε κάποιον βαθμό τουλάχιστον υπάρχει χρονικός και χωρικός έλεγχος των εναποθέσεων από το κύτταρο, μέσω της τοπικά ελεγχόμενης έκκρισης υλικού από την πλασματική μεμβράνη. Ένα τέτοιο σύστημα πιθανώς αλληλεπιδρά με τις μηχανικές πιέσεις για τον σχηματισμό τους (Glover *et al.* 2012, Antonίου Kourouniotti *et al.* 2013). Έχει αναπτυχθεί ένα βιο-μηχανικό (biomechanical) μοντέλο με μαθηματική έκφραση από τους Antonίου Kourouniotti *et al.* (2013) το οποίο περιγράφει με ορισμένες παραδοχές τον σχηματισμό των ποικίλλσεων ως αποτέλεσμα βιο-μηχανικών πιέσεων στο στρώμα της εφυμενίδας. Το μοντέλο βασίζεται στο ισοζύγιο ανάμεσα στο τάχος (rate) επιμήκυνσης του κυττάρου και το τάχος παραγωγής εφυμενίδας. Σύμφωνα με το μοντέλο δυνάμεις συμπίεσης προκαλούν ποικίλλσεις, ενώ δυνάμεις έκτασης τις εξομαλύνουν. Το μοντέλο αρχικά κατασκευάστηκε για να ερμηνεύσει επίπεδα κύτταρα λεία, με κανονικές ή ακανόνιστες ποικίλλσεις, και με τροποποιήσεις επεκτείνεται στις αντίστοιχες μορφολογίες των κωνικών κυττάρων. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό έντονα κανονικές ποικίλλσεις μεγάλης έκτασης προκύπτουν από δυνάμεις συμπίεσης στον άξονα κάθετα στις ποικίλλσεις και τάση στον άξονα παράλληλα. Ακανόνιστες αντιστοιχούν σε συμπίεση και στους δύο άξονες και λεία εφυμενίδα πιθανώς υποδηλώνει τάση και στους δύο άξονες. Η πίεση μπορεί να προκύπτει από το ισοζύγιο μεταξύ κυτταρικής αύξησης και εναπόθεσης εφυμενίδας. Το διάστημα των ποικίλλσεων πιθανώς προκύπτει από το πάχος της εφυμενίδας. Τα άνθη με εγκάρσιες ποικίλλσεις υποβάλλονται σύμφωνα με το μοντέλο σε πίεση στον εγκάρσιο άξονα. Αυτό ίσως συμβαίνει αν η εναπόθεση της εφυμενίδας γίνει σε μια πιο ύστερη φάση αύξησης, όταν συμβαίνει πλευρική αύξηση (Antonίου Kourouniotti *et al.* 2013).

## 1.10 Στοιχεία βιολογίας του *Paraver rhoeas* L.

### 1.10.1 Συστηματική, Γεωγραφική κατανομή & Φυλογένεση

Το είδος *Paraver rhoeas* (Εικόνα 1.63) (Μήκων η ροιάς - στα αγγλικά corn poppy) καλείται κοινώς παπαρούνα ή κουτσουνάδα στην Κρήτη ή πετεινός, κουτσοπετεινός και τσάκρα στην Κύπρο (Καββάδας 1963). Ανήκει στο γένος *Paraver*, στην οικογένεια Papaveraceae. Η



**Εικόνα 1.62:** Άνθη *Paraver rhoeas* και *Chrysanthemum coronarium*. Αυτά τα άνθη της Ελληνικής χλωρίδας είναι κοινά και συχνά απαντώνται μαζί. Ζωγραφική απεικόνιση από τον Γιώργο Σφήκα (εικόνα από Sfikas 1984).

οικογένεια Papaveraceae έχει ενταχθεί στην τάξη Ranunculales μετά από εκτεταμένη χρήση χημειοταξινομικών χαρακτήρων. Το γένος *Paraver* ανήκει στην υποοικογένεια Papaveroideae. Το γένος *Paraver* εμφανίζει μεγάλη βοτανική και φυτοχημική ποικιλότητα και για αυτόν τον λόγο χωρίζεται σε τομείς (sections). Το *Paraver rhoeas* κατατάσσεται στον τομέα *Rhoeadium* (Mihalik 1999). Χαρακτηριστικά μορφολογικά γνωρίσματα του τομέα αυτού είναι οι κάψες με πόρους και οι σκούροι στήμονες. Σύμφωνα με τον Kadereit (1989) ο τομέας διαχωρίζεται σε τρεις ομάδες σύμφωνα με μορφολογικά και φυτογεωγραφικά γνωρίσματα. Το *P. rhoeas* ανήκει στην τρίτη ομάδα, η οποία περιλαμβάνει διπλοειδείς – και όχι πολυπλοειδείς - οργανισμούς (Kadereit 1989, όπως αναφέρεται από Carolan *et al.* 2006).

Μοριακή μελέτη με βάση πυρηνικό ριβοσωμικό και πλαστιδιακό DNA για την οικογένεια Papaveraceae κατέληξε σε καλά επιλυμένα και τεκμηριωμένα φυλογενετικά δέντρα. Η μελέτη κατέληξε ότι η οικογένεια Papaveraceae είναι πιθανότατα παραφυλετική. Επίσης αμφισβητείται και η μονοφυλετικότητα του τομέα *Rhoeadium* (Carolan *et al.* 2006).

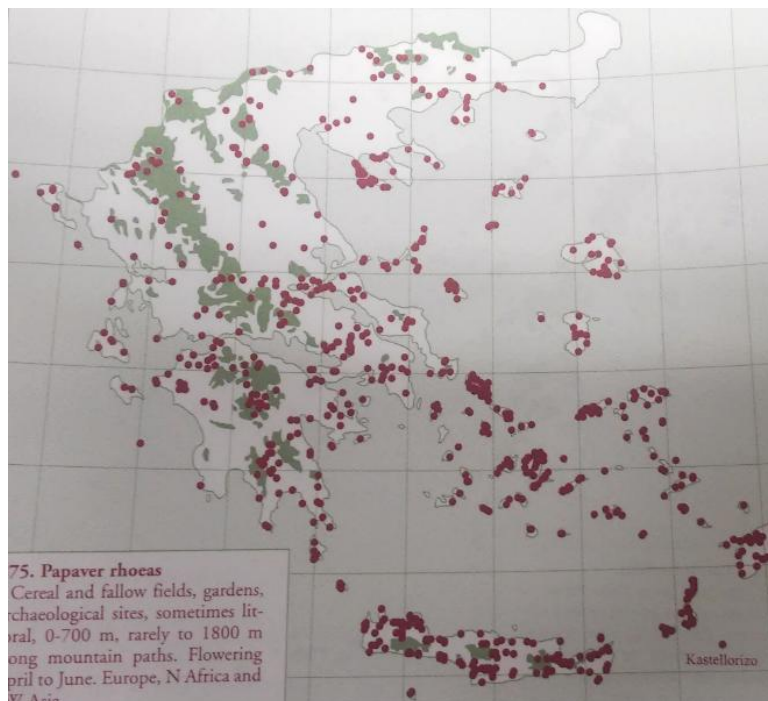
Το είδος *Paraver rhoeas* είναι διπλοειδές με  $2n = 14$  (Lawrence 1930, Philp 1933, Asahina *et al.* 1957, McNaughton 1960, όπως αναφέρονται από McNaughton and Harper 1964, Mihalik 1999, Kadereit 2002). Συχνά συμβαίνει υβριδισμός μεταξύ του *P. rhoeas* και των *P. umbonatum*, *P. carmeli* και *P. humile* (Kadereit 1990, Mihalik 1999).



**Εικόνα 1.63:** Λιβάδι με *Paraver rhoeas*. Άποψη λιβαδιού με *Paraver rhoeas*, μια κοινή εικόνα του Μεσογειακού Ελληνικού τοπίου (εικόνα από Γιαννίτσaros *et al.* 1999).

Η γεωγραφική κατανομή του φυτού *P. rhoeas* περιλαμβάνει ολόκληρη την Ευρώπη έως τη Σκανδιναβία και τη Μεγάλη Βρετανία, την Κεντρική και Βόρεια Ασία, την περιοχή της Μέσης Ανατολής, τη Βόρεια Αφρική, τις

Καναρίους Νήσους, τις νήσους Μαδέρες και μετά από εισαγωγή (adventive flora) τις ΗΠΑ, τον Καναδά, την Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία (McNaughton and Harper 1964). Στον ελλαδικό χώρο απαντάται πρακτικά σε όλη την έκταση της χώρας (Εικόνα 1.64) και είναι το συχνότερο από τα έντεκα ήδη παπαρούνας (porry) που απαντώνται σε αυτόν (Sfikas 1984). Στην Ελλάδα απαντάται σε υψόμετρο 0-700 m και σπανιότερα σε ορειβατικά μονοπάτια έως και 1800 m.



**Εικόνα 1.64: Γεωγραφική κατανομή *Papaver rhoeas* στην Ελλάδα. Η γεωγραφική κατανομή είναι καθολική στην Ελλαδική επικράτεια (εικόνα από Kadereit 2002).**

Σχετικά με την ιστορική φυτογεωγραφία του *Papaver rhoeas* έχει προταθεί ότι οι Ευρωπαϊκοί πληθυσμοί του *P. rhoeas* και κάποιων συγγενών taxa στη Βόρεια, Κεντρική και Δυτική Ευρώπη έχουν καταγωγή από την Ανατολική Μεσόγειο. Η παρουσία του φυτού *Papaver rhoeas* σε απολιθώματα είναι γνωστή από τη μέση και ύστερη Νεολιθική περίοδο στην

Κεντρική Ευρώπη και από την ύστερη εποχή του Χαλκού στις Βρετανικές Νήσους (Godwin 1975 και Willerding 1986, όπως αναφέρονται από Kadereit 1990). Επιπλέον στις συγκεκριμένες περιοχές οι παπαρούνες *P. rhoeas* απαντώνται μόνο σε ανθρωπογενή ενδιαιτήματα. Για αυτούς τους λόγους έχει διατυπωθεί η υπόθεση της ανθρωπογενούς διασποράς για το φυτό *P. rhoeas* με περιοχή καταγωγής την Ανατολική Μεσόγειο. Λόγω της στενής σχέσης του με ανθρωπογενή ενδιαιτήματα αλλά και με την συμπάτρια κατανομή με άλλα πολύ συγγενή είδη με τα οποία διατηρεί ικανότητα υβριδισμού, έχει διατυπωθεί και η υπόθεση ότι η παρουσία του ανθρώπου μπορεί να είναι υπεύθυνη για τη διαφοροποίηση του είδους (Kadereit 1990). Γενικά φύεται σε αγρούς σιτηρών με πολλά από τα οποία έχει συγχρονισμένο κύκλο ζωής, και επιπλέον είναι ανθεκτικό στις απλές μεθόδους ελέγχου των ζιζανίων (Harris 2018).

### 1.10.2 Μορφολογία, Ανατομία & Φυσιολογία

Το *P. rhoeas* είναι πώδες φυτό, κυρίως μονετές και σπανιότερα διετές (McNaughton and Harper 1964, Γιαννίτσαρως *et al.* 1999). Πριν την άνθιση φέρει μορφή ροζέτας. Κατά την περίοδο της ανθοφορίας τα στελέχη που φέρουν τους ανθικούς οφθαλμούς ανορθώνονται και μερικά φέρουν φύλλα (McNaughton and Harper 1964). Τα φύλλα είναι άμισχα, βαθιά πτεροσχιδή με λογχοειδή τμήματα και μεγάλο επάκριο τμήμα (Εικόνα 1.65) (Καββάδας 1963, McNaughton and Harper 1964, Γιαννίτσαρως *et al.* 1999). Οι διαστάσεις των φύλλων

είναι 1-24 cm σε μήκος και 0,5-6 cm σε πλάτος (Kadereit 2002). Τα φύλλα και το ανθικό στέλεχος φέρουν τρίχες. Το συγκεκριμένο είδος φέρει γαλακτώδη χυμό (latex) (McNaughton and Harper 1964). Ο βλαστός είναι ορθός και το ύψος του φυτού φτάνει έως τα 60 cm (Καββάδας 1963, Kadereit 2002, Mabberley 2008 όπως αναφέρεται από Bercu 2012), ή κατά άλλη πηγή έχει ύψος 20-90 cm (Γιαννίτσaros *et al.* 1999). Στους άγριους πληθυσμούς παρατηρείται μεγάλη ποικιλότητα ως προς το σχήμα των φύλλων, το τρίχωμα και το χρώμα των ανθέων (Harris 2018).



**Εικόνα 1.65: Αποξηραμένο δείγμα *Paraver rhouas*. Δείγμα του 17<sup>ου</sup> αιώνα (εικόνα από Harris 2018, <https://herbaria.plants.ox.ac.uk/bol/plants400/Profiles/op/Paraverr>).**

Το ύψος του φυτού, το μέγεθος των πετάλων, το πλήθος από κάψες ανά φυτό και ο αριθμός των σπερμάτων ανά κάψα μπορούν να ποικίλλουν πολύ ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες (McNaughton and Harper 1964).

Τα σέπαλα είναι ελεύθερα, πράσινα με ανατομική δομή παρόμοια με το φύλλο, αλλά με ομοιογενές μεσόφυλλο (McNaughton and Harper 1964). Οι στήμονες είναι πολυάριθμοι και υπογυνοί. Τα νήματά τους είναι μακρά και συνδέονται με τη βάση των ανθέρων. (Εικόνα 1.66) Η ωθήκη είναι σφαιρική και επιφυής. Ο στύλος απουσιάζει και ξεκινούν πολλά πεπλατυσμένα στίγματα από την ωθήκη τα οποία συνδέονται πλευρικά (Εικόνα 1.66) (Petri and Mihalik 1999). Το άνθος στο *P. rhouas* δεν φέρει νέκταρ (McNaughton and Harper 1964). Η ανατομία των πετάλων αναλύεται σε ειδική παράγραφο.

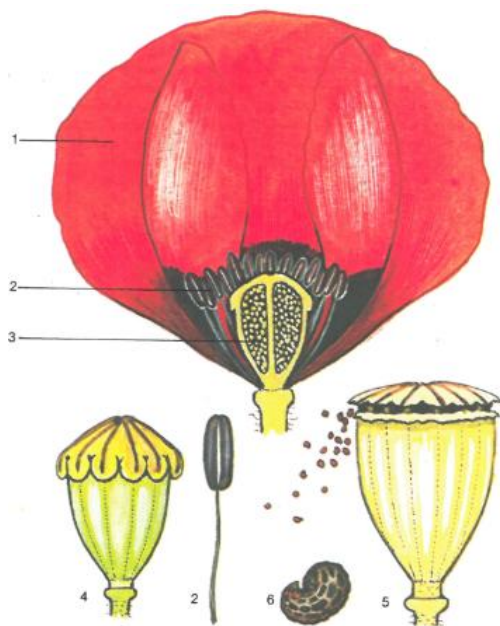
Το φυτό *Paraver rhouas* απαντάται συχνά σε διαταραγμένα ενδιαιτήματα, σε καλλιεργούμενη (arable) γη. Εμφανίζει προτίμηση σε αμμώδη (sandy) και ελαφρώς εύθρυπτα (light friable) εδάφη σύμφωνα με τον Druce (1886, όπως παρατίθεται από τους McNaughton and Harper 1964). Στην Ελλάδα απαντάται συχνά μαζί με πληθυσμούς από μαργαρίτες *Chrysanthemum coronarium* (Εικόνα 1.62) (Sfikas 1984). Γενικά εμφανίζει μεγάλη φαινοτυπική απόκριση ανάλογα με το επίπεδο θρεπτικών στο έδαφος. Σε συνθήκες χαμηλών θρεπτικών τα φυτά εμφανίζουν πολύ χαμηλό ύψος έως 5 cm με το καθένα να παράγει μία κάψα με 4-5 σπέρματα. Αντιθέτως σε ευνοϊκές συνθήκες μπορούν να παράγουν εκατοντάδες κάψες με περισσότερα από 1000 σπέρματα η καθεμία. Τα χαμηλά επίπεδα θρεπτικών μπορούν να προκαλέσουν επίσης μείωση στο μέγεθος των πετάλων, στον αριθμό των στημόνων, στον αριθμό των χώρων στην ωθήκη, στον αριθμό των στιγματικών ακτίνων (stigmatic rays) και στον αριθμό από σπερματικές βλάστες (McNaughton and Harper 1964).



### 1.10.3 Κύκλος ζωής & Φύτρωση

Η περίοδος της βλαστητικής περιόδου εξαρτάται από τον οικότυπο, τα καλλιεργητικά χαρακτηριστικά, τις κλιματικές συνθήκες και την εποχή σποράς (Bernath and Nemeth 1999).

Τα στάδια του κύκλου ζωής του *Paraver* είναι το στάδιο του εμβρύου ή του ληθάργου, η φάση της φύτρωσης, το στάδιο των φύλλων σε ροζέτα, η επιμήκυνση των μεσογονατίων και διακλάδωσης, η ανθοφορία και σχηματισμός καψών και σπερμάτων, και η ωρίμαση των καψών & διασπορά των σπερμάτων (Morasz 1979, όπως αναφέρεται από Bernath and Nemeth 1999).



**Εικόνα 1.66: Μορφολογία άνθους *P. rhoeas*.**

Ζωγραφική απεικόνιση στην οποία διακρίνονται τα βαθυκόκκινα δίχρωμα επικαλυπτόμενα πέταλα και η επιφυής θέση της ωοθήκης. Σε λεπτομέρειες εικονίζονται ο ύπερος με τις στιγματικές ακτίνες, ο νηματοειδής στήμονας, το σπέρμα και η ώριμη κάψα κατά την απελευθέρωση των σπερμάτων από τον δακτύλιο των πόρων της κάψας (εικόνα από Γιαννίτσαρος et al. 1999).

ληθαργική στο χώμα έως και 80 έτη, αλλά φυτρώνει αμέσως μετά από διαταραχή του εδάφους (Bercu 2012, Harris 2018). Αυτός είναι ο λόγος που φυτρώνουν εύκολα σε πεδία μαχών και ως εκ τούτου έχουν συμβολικά συνδεθεί κατά καιρούς με έννοιες πολέμου (Harris 2018).

### 1.10.4 Αναπαραγωγή, Ανθοφορία & Επικοινωνία

Κατά την περίοδο της ανθοφορίας, πριν το άνοιγμα των πετάλων, τα σέπαλα αποπίπτουν. Στη συνέχεια τα άνθη παραμένουν ανοιχτά για περίπου 24 ώρες, και μετά αποπίπτουν και

Στο *P. rhoeas* τα σπέρματα απελευθερώνονται από την κάψα μέσω ενός δακτυλίου πόρων (Εικόνα 1.66). Συνήθως ο αριθμός των πόρων ανά κάψα είναι δώδεκα με δεκατέσσερις. Η διασπορά των σπερμάτων είναι ταχύτερη σε σύγκριση με άλλα είδη του γένους *Paraver*, λόγω του μεγαλύτερου ανοίγματος των πόρων (McNaughton and Harper 1964).

Τα σπέρματα είναι συνήθως ληθαργικά. Η φύτρωση των άγριων τύπων της *Paraver rhoeas* απαιτεί ειδικές συνθήκες κατεργασίας με κρύο ή εναλλαγή του καθεστώτος θερμοκρασίας, αν και η επίδραση αυτή δεν είναι καθολική σε όλα τα σπέρματα (McNaughton and Harper 1964, Karlsson and Milberg 2007). Ο γενικός μηχανισμός του ληθάργου και της άρσης του από την εναλλαγή θερμοκρασιών φαίνεται να είναι εξελικτικά προγονικός και συντηρημένος μέσα στο γένος *Paraver* (Karlsson and Milberg 2007). Το φυτό δημιουργεί ισχυρή εδαφική σπερματική τράπεζα η οποία μπορεί να μείνει

τα πέταλα. Οι στήμονες παραμένουν μερικές μέρες ακόμα έως ότου αφυδατωθούν και αποπίπτουν (Bernath and Nemeth 1999; Mitich 2000). Οι γυρεόκοκκοι είναι έτοιμοι για ενεργοποίηση (activation) και βλάστηση (germination) αμέσως μετά την άνθιση (Cresti *et al.* 1990).

Η περίοδος ανθοφορίας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις περιβαλλοντικές κλιματικές και μετεωρολογικές συνθήκες. Στη Μεγάλη Βρετανία η κύρια περίοδος ανθοφορίας εκτείνεται από τον Ιούνιο έως τις αρχές του Ιουλίου, αν και σποραδικά παρατηρούνται άνθη μέχρι τον Οκτώβριο (McNaughton and Harper 1964). Αντιθέτως σε μελέτη φαινολογίας σε Μεσογειακό λιβάδι της βορειοανατολικής Ισπανίας διαπιστώθηκε ότι η ανθοφορία της *Paraver rhoeas* διήρκησε περίπου 1,5 μήνα κατά τον Απρίλιο με Ιούνιο (Bosch *et al.* 1997). Στον Ελλαδικό χώρο ανθοφορεί Απρίλιο με Μάιο (Αργυρόπουλος 2008, Rhizoroulou and Pantazi 2015) ή και έως Ιούνιο (Sfikas 1984) και η διάρκεια ζωής κάθε άνθους διαρκεί μία ημέρα (Αργυρόπουλος 2008).

Ως κύριοι επικονιαστές για το *Paraver rhoeas* έχουν αναφερθεί υμενόπτερα, τα οποία έχουν την ικανότητα να διακρίνουν διαφορετικά είδη *Paraver* (McNaughton & Harper 1960 όπως αναφέρεται από McNaughton and Harper 1964). Συγκεκριμένα για την περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου έχει αναφερθεί διαφορετικός κύριος επικονιαστής για το *Paraver rhoeas* αλλά και για άλλα άνθη με παρόμοια χαρακτηριστικά όπως: παρόμοιο σχήμα bowl-shaped, ακτινωτή συμμετρία, απουσία οσμής, έντονο κόκκινο ή κοκκινωπό χρωματισμό με μαύρο χρώμα στο κέντρο και νηματοειδείς στήμονες. Αυτή η αναπαραγωγική μορφή έχει συνδεθεί με καθαρόφιλη επικονίαση από το γένος *Amphistoma* (οικογένεια Glaphyridae). Σε πειράματα με χρωματιστούς δίσκους τα συγκεκριμένα σκαθάρια προτιμούσαν τους κόκκινους δίσκους, ιδιαιτέρως όταν έφεραν μαύρη περιοχή στο κέντρο τους (Dafni *et al.* 1990)

#### 1.10.5 Στοιχεία φυτοχημείας

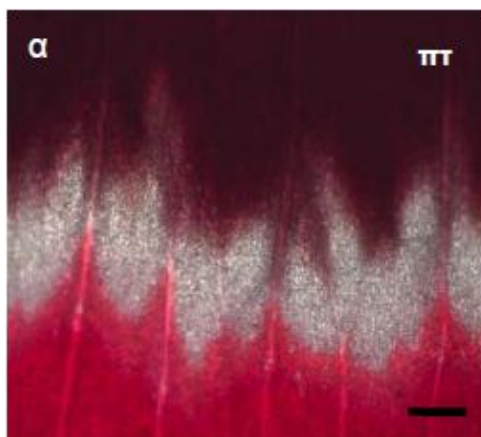
Το φυτό *Paraver rhoeas* έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και από φυτοχημική άποψη. Στους ιστούς της παπαρούνας έχουν βρεθεί αρκετές ουσίες με φαρμακολογική δράση όπως ανθοκυανίνες και τα αλκαλοειδή ροιαδίνη (rhoeadine), ροιαδικό οξύ (rhoeadic acid), παπαβερικό οξύ (paraveric acid) και ροιαγενίνη (rhoeagenine) (Ghoshooni and Sahraei 2014). Τα αλκαλοειδή που περιέχονται στο φυτό, και ιδίως η ροιαδίνη, το καθιστούν δύσπεπτο στα ζώα στα οποία προκαλούνται εντερικές διαταραχές. Τα πέταλα του φυτού έχουν αποχρεμπτικές και αντιβηχικές ιδιότητες (Γιαννίσαρος *et al.* 1999).

Συγκεκριμένα για τα φλαβονοειδή, από μελέτη πληθυσμών της Αιγύπτου ταυτοποιήθηκε η παρουσία ρουτινοσίδων (rutinoside) κερκετίνης (quercetin) και ισοραμνετίνης (isorhamnetin) στους βλαστούς και στα φύλλα (Saleh *et al.* 1987). Σε άλλη μελέτη προσδιορίστηκε το ποσό των φλαβονών και φλαβονολών στα πράσινα εδώδιμα μέρη από φυτά που μαζεύτηκαν από την Κρήτη. Βρέθηκαν υψηλά επίπεδα φλαβονών και φλαβονολών σε σύγκριση με άλλα εδώδιμα φρούτα και λαχανικά. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκαν οι φλαβόνες λουτεονίνη και απιγενίνη και οι φλαβονόλες μυρικετίνη, κερσετίνη, καιμπφερόλη και ισοραμνετίνη και βρέθηκε ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση κερσετίνης (26,3 mg ανά 100 g νωπού βάρους) (Trichoroulou *et al.* 2000).



### 1.10.6 Μορφολογία, μικρομορφολογία, ανατομία και χρώμα των πετάλων

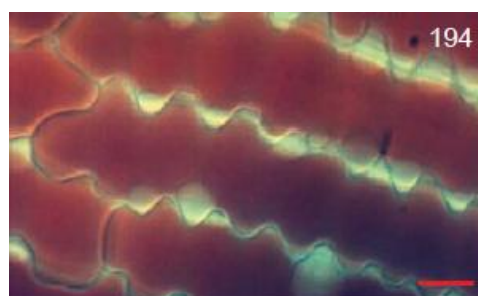
Η στεφάνη του άνθους είναι χωριστοπέταλη και αποτελείται από τέσσερα πέταλα. Τα πέταλα σε δύο σπονδυλώματα, το καθένα από τα οποία περιλαμβάνει 2 αντιδιαμετρικά πέταλα. Τα εξωτερικά είναι μεγαλύτερα και υπερκαλύπτουν τα πέταλα του εσωτερικού σπονδυλώματος (McNaughton and Harper 1964, Kadereit 2002). Ο ανθικός ποδίσκος είναι αδρότριχος (Καββάδας 1963, Γιαννίσαρος *et al.* 1999), όπως και οι ανθικοί οφθαλμοί (Kadereit 2002). Οι διαστάσεις των πετάλων είναι 1,3-5,5 X 0,8-10 cm (Kadereit 2002), με πιο τυπικές τις τιμές μήκους 3,5-4 cm (Γιαννίσαρος *et al.* 1999).



**Εικόνα 1.67: Στερεομικρογραφία πετάλου *P. rhoeas*.** Διακρίνεται η τριχρωμία του πετάλου και συγκεκριμένα η μεταβατική ζώνη. Μεταξύ της κόκκινης και της μαύρης περιοχής παερμβάλλεται μία λευκή ζώνη. Κλίμακα 0,5 mm (εικόνα από Αργυρόπουλος 2009).

Εν γένει τα επιδερμικά κύτταρα και των δύο όψεων και όλων των χρωματικών περιοχών των πετάλων είναι επιμήκη με κυματοειδή αντικλινή τοιχώματα (Εικόνα 1.68) (Αργυρόπουλος 2004, 2009, Rhizoroulou *et al.* 2008), με εξαίρεση κύτταρα κοντά στη βάση του πετάλου και στο κράσπεδο της κάτω επιφάνειας που φέρουν ευθύγραμμα αντικλινή τοιχώματα. Στις επιδερμίδες και των δύο επιφανειών συναντώνται σποραδικά έγκλειστα με χρωστικές. (Αργυρόπουλος 2009). Στόματα συναντώνται σποραδικά και στις δύο επιφάνειες (Petri and Mihalik 1999, Αργυρόπουλος 2004).

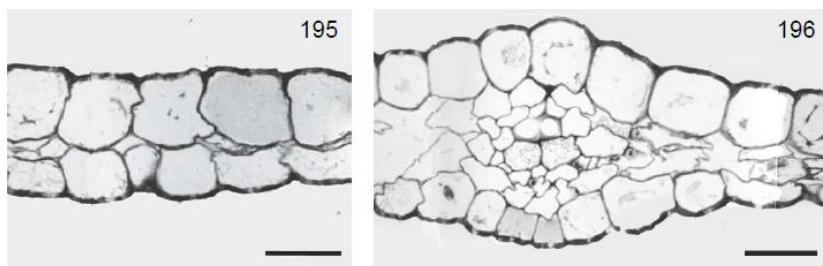
Τα πέταλα χαρακτηρίζονται από πολύ μικρό πάχος. Το μεγαλύτερο μέρος καταλαμβάνουν τα κύτταρα των δύο επιδερμίδων (η άνω είναι ελαφρώς πλατύτερη), οι οποίες σχεδόν εφάπτονται σε μεγάλο μέρος του κυττάρου, με εξαίρεση την περιοχή του κεντρικού νεύρου (Εικόνα 1.69). Εκεί παρουσιάζει τοπική ανύψωση το πέταλο και από τις δύο του πλευρές λόγω της παρουσίας κεντρικού νεύρου περιτριγυρισμένο από παρεγχυματικό ιστό (Εικόνα 1.69) (Αργυρόπουλος 2004, 2009). Το αγωγό σύστημα είναι ασθενώς ανεπτυγμένο και αποτελείται από τραχεΐδες στο ξύλωμα και από ηθμώδη στοιχεία (sieve cells) στο φλοίωμα (Petri and Mihalik 1999). Εν γένει ο παρεγχυματικός ιστός του πετάλου είναι χαλαρός με πολλούς και ευρείς μεσοκυττάριους χώρους (Εικόνα 1.69) (Αργυρόπουλος 2004, 2009). Αναφέρεται ότι το μεσόφυλλο αποτελείται από 7-10 στρώσεις παρεγχυματικών κυττάρων (Petri and Mihalik 1999), αλλά ανατομικές μελέτες σε εγκάρσιες τομές πετάλων από τον Ελλαδικό χώρο δεν



**Εικόνα 1.68: Παραδερμική τομή πετάλου *P. rhoeas*.** Διακρίνεται η κάτω επιδερμίδα του πετάλου σε οπτικό μικροσκόπιο. Διακρίνεται το βαθυκόκκινο χυμοτόπιο των κυττάρων λόγω των ανθοκυανινών και επιπλέον τα κυματοειδή πλευρικά κράσπεδα των κυττάρων. Κλίμακα 10 μm (εικόνα από Αργυρόπουλος 2009).

επιβεβαιώνουν σε καμία περίπτωση κάτι τέτοιο (Αργυρόπουλος 2004, 2009). Αντιθέτως δείχνουν ότι το πέταλο αποτελείται από 2-3 διακριτές στρώσεις κυττάρων πάχους περίπου 2-30 μm ανά στρώση (Εικόνα 1.69) (Rhizoroulou *et al.* 2008).

Όπως αναφέρθηκε, τα πέταλα χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα μικρό πάχος. Τα πέταλα του *Paraver rhoeas* είναι ιδιαίτερα λεπτά με μέσο πάχος  $75 \pm 12$  μm, όπως φάνηκε από δείγμα από την Ολλανδία (van der Kooi *et al.* 2016), ολικού πάχους έως και 3 σειρών κυττάρων (van der Kooi and Stavenga 2019). Σε άνθη του ελλαδικού χώρου μετρήσεις από τον



**Εικόνα 1.69: Εγκάρσια τομή πετάλου *P. rhoeas*.** Διακρίνονται εγκάρσιες τομές πετάλων σε οπτικό μικροσκόπιο. Η δεξιά εικόνα προέρχεται από την περιοχή του κεντρικού νεύρου. Η άνω επιφάνεια του πετάλου εικονίζεται προς το πάνω μέρος της εικόνας. Διακρίνεται το εξαιρετικά λεπτό πάχος του πετάλου στο οποίο κυριαρχούν οι επιδερμίδες. Η άνω επιδερμίδα είναι ελαφρά παχύτερη από την κάτω. Στην περιοχή του κεντρικού νεύρου παρατηρείται μια διόγκωση και προς τις δύο πλευρές και στην περιοχή εκείνη συναντάται εντονότερο μεσόφυλλο και λίγα αγωγά στοιχεία. Το μεσόφυλλο όπου υπάρχει είναι χαλαρό. Κλίμακα 20 μm (εικόνα από

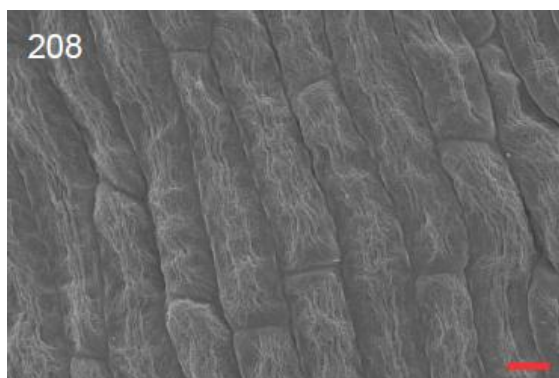
Αργυρόπουλος (2004) έδειξαν ολικό πάχος 57-118 μm, πάχος άνω επιδερμίδας 29-62 μm, πάχος κάτω επιδερμίδας 19-38 μm και διαστάσεις στόματος περίπου 5X5 μm. Εν γένει η άνω επιδερμίδα είναι λίγο πιο παχιά από την κάτω (Εικόνα 1.69).

Επιπλέον το πλάτος των επιδερμικών κυττάρων είναι 12-15 μm στην κόκκινη περιοχή, 16-22 μm στη λευκή περιοχή και 12-17 μm στη μαύρη περιοχή (Αργυρόπουλος 2009).

Τα πέταλα είναι συνήθως ερυθρού χρωματισμού και σε ορισμένες περιπτώσεις φέρουν μια σκουρόχρωμη περιοχή στη βάση τους (Εικόνα 1.66) (McNaughton and Harper 1964, Γιαννίτσaros *et al.* 1999, Αλεξανδρίδης 2004, Αργυρόπουλος 2004, 2009 van der Kooi and Stavenga 2019). Στη Βρετανία υπερτερούσε το πορτοκαλοκόκκινο πρότυπο χρωματισμού των πετάλων μέχρι τον Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο, ενώ σήμερα υπερτερούν τα ερυθρά άνθη με μαύρη κηλίδα στη βάση τους (Harris 2018). Μεταξύ της κόκκινης και της μαύρης περιοχής παρεμβάλλεται μια λευκή ζώνη (Εικόνα 1.67) (Αλεξανδρίδης 2004, Αργυρόπουλος 2004, 2009). Στα πέταλα του *Paraver rhoeas* δεν φαίνεται να ενυπάρχει δομικό χρώμα (Γκίκας 2016), αλλά σημαντική θέση για τις οπτικές ιδιότητες των πετάλων φαίνεται να έχει ο μεγάλος βαθμός σκέδασης από τους μεσοκυττάρους χώρους και ενδεχομένως το κυματοειδές κράσπεδο των επιδερμικών κυττάρων (van der Kooi and Stavenga 2019).

Στους ιστούς των πετάλων περιέχονται χρωστικές που απορροφούν στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος (Αλεξανδρίδης 2004, Αργυρόπουλος 2009). Επιπλέον στο κόκκινο μέρος περιέχονται ανθοκυανίνες, πιθανώς προϊόν πελαργονιδίνης (Αλεξανδρίδης 2004, Αργυρόπουλος 2009) ή κυανιδίνης (Αργυρόπουλος 2009). Ποιοτικά παρόμοιες χρωστικές ανθοκυανίνες περιέχονται πιθανώς και στη μαύρη περιοχή (Αργυρόπουλος 2009).

Σχετικά με το μικροανάγλυφο των δύο πλευρών του πετάλου όπως παρατηρούνται σε SEM, φαίνεται ότι τα κύτταρα της άνω και κάτω επιδερμίδας έχουν παρόμοιο ανάγλυφο. Επιπρόσθετα δεδομένα από AFM υποδεικνύουν αρκετά παρόμοιο ανάγλυφο στην άνω και



**Εικόνα 1.70:** Ηλεκτρονιογραφία σάρωσης πετάλου *P. rhoeas*. Προέρχεται από την κάτω επιφάνεια της κόκκινης περιοχής. Διακρίνεται το έντονο αλλά στον μεγαλύτερο βαθμό ακανόνιστο ανάγλυφο της εφυμενίδας. Κλίμακα 10  $\mu\text{m}$  (εικόνα από Αργυρόπουλος 2009).

κάτω πλευρά της κόκκινης περιοχής. Τα κύτταρα εμφανίζουν καμπυλότητα και έντονο ανάγλυφο (Αργυρόπουλος 2009), αλλά με ακανόνιστη δομή (Εικόνα 1.70) (Rhizorouliou *et al.* 2008). Στην κάτω επιφάνεια φαίνονται μικρές θηλοειδείς κυτταρικές προεκβολές (Αργυρόπουλος 2004), οι οποίες δεν παρατηρούνται όμως στο κράσπεδο των πετάλων (Αργυρόπουλος 2009). Το καμπύλο σχήμα των επιδερμικών κυττάρων ίσως τα κάνει να δρουν ως συγκλίνοντες φακοί (Αργυρόπουλος 2009). Εικάζεται ότι το έντονο μικροανάγλυφο συμβάλλει στο οπτικό και χρωματικό αποτέλεσμα (Αλεξανδρίδης 2004). Συγκριτικές

παρατηρήσεις του μικροανάγλυφου των χρωματικών περιοχών δείχνει ότι στη λευκή περιοχή οι κηροί είναι ελάχιστα αισθητοί, και η επιφάνεια σχεδόν επίπεδο. Αντιθέτως υπάρχει έντονο ακανόνιστο ανάγλυφο των κηρών στην κόκκινη περιοχή. Το εντονότερο ανάγλυφο παρατηρείται στη μαύρη περιοχή, στην οποία οι κηροί των περιθωρίων των κυττάρων φαίνονται ανυψωμένοι και εικάζεται ότι λειτουργούν ως παγίδες φωτός (Αλεξανδρίδης 2004). Ωστόσο, άλλες μελέτες δεν δείχνουν ούτε τόσο έντονη διαφοροποίηση ούτε τόσο σαφές χωρικό πρότυπο των κηρών στη μαύρη περιοχή (Αργυρόπουλος 2009).

### 1.11 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία εντάσσεται στο ευρύτερο πλαίσιο της μελέτης των οπτικών ιδιοτήτων των ανθέων. Πιο συγκεκριμένα με την εργασία αυτή επιχειρείται να γίνει μία διερεύνηση ως προς τη φύση του μαύρου χρώματος στα άνθη, το οποίο είναι σπάνιο στα άνθη. Ως φυτό μελέτης επιλέχθηκε η παπαρούνα (*Papaver rhoeas*) επειδή πρόκειται για ένα πολύ κοινό φυτό της ελληνικής χλωρίδας και αποτελεί ένα από τα πιο χαρακτηριστικά στοιχεία του ανοιξιάτικου ελληνικού τοπίου. Τα πέταλά του είναι δίχρωμα και αποτελούνται από μία κόκκινη και μία μαύρη περιοχή και επομένως δίνει το πλεονέκτημα συγκριτικής μελέτης των δύο χρωματικών περιοχών. Για αυτόν τον λόγο όλες οι πειραματικές μέθοδοι εφαρμόστηκαν και στην κόκκινη και στη μαύρη περιοχή. Για τη φύση του μαύρου έγινε προσπάθεια διερεύνησης της χημικής/βιοχημικής και της φυσικής συνιστώσας. Κάποια από τα ερωτήματα τα οποία έγινε προσπάθεια να προσεγγιστούν είναι:

- Ποιες ομάδες χρωστικών απαντώνται στους ιστούς των πετάλων;
- Σε ποια συγκέντρωση απαντώνται αυτές οι ομάδες χρωστικών;
- Εμφανίζεται κάποια εποχική διακύμανση στις χρωστικές κατά τη διάρκεια της ανθοφορίας;
- Ανιχνεύεται η ύπαρξη κάποιου χημικού στοιχείου που μπορεί να σχετίζεται με το χρώμα;
- Πώς διαφαίνεται το χρώμα από δεδομένα από μελέτη άθικτων πετάλων;
- Ποια είναι η συνεισφορά της μορφολογίας και ανατομίας στο χρώμα, όπως προκύπτει από τη σύγκριση δεδομένων άθικτων πετάλων και εκχυλισμένων χρωστικών;
- Εμφανίζονται μικροσκοπικές επιφανειακές δομές που συνηγορούν προς τη δυνητική ύπαρξη δομικού χρώματος;
- Εμφανίζονται μικροσκοπικές επιφανειακές δομές που μπορούν δυνητικά να επηρεάσουν το οπτικό ή/και χρωματικό αποτέλεσμα;
- Εν τέλει, ποιες είναι οι αιτίες του χρώματος στα πέταλα του *Papaver rhoeas*;

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Συλλογή και γενική κατεργασία φυτικού υλικού

Το φυτικό υλικό από άνθη *Paraver rhoeas* L. που χρησιμοποιήθηκε, συλλέχθηκε από το πεδίο. Συνολικά έγιναν 5 συλλογές φυτικού υλικού. Η πρώτη συλλογή έγινε στις 21/3/2018, η δεύτερη στις 3/4/2018, η τρίτη στις 19/4/2018, η τέταρτη στις 2/5/2018 και η πέμπτη στις 4/5/2018. Η πρώτη συλλογή έγινε από την πανεπιστημιόπολη Ζωγράφου (σε συντεταγμένες



**Εικόνα 2.1:** Διαχωρισμός της κόκκινης και της μαύρης περιοχής των πετάλων *P. rhoeas*. Οι δύο περιοχές κάθε πετάλου αποχωρίστηκαν με νυστέρι και στη συνέχεια ζυγίστηκαν και αποξηράθηκαν σε κλίβανο σε θερμοκρασία 60° C. Το συγκεκριμένο υλικό αντιστοιχεί στην πρώτη συλλογή στις 21/3/2018.

37°58'01 N και 23°46'46 E), ενώ οι υπόλοιπες τέσσερις συλλογές έγιναν από τον ευρύτερο χώρο του Αισθητικού δάσους Καισαριανής (σε συντεταγμένες 37°57'48 N και 23°46'59 E). Όλες οι συλλογές πραγματοποιήθηκαν πρωινές ώρες. Κατά την πρώτη συλλογή συλλέχθηκαν 87 άνθη, κατά τη δεύτερη 400 άνθη, κατά την τρίτη 20 άνθη, κατά την τέταρτη 40 άνθη και κατά την πέμπτη 54 άνθη. Τα άνθη της τέταρτης συλλογής προορίστηκαν για τις οπτικές μετρήσεις σε άθικτα

πέταλα και τα άνθη της πρώτης, δεύτερης και πέμπτης συλλογής προορίστηκαν για την παρασκευή εκχυλισμάτων από πέταλα. Από τα άνθη της τέταρτης παρατήρησης, ένα μέρος προορίστηκε για την παρασκευή εκχυλισμάτων και ένα μέρος τέθηκε σε κατεργασία για παρατήρηση σε μικροσκόπιο SEM.



**Εικόνα 2.2:** Λειοτριβημένο υλικό *P. rhoeas*. Το υλικό έχει υποστεί λεπτή λειοτρίβηση σε γουδί πορσελάνης. Το εικονιζόμενο υλικό προέρχεται από την κόκκινη περιοχή των πετάλων.

Για τα άνθη τα οποία προορίζονταν για παρασκευή εκχυλισμάτων ακολουθήθηκε η εξής κατεργασία: Απομακρύνθηκαν τα πέταλα από τα άνθη και σε κάθε πέταλο διαχωρίστηκαν η μαύρη και η κόκκινη περιοχή με νυστέρι (Εικόνα 2.1). Στη συνέχεια το νωπό υλικό από τη μαύρη και την κόκκινη περιοχή ζυγίστηκε σε ηλεκτρονικό αναλυτικό ζυγό και τοποθετήθηκε σε κλίβανο στους 60° C μέχρι να αποξηραθεί πλήρως. Στη συνέχεια ακολούθησε ζύγιση του ξηρού υλικού, λεπτή λειοτρίβηση του σε γουδί πορσελάνης (Εικόνα 2.2) και αποθήκευση του τριμμένου υλικού σε θερμοκρασία δωματίου.

Για τη μελέτη άθικτων πετάλων, το υλικό χωρίστηκε στη μέση και ακολουθήθηκε διαφορετική κατεργασία για κάθε μέρος του. Λόγω τεχνικών κωλυμάτων δεν μπορούσαν να γίνουν άμεσες μετρήσεις στο υλικό και έπρεπε με κάποιον τρόπο να συντηρηθεί. Τα άνθη της πρώτης ομάδας τοποθετήθηκαν αμέσως μετά τη συλλογή τους σε αεροστεγείς πλαστικές σακούλες κεκορεσμένων υδρατμών και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στο ψυγείο στους 4° C. Τα άνθη

της δεύτερης ομάδας αποξηράνθηκαν στον αέρα σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό να επανυδατωθούν για να γίνουν οι μετρήσεις.

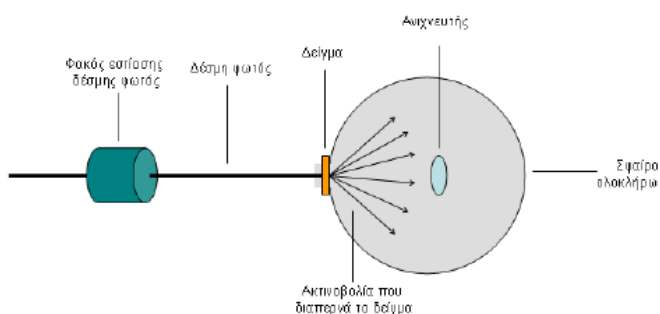


## 2.2 Προσδιορισμός οπτικών ιδιοτήτων άθικτων πετάλων

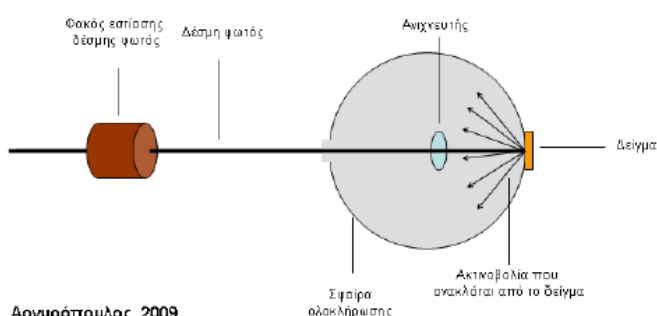
Πραγματοποιήθηκε λήψη των φασμάτων διαπερατότητας και ανάκλασης από νωπά πέταλα από *Paranerv rhowas* (κόκκινη και μαύρη περιοχή) με τη χρήση φασματοφωτόμετρου με σφαίρα ολοκλήρωσης (integrating sphere). Από αυτά τα φάσματα προέκυψε το φάσμα απορρόφησης νωπών πετάλων.

Τα δείγματα που μετρήθηκαν είχαν συλλεχθεί από το πεδίο στις 2/5/2018 και είχαν συντηρηθεί αεροστεγώς σε σακούλες πλήρεις υδρατμών σε ψύχος (περίπου 4°C) και σκότος μέχρι να γίνει η μέτρηση. Για τη μέτρηση επιλέχθηκαν τμήματα πετάλων που είχαν διατηρηθεί καλύτερα. Οι μετρήσεις έγιναν σε φασματοφωτόμετρο PerkinElmer Lambda 950

Μέτρηση διαπερατότητας



Μέτρηση ανάκλασης



Αργυρόπουλος, 2009

**Εικόνα 2.3: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης για μέτρηση διαπερατότητας και ανάκλασης σε άθικτα πέταλα.** Η διάταξη για τη μέτρηση διαπερατότητας εικονίζεται άνω και η διάταξη για τη μέτρηση ανάκλασης κάτω. Με μαύρο απεικονίζεται η φωτεινή δέσμη, με πορτοκαλί το δείγμα, με γαλάζιο ο ανιχνευτής και με γκρι η σφαίρα ολοκλήρωσης. Η σφαίρα ολοκλήρωσης συλλέγει το σύνολο των ακτίνων που διέρχονται ή ανακλώνται και τις οδηγεί στον ανιχνευτή (εικόνα από Αργυρόπουλος 2009).

UV/VIS Spectrophotometer στο Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ στο Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ) στο Ηράκλειο Κρήτης. Κατά τη μέτρηση μικρά κομμάτια από τα πέταλα στεγνώνονται και στερεώνονται με διπλοκολλητική ταινία σε ειδική υποδοχή του φασματοφωτόμετρου κατά τέτοιο τρόπο ώστε η φωτεινή δέσμη να διέρχεται μέσα από το επιθυμητό σημείο μέτρησης (κόκκινη ή μαύρη περιοχή). Το πέταλο πρέπει να είναι τεντωμένο και κάθετο προς τη δέσμη φωτός. Κατά τις μετρήσεις δέσμη φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος προσπίπτει στο δείγμα. Για τη μέτρηση της διαπερατότητας (transmittance) η σφαίρα ολοκλήρωσης τοποθετείται πίσω από το δείγμα κατά

τέτοιον τρόπο ώστε όλο το κλάσμα της δέσμης που διέρχεται από το πέταλο να ανακλάται στη σφαίρα ολοκλήρωσης και να οδηγείται στον ανιχνευτή (Εικόνα 2.3). Κατά τη μέτρηση της ανάκλασης (reflectance) η σφαίρα ολοκλήρωσης τοποθετείται μπροστά από το δείγμα κατά τέτοιον τρόπο ώστε όλο το κλάσμα της δέσμης που ανακλάται/σκεδάζεται προς τα πίσω συλλέγεται από τη σφαίρα ολοκλήρωσης και οδηγείται στον ανιχνευτή (Εικόνα 2.3). Ο ανιχνευτής βρίσκεται πάντα εντός της σφαίρας ολοκλήρωσης και χρησιμοποιείται πάντα ειδικός φακός εστίασης της δέσμης πάνω στο δείγμα (Αργυρόπουλος 2009, Χειμώνα 2015,

Γκίκας 2016). Η σφαίρα ολοκλήρωσης καλύπτεται εσωτερικά από μία λευκή αδρή (matt) επίστρωση, η οποία προκαλεί τον διάχυτη ανάκλαση της ακτινοβολίας προς όλες τις κατευθύνσεις. Το φως (διερχόμενο ή ανακλώμενο) σκεδάζεται πολλαπλώς στα τοιχώματα στο εσωτερικό της σφαίρας και καταλήγει στον ανιχνευτή (detector) (Vignolini *et al.* 2013b, Χειμώνα 2015). Η περιοχή στην οποία έγινε η μέτρηση είναι από τα 250 nm έως τα 2500 nm. Το φασματοφωτόμετρο φέρει δύο πηγές φωτός (Χειμώνα 2015), η εναλλαγή των οποίων πιθανώς προκαλεί μια ασυνέχεια στα φάσματα περίπου στα 850 nm (Αργυρόπουλος 2009, Χειμώνα 2015, Γκίκας 2016).

Η ανάκλαση R (%) και η διαπερατότητα T (%) λαμβάνουν τιμές από 0 έως 100%, όπου το 0 αντιστοιχεί σε μηδενική φωτεινή ένταση και 100% στο σύνολο της έντασης της φωτεινής δέσμης. Η απορρόφηση - A (absorbance) υπολογίζεται έμμεσα από τη σχέση  $A=1-R-T$  ή ισοδύναμα  $A\%=100\%-T\%-R\%$  (Αργυρόπουλος 2009, Χειμώνα 2015, Γκίκας 2016, van der Kooi *et al.* 2016). Έγιναν μετρήσεις (εκατοστιαίας) διαπερατότητας και (εκατοστιαίας) ανάκλασης από 250 nm έως 2500 nm για κάθε δείγμα με βήμα 2 nm και για κάθε μήκος κύματος υπολογίστηκε η τιμή (εκατοστιαίας) απορρόφησης. Μετρήσεις έγιναν για τη μαύρη και την κόκκινη. Επειδή επαρκούσε το φυτικό υλικό οι μετρήσεις για τη μαύρη περιοχή έγιναν δύο φορές. Σε κάθε χρωματική περιοχή μετρήθηκε διαπερατότητα και ανάκλαση για την άνω (προσαξονική) και για την κάτω (απαξονική) επιφάνεια του πετάλου. Επομένως έγιναν συνολικά 6 (2 στο κόκκινο και 4 στο μαύρο) μετρήσεις διαπερατότητας και 2 (2 στο κόκκινο και 4 στο μαύρο) μετρήσεις ανάκλασης.

Εκτός από τα νωπά πέταλα, κάποια ακόμα πέταλα που είχαν συλλεχθεί στις 2/5/2018 αποξηράνθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό να επανυδατωθούν στη συνέχεια. Επανυδατώθηκαν με λίγο νερό σε τρυβλίο Petri αλλά η κατάστασή τους ήταν πολύ «ευαίσθητη» για να προσαρτηθούν στο φωτόμετρο και να πραγματοποιηθούν οπτικές μετρήσεις.

### 2.3 Μονιμοποίηση και αφυδάτωση του υλικού και προετοιμασία για SEM

Προκειμένου να γίνει παρατήρηση στο ηλεκτρονι(α)κό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) πρέπει να προηγηθεί κάποια κατεργασία του υλικού. Το πρώτο βήμα που πρέπει να γίνει περιλαμβάνει τη (χημική) μονιμοποίηση (fixation) του δείγματος, η οποία αποσκοπεί στην παύση όλων των μεταβολικών διεργασιών του κυττάρου και της δράσης των υδρολυτικών ενζύμων του και στον σχηματισμό δεσμών μεταξύ των βιομορίων και μετατροπή του κυτταροπλάσματος σε πήκτωμα για να μην πραγματοποιηθούν μεταβολές στον όγκο, τη μορφολογία και τη λεπτή δομή των κυττάρων (Μαργαρίτης *et al.* 2004, Mascorro and Bozzola 2007). Δύο από τις κυριότερες χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται κατά τη μονιμοποίηση είναι η στερέωση με γλουταρική αλδεΐδη (και άλλες αλδεΐδες) και η μεταστερέωση με τετροξείδιο του οσμίου ( $OsO_4$ ) (Μαργαρίτης *et al.* 2004, Ελευθερίου 2007). Η γλουταρική αλδεΐδη αντιδρά με τις ομάδες  $-SH$ ,  $-NH_2$  και  $-NH-$ , καθώς και με το γλυκογόνο, ενώ δεν αντιδρά καθόλου με τα λιπίδια (Μαργαρίτης *et al.* 2004). Αντιδρά έντονα με τις πρωτεΐνες σε αμινοξέα όπως η λυσίνη, η τρυπτοφάνη, η τυροσίνη και η φαινυλαλανίνη (Horwood 1969). Σε σύγκριση με άλλες αλδεΐδες προσδίδει εξαιρετική διατήρηση της κυτταρικής μορφολογίας, η οποία οφείλεται στον εκτεταμένο βαθμό αντίδρασης με τις πρωτεΐνες, αλλά μέτρια διατήρηση της ενζυμικής δραστηριότητας (Horwood 1969, Μαργαρίτης *et al.* 2004). Επιπλέον δεν επιδρά στη διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης (Horwood 1969).

Το τετροξείδιο του οσμίου ( $OsO_4$ ) παύει τις ενζυματικές αντιδράσεις και σταθεροποιεί τη λεπτή δομή του κυττάρου (Μαργαρίτης *et al.* 2004, Bozzola 2007a). Είναι ισχυρά οξειδωτικό και οξειδώνει τους διπλούς δεσμούς, αντιδρώντας ταχύτατα με τα ακόρεστα λιπίδια (Horwood 1969, Μαργαρίτης *et al.* 2004, Bozzola 2007a). Αντιδρά με τις κυστεϊνικές ομάδες των πρωτεϊνών, με τα αμινοξέα τρυπτοφάνη και ιστιδίνη και μπορεί να προκαλέσει οξειδωτική απαμίνωση (Horwood 1969, Μαργαρίτης *et al.* 2004). Η αντίδραση με τις πρωτεΐνες είναι αργή και περιλαμβάνει αντίδραση με τις ιστόνες, με αποτέλεσμα τη διατήρηση της δομής του DNA (Bozzola 2007a). Αντιθέτως το  $OsO_4$  δεν αντιδρά με τα φυσικά νουκλεϊκά οξέα, αλλά αντιδρά έντονα με αποδιαταγμένο DNA κυρίως με τη θυμίνη (Horwood 1969) και είναι αμφίβολο κατά πόσο αντιδρά με τους υδατάνθρακες (Μαργαρίτης *et al.* 2004). Επίσης προκαλείται μερική έως πλήρη διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης (Horwood 1969). Λόγω του μεγάλου ατομικού αριθμού του οσμίου, το  $OsO_4$  αυξάνει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του δείγματος και δρα ως «χρωστική» για το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δηλαδή προάγει τη διαφορική απορρόφηση και σκέδαση των ηλεκτρονίων και κατ' επέκταση την ευκρίνεια της ηλεκτρονιογραφίας (Μαργαρίτης *et al.* 2004, Bozzola 2007a). Το  $OsO_4$  προκαλεί σκλήρυνση των κυττάρων και τα καθιστά ευαίσθητα σε μηχανική φθορά κατά το πιπετάρισμα ή τη φυγοκέντρηση (Bozzola 2007a). Η διάρκεια της στερέωσης πρέπει να είναι τέτοια που να επιτρέπει τόσο τη διάχυση του στερεωτικού μέσου στο βιολογικό υλικό, όσο και την εκτέλεση των χημικών αντιδράσεων του στερεωτικού μέσου με το βιολογικό υλικό (Horwood 1969).

Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της αφυδάτωσης (dehydration) κατά την οποία απομακρύνεται όλο το νερό από το δείγμα και αντικαθίσταται συνήθως με αιθυλική αλκοόλη ή ακετόνη διαδοχικά αυξανόμενων συγκεντρώσεων (Μαργαρίτης *et al.* 2004, Ελευθερίου 2007) Η επιτυχημένη αφυδάτωση δεν οδηγεί σε σμίκρυνση του όγκου των

κυττάρων ή γενικότερα σε διατάραξη της λεπτής δομής του (Mascorro and Bozzola 2007). Οι φυτικοί ιστοί εμφανίζουν κάποιες ιδιαιτερότητες κατά τη διαδικασία χημικής μονιμοποίησής τους. Η υδρόφοβη εφυμενίδα και το παχύ κυτταρικό τοίχωμα μπορεί να αποτελέσουν εμπόδια κατά τη διάχυση των στερεωτικών μέσα στον ιστό. Επιπλέον ο τονοπλάστης είναι επιρρεπής να διαρραγεί κατά τη διαδικασία της στερέωσης. Το αποτέλεσμα μπορεί να είναι η απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων στο κυτταρόπλασμα, και διατάραξη της λεπτής δομής του, ιδιαίτερα στα κύτταρα έντονα αναπτυγμένα χυμοτόπια. Η εφαρμογή γλουταρικής αλδεΐδης σε αυτά τα κύτταρα προκαλεί ρήξη του τονοπλάστη, αλλά δεν έχει βρεθεί εναλλακτική λύση (Kuo 2007).

Η κατεργασία που ακολουθήθηκε έγινε σύμφωνα με τα σχετικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν από τους Αργυρόπουλος (2009) και Χειμών (2015). Αρχικά κόπηκαν με νυστέρι ανατομίας από την κόκκινη και τη μαύρη περιοχή των πετάλων της τρίτης συλλογής (19/4/2018) μικρά τμήματα εμβαδού το πολύ 0,5 cm<sup>2</sup>. Η άνω επιφάνεια κάθε τμήματος σημαδεύτηκε με μία μικρή βύθιση-τρύπα με τη βοήθεια ανατομικής βελόνας με σκοπό να μπορεί να γίνει στη συνέχεια διαχωρισμός άνω και κάτω επιφάνειας.

**Πίνακας 2.1: Παρασκευή διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά των προετοιμασία του υλικού για το SEM**

Διάλυμα	Παρασκευή διαλύματος
Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=6,8-7	Αρχικά παρασκευάζονται 100 mL υδατικού διαλύματος Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3,54 mg/mL (354 mg άνυδρου Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> διαλύονται σε απιονισμένο νερό έως τελικό όγκο 100 mL) και 100 mL υδατικού διαλύματος NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3 mg/mL (300 mg άνυδρου NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> διαλύονται σε απιονισμένο νερό έως τελικό όγκο 100 mL). Το φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα προκύπτει από την ανάμιξη 90 mL διαλύματος Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> και 10 mL διαλύματος NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .
Διάλυμα γλουταρικής αλδεΐδης (OHC(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CHO) 3%	3 mL διαλύματος γλουταρικής αλδεΐδης 25% αναμιγνύονται με 22 mL φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , με αποτέλεσμα την παρασκευή 25 mL από το επιθυμητό διάλυμα.
Διάλυμα OsO <sub>4</sub> 1%	Το διάλυμα περιλαμβανόταν παρασκευασμένο στα αντιδραστήρια του εργαστηρίου. Πρόκειται για διάλυμα OsO <sub>4</sub> 1% σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα.
Διαλύματα ακετόνης 70%, 90% και 100%	Διάλυμα απόλυτης 100% ακετόνης αραιώνεται με κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού με τη χρήση ογκομετρικού κυλίνδρου. Για το διάλυμα 70% αναμιγνύονται 7 mL απόλυτης ακετόνης με 3 mL απιονισμένου νερού και για το διάλυμα 90% αναμιγνύονται 9 mL απόλυτης ακετόνης με 1 mL απιονισμένου νερού.

Προκειμένου να γίνει η μονιμοποίηση του υλικού, τα τμήματα βυθίστηκαν σε διάλυμα γλουταρικής αλδεΐδης 3% για 2 ώρες (Πίνακας 2.1). Στη συνέχεια ακολούθησε ξέπλυμα του υλικού με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (Πίνακας 2.1) τρεις φορές με ανανέωση του διαλύματος κάθε μισή ώρα. Στη συνέχεια τα τμήματα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα OsO<sub>4</sub> 1% για 24 ώρες σε 4° C (Πίνακας 2.1). Έπειτα το υλικό ξεπλύθηκε με ρυθμιστικό φωσφορικό διάλυμα τρεις φορές με ανανέωση του διαλύματος κάθε μισή ώρα. Για την αφυδάτωση, το υλικό τοποθετήθηκε διαδοχικά σε διαλύματα ακετόνης αυξανόμενης περιεκτικότητας (70%,

90%, και 2 φορές σε απόλυτη 100% ακετόνη), από μία ώρα σε κάθε διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου (Πίνακας 2.1). Το υλικό αποθηκεύτηκε σε απόλυτη 100% ακετόνη στους 4° C. Οι χειρισμοί έγιναν σε σωληνάκια τύπου errendorf.

Η τελική κατεργασία και παρατήρηση των δειγμάτων έγινε στο εργαστήριο ηλεκτρονικής μικροσκοπίας «Βασίλης Γαλανόπουλος» του Πανεπιστημίου Κρήτης. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν βυθισμένα σε απόλυτη ακετόνη σε συνθήκες ψύχους. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ξήρανση κρίσιμου σημείου με ξηραντήρα Critical point dryer BAL-TEC CPD 030, μέχρι την πλήρη απομάκρυνση της ακετόνης. Στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε κάλυψη με κolloειδή χρυσό με Sputter coater BAL-TEC SCD 050.

## 2.4 Ηλεκτρονι(α)κό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM)

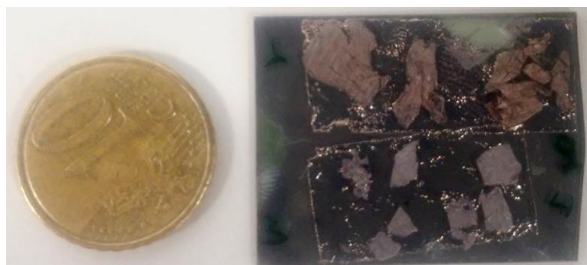
Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης προσφέρει τη δυνατότητα μελέτης της μικροσκοπικής μορφολογίας των επιφανειών στερεών (Μαργαρίτης *et al.* 2004, Egerton 2005, Bozzola 2007b). Όπως και στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, βασικό του τμήμα είναι μία πηγή (πρωτογενών) ηλεκτρονίων (π.χ. νήμα βολφραμίου) στην κορυφή ενός καθοδικού σωλήνα επιτάχυνσης ηλεκτρονίων που περιέχει διάφορους ηλεκτρομαγνητικούς φακούς, στη βάση του οποίου βρίσκεται το δείγμα προς παρατήρηση. Όλη η διαδικασία γίνεται σε κενό (Μαργαρίτης *et al.* 2004). Μια τυπική τάση επιτάχυνσης των ηλεκτρονίων για τον καθοδικό σωλήνα είναι 30 kV (Egerton 2005). Πάνω από το δείγμα βρίσκονται 2-3 φακοί που δρουν ως συμπυκνωτής (condenser) φακός συμπυκνώνει τη δέσμη των ηλεκτρονίων σε όσο πιο μικρή διάμετρο γίνεται (τυπικά 10 nm). Στη συνέχεια η ηλεκτρονιακή δέσμη διέρχεται από τον αντικειμενικό (objective) φακό και προσπίπτει στην επιφάνεια του δείγματος (Μαργαρίτης *et al.* 2004, Egerton 2005). Η δέσμη σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος σε δύο διαστάσεις (Μαργαρίτης *et al.* 2004, Egerton 2005). Η σάρωση στον άξονα x είναι σχετικά γρήγορη ενώ στον y πολύ πιο αργή (Egerton 2005).

Κατά την αλληλεπίδραση της ηλεκτρονιακής δέσμης με το δείγμα παράγονται διαφόρων ειδών σήματα τα οποία μπορούν να ανιχνευθούν με τον κατάλληλο ανιχνευτή. Αυτά περιλαμβάνουν οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια (backscattered electrons), δευτερογενή ηλεκτρόνια (secondary electrons), ακτίνες X, φως και θερμότητα (Bozzola 2007b). Οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια είναι τα (πρωτογενή) ηλεκτρόνια της ηλεκτρονιακής δέσμης που συγκρούονται ελαστικά με τα άτομα του δείγματος και ανακλώνται με γωνία μεγαλύτερη από 90°. Δευτερογενή ηλεκτρόνια είναι τα ηλεκτρόνια από τα άτομα του δείγματος τα οποία απομακρύνονται από αυτό μετά από ανελαστική κρούση και απορρόφηση ενέργειας προερχόμενης από τα (πρωτογενή) ηλεκτρόνια της ηλεκτρονιακής δέσμης (Egerton 2005). Τα οπισθοσκεδαζόμενα και τα δευτερογενή ηλεκτρόνια που διαφεύγουν από το δείγμα μπορούν να διαχωριστούν με βάση την κινητική τους ενέργεια, καθώς τα δευτερογενή ηλεκτρόνια που διαφεύγουν έχουν μικρότερη κινητική ενέργεια (Egerton 2005). Στην παρατήρηση της εξώτατης μορφολογίας (βάθους έως 50 nm) χρησιμοποιούνται μόνο τα δευτερογενή ηλεκτρόνια, τα οποία προέρχονται μόνο από την επιφάνεια του δείγματος. Για μελέτη μεγαλύτερου βάθους (0,1 έως 1 μm) απαιτείται η ανίχνευση των οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων, τα οποία προέρχονται από λίγο μεγαλύτερο βάθος του δείγματος (Μαργαρίτης *et al.* 2004). Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια δίνουν πληροφορίες σχετικά με την τοπογραφία (topography) της επιφάνειας του δείγματος ενώ τα οπισθοσκεδαζόμενα κυρίως για διαφορές στον ατομικό αριθμό (Bozzola 2007b).

Τα επιθυμητά ηλεκτρόνια ανιχνεύονται από συγκεκριμένο ανιχνευτή και το σήμα υπόκειται επεξεργασία και εν τέλει εμφανίζεται σε ασπρόμαυρη οθόνη ως διαβάθμιση φωτεινότητας. Οι περιοχές που παράγουν περισσότερα ηλεκτρόνια εμφανίζονται πιο φωτεινές (Bozzola 2007b). Για να παραχθούν δευτερογενή ηλεκτρόνια το υλικό χρειάζεται να είναι αγώγιμο και για αυτόν τον λόγο απαιτείται κάλυψη του βιολογικού υλικού με βαρύ μέταλλο μεγάλου ατομικού αριθμού (Μαργαρίτης *et al.* 2004). Τα μέταλλα μεγάλου ατομικού αριθμού (χρυσός, παλλάδιο, λευκόχρυσος, όσμιο) παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα δευτερογενών ηλεκτρονίων και δίνουν ισχυρότερο σήμα και καλύτερη ποιότητα στην



εικόνα (Bozzola 2007b). Στα δείγματα που μελετήθηκαν προηγήθηκε κάλυψη με χρυσό (Au) πάχους 10 nm κάθε φορά πριν την παρατήρηση. Η κάλυψη αυξάνει το πραγματικό μέγεθος των λεπτομερειών (Μαργαρίτης *et al.* 2004). Η εικόνα που εμφανίζεται δεν είναι στατική αλλά ανανεώνεται δείχνοντας την κατάσταση του δείγματος κάθε στιγμή (Bozzola 2007b). Παρατήρηση της εσωτερικής δομής με SEM μπορεί να γίνει μετά από αφαίρεση της επιφάνειας του δείγματος και παρατήρησής του στη συνέχεια (Bozzola 2007b).



**Εικόνα 2.4: Φυτικό υλικό έτοιμο για παρατήρηση σε SEM.** Στην άνω πλευρά βρίσκονται τεμάχια από τη μαύρη περιοχή των πετάλων και στην κάτω περιοχή από την κόκκινη. Επιπλέον έχει γίνει διαχωρισμός άνω και κάτω επιφάνειας. Η μεταλλική όψη των δειγμάτων οφείλεται στην κάλυψη με χρυσό. Αριστερά ένα κέρμα (10 λεπτών του Ευρώ) ως ένδειξη της κλίμακας.

Εκτός από κάλυψη με μέταλλα μεγάλου ατομικού αριθμού πρέπει να έχει προηγηθεί πλήρης αφυδάτωση του δείγματος. Για τα ευαίσθητα δείγματα ενδείκνυται ξήρανση κρίσιμου σημείου (critical point drying), αφού το δείγμα έχει υποστεί στερέωση, μεταστερέωση και αφυδάτωση. Με την ξήρανση κρίσιμου σημείου αντικαθιστά την αιθανόλη ή ακετόνη στον ιστό με υγρό CO<sub>2</sub> το οποίο στη συνέχεια εξαχνώνεται και απομακρύνεται. Το αποτέλεσμα είναι η πλήρης ξήρανση

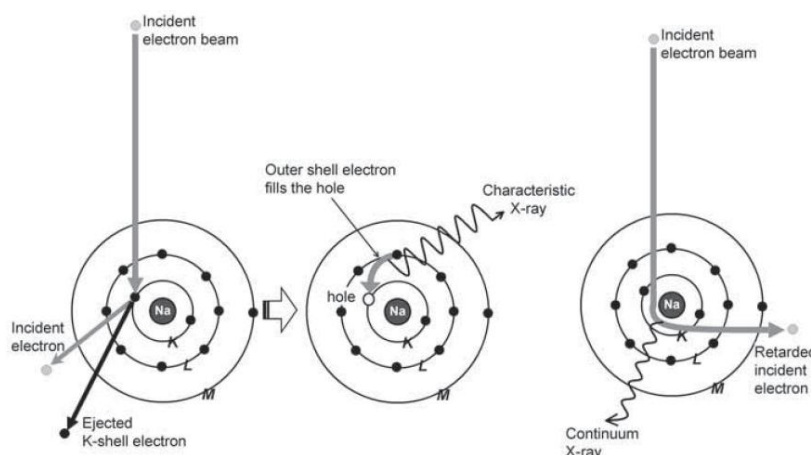
του δείγματος με παράλληλη εξαιρετη διατήρηση της μορφολογίας του (Μαργαρίτης *et al.* 2004, Bozzola 2007b). Το δείγμα μετά την ξήρανση, την κάλυψη με χρυσό και την παρατήρηση φυλάσσεται σε ξηρό σημείο προστατευμένο από τη σκόνη (Bozzola 2007b).

Για την παρούσα διπλωματική εργασία η ξήρανση κρίσιμου σημείου, η κάλυψη με χρυσό (Εικόνα 2.4) και η παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης έγινε στη Μονάδα Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας «Βασίλης Γαλανόπουλος» του Τμήματος Βιολογίας στο Πανεπιστήμιο Κρήτης, στο Ηράκλειο Κρήτης. Η ξήρανση κρίσιμου σημείου έγινε με ξηραντήρα BAL-TEC CPD 030 Critical Point Dryer, η κάλυψη με χρυσό έγινε με BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater και η παρατήρηση έγινε σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης JEOL JSM-639OLV Scanning Electron Microscope.

## 2.5 Στοιχειακή ανάλυση με SEM-EDX

Οι ακτίνες X μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά την αναλυτική διαδικασία για τον προσδιορισμό των στοιχείων ενός υλικού άγνωστης σύστασης. Μικροανάλυση με ακτίνες X σε φυτικό δείγμα πραγματοποιήθηκε πρώτη φορά το 1966 (Hodson 2000). Μία από αυτές τις μεθόδους είναι η φασματοσκοπία ακτίνων X διασποράς ενέργειας (energy dispersion X-ray spectroscopy). Η ταυτοποίηση των στοιχείων γίνεται μέσω των μοναδικών φασμάτων εκπομπής ακτίνων X για το κάθε στοιχείο. Η ανάλυση είναι ποιοτική αλλά μπορεί να γίνει και ημιποσοτική ή ποσοτική. Συντομογραφικά, αυτή η τεχνική είναι γνωστή ως EDS, EDX, EDXS ή XEDS, καθώς και ως (μικρο)ανάλυση ακτίνων X διασποράς ενέργειας (energy dispersive X-ray analysis – EDXA, energy dispersive X-ray microanalysis – EDXMA). Η οργανολογία της τεχνικής αυτής μπορεί να προσαρμοστεί μέσα στον θάλαμο ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης ή και ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης.

Το δείγμα τοποθετείται στην ειδική θέση εισδοχής του δείγματος για το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και βομβαρδίζεται με τα επιταχυνόμενα ηλεκτρόνια, όπως κατά τη συνήθη



**Εικόνα 2.5: Μηχανισμός παραγωγής ακτίνων X κατά το EDS.** Αριστερά: Το προσπίπτον ηλεκτρόνιο συγκρούεται με ένα ηλεκτρόνιο εσωτερικής στιβάδας (εν προκειμένω στιβάδα K) και προκαλεί τον ιοντισμό του. Η οπή που προκύπτει καλύπτεται από ηλεκτρόνιο εξωτερικής στιβάδας με παράλληλη εκπομπή φωτονίου ακτίνων X συγκεκριμένου μήκους κύματος. Σε αυτό το φαινόμενο οφείλεται ο σχηματισμός κορυφών συγκεκριμένου μήκους κύματος στο φάσμα ακτίνων X. Δεξιά: Ηλεκτρόνιο που διέρχεται πολύ κοντά από τον πυρήνα, έλκεται από τον πυρήνα και παρεκτρέπεται από την πορεία του. Κατά τη διαδικασία αυτή παράγεται φωτόνιο ακτίνων X μη προκαθορισμένου μήκους κύματος. Σε αυτόν τον μηχανισμό οφείλεται η παραγωγή συνεχούς φάσματος ακτίνων X (εικόνα από Roomans and Dragomir 2007).

το άτομο (Εικόνα 2.5) (Hodson 2000, Roomans and Dragomir 2007). Εναλλακτικά μπορεί απλά να προκληθεί μετακίνηση του εσωτερικού ηλεκτρονίου σε κάποια εξωτερική και ενεργειακά ανώτερη στιβάδα, απορροφώντας κινητική ενέργεια από το προσπίπτον ηλεκτρόνιο (Egerton 2005). Το αποτέλεσμα είναι να υπάρχει μία «οπή», δηλαδή η έλλειψη ενός ηλεκτρονίου σε κάποια από τις εσωτερικές στιβάδες του ατόμου (Εικόνα 2.5). Η κατάσταση αυτή είναι ασταθής και έχει πολύ μικρή διάρκεια ζωής, της τάξης των  $10^{-15}$  s

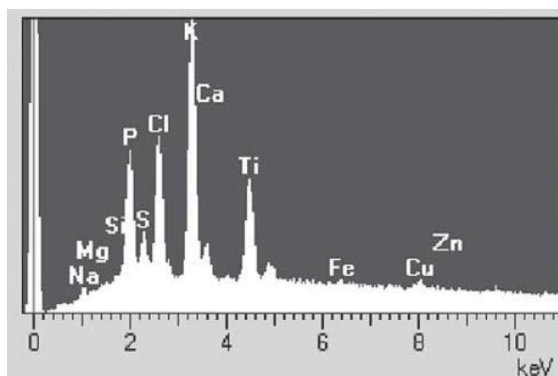
διαδικασία λειτουργίας του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Όταν ένα πρωτογενές ηλεκτρόνιο προσπέσει σε ένα ηλεκτρόνιο από τις εσωτερικές ηλεκτρονιακές στιβάδες (shells) ενός ατόμου του δείγματος, τότε ίσως η ενέργειά του επαρκεί για να προκαλέσει τον ιοντισμό (ionization) του ατόμου, δηλαδή την πλήρη απομάκρυνση του ηλεκτρονίου από

(Hodson 2000, Egerton 2005, Roomans and Dragomir 2007). Το κενό πληρώνεται από τη μετακίνηση ενός ηλεκτρονίου από εξωτερική στοιβάδα, δηλαδή από μεγαλύτερη ενεργειακή στάθμη. Κατά τη μετάβαση αυτή παράγεται ένα φωτόνιο με ενέργεια ίση με τη διαφορά ενεργειών μεταξύ των δύο στοιβάδων που κινήθηκε το ηλεκτρόνιο (Εικόνα 2.5). Αν η ενεργειακή διαφορά είναι αρκετά μεγάλη, τότε το φωτόνιο ανήκει στην περιοχή των ακτίνων Χ. Κατά αυτόν τον τρόπο το κάθε στοιχείο, όταν βομβαρδίζεται από ηλεκτρόνια έχει εκπομπές ακτίνων Χ σε πολύ συγκεκριμένα μήκη κύματος, τα οποία είναι χαρακτηριστικά για το κάθε στοιχείο (Εικόνα 2.6) και αντικατοπτρίζουν την ηλεκτρονιακή δομή του (Hodson 2000, Egerton 2005, Roomans and Dragomir 2007). Σημασία έχουν οι σπές που δημιουργούνται στις τρεις πιο εσωτερικές στιβάδες (στιβάδες K, L και M), καθώς ιονισμοί από εξώτερες στιβάδες δεν δίνουν την απαραίτητη ενεργειακή διαφορά για παραγωγή ακτίνων Χ (Hodson 2000). Τα στοιχεία με μεγάλο ατομικό αριθμό διαθέτουν πολλές στιβάδες και για αυτόν τον λόγο εμφανίζουν περισσότερες από μία χαρακτηριστικές κορυφές. Αυτό βοηθάει στον ασφαλέστερο προσδιορισμό των συγκεκριμένων στοιχείων. Ωστόσο είναι πιθανό κάποιες από αυτές να μην πραγματοποιούνται γιατί αντιστοιχούν σε ενεργειακές μεταβάσεις μεγαλύτερες ακόμα και από την αρχική κινητική ενέργεια των προσπιπτόντων ηλεκτρονίων (Egerton 2005). Επειδή δεν είναι όλες οι πιθανές ηλεκτρονιακές μεταβάσεις σε ένα άτομο ισοπίθανες, αναμένεται κάποιες από τις κορυφές στο φάσμα εκπομπής ενός στοιχείου να είναι ισχυρότερες από τις άλλες (Roomans and Dragomir 2007). Συνήθως, ένα επαρκές ενεργειακό εύρος για την ανίχνευση των φωτονίων είναι 0-20 keV. Το εύρος αυτό επαρκεί συνήθως για τις αναλυτικές διαδικασίες γιατί περιλαμβάνει τα φωτόνια από τις μεταβάσεις προς τη στιβάδα K για τα άτομα μικρότερου ατομικού αριθμού και προς τις στιβάδες L και M για τα άτομα μεγαλύτερου ατομικού αριθμού (Frey 2007).

Ταυτόχρονα πραγματοποιείται επιπλέον παραγωγή ακτίνων Χ με έναν δεύτερο μηχανισμό. Ένα κλάσμα των προσπιπτόντων ηλεκτρονίων επιβραδύνεται από το ηλεκτρικό πεδίο του πυρήνα των ατόμων του δείγματος και η ενέργεια που χάνει εκπέμπεται ως ακτίνες Χ (Roomans and Dragomir 2007). Πιο συγκεκριμένα, τα ηλεκτρόνια αυτά που διέρχονται πολύ κοντά από τους πυρήνες σκεδάζονται ελαστικά λόγω της ηλεκτροστατικής ελκτικής δύναμης που δέχονται από τον πυρήνα. Το αποτέλεσμα είναι το ηλεκτρόνιο να αποκτήσει κεντρομόλο επιτάχυνση (centripetal acceleration) καθώς κινείται γύρω από τον πυρήνα. Ως επιταχυνόμενο φορτισμένο σωματίδιο χάνει ενέργεια υπό τη μορφή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και συγκεκριμένα ακτινοβολίας Χ (Εικόνα 2.5) (Egerton 2005). Η ακριβής ενέργεια της παραγόμενης ακτινοβολίας διακυμαίνεται και το ολικό αποτέλεσμα είναι η παραγωγή ενός συνεχούς φάσματος ακτινοβολίας Χ χαμηλής έντασης (Εικόνα 2.6) (Egerton 2005). Το συνεχές φάσμα δεν δίνει στοιχεία για τη χημική σύσταση του δείγματος αλλά η έντασή του μπορεί να αποτελέσει ένδειξη της ολικής μάζας (ποσότητας) του δείγματος (Roomans and Dragomir 2007, Fernandez-Segura and Warley 2008).

Η επιπρόσθετη οργανολογία που απαιτείται για το μικροσκόπιο είναι ένας ανιχνευτής ακτίνων Χ με ημιαγωγό (Hodson 2000, Roomans and Dragomir 2007) και κάποιο σύστημα που διακρίνει τα φωτόνια ακτίνων Χ με βάση την ενέργειά τους (Egerton 2005). Η εστιασμένη ηλεκτρονιακή δέσμη του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου επιτρέπει την πολύ χωρικά περιορισμένη ανάλυση, ακριβώς στην περιοχή ενδιαφέροντος (Roomans and Dragomir 2007). Εν τέλει το σήμα μεταφέρεται σε υπολογιστή εξοπλισμένο με κατάλληλο

λογισμικό που συγκρίνει τα πειραματικά δεδομένα με τα βιβλιογραφικά για να πραγματοποιηθεί ταυτοποίηση των κορυφών με στοιχεία (Frey 2007). Ταυτόχρονα επιτελείται στατιστικός έλεγχος Poisson ώστε κάθε κορυφή που θεωρείται χαρακτηριστική στοιχείου να διαφέρει με τουλάχιστον 95% πιθανότητα από την ακτινοβολία υποβάθρου. Αυτό ισοδυναμεί με την κορυφή να υπερέχει τουλάχιστον κατά το διπλάσιο της τετραγωνικής ρίζας της έντασης της ακτινοβολίας υποβάθρου (Roomans and Dragomir 2007).



**Εικόνα 2.6: Τυπικό φάσμα ακτίνων Χ κατά το EDS.**

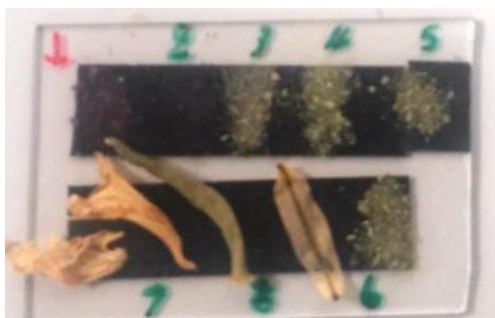
Το φάσμα αποτελείται από τον συνδυασμό ενός συνεχούς φάσματος υποβάθρου και από χαρακτηριστικές κορυφές. Οι κορυφές είναι χαρακτηριστικές των στοιχείων. Στον κατακόρυφο άξονα αναπαρίστανται η ένταση του σήματος και στον οριζόντιο η ενέργεια των φωτονίων ακτίνων Χ μετρημένη σε keV. Υπενθυμίζεται ότι 1 eV (ηλεκτρονιοβόλτ) ισούται με την κινητική ενέργεια που αποκτά ένα ηλεκτρόνιο όταν επιταχύνεται από διαφορά δυναμικού (τάση) 1 V (εικόνα από Roomans and Dragomir 2007).

στοιχεία (Egerton 2005). Συμπληρωματικά υπάρχουν μέθοδοι για ημιποσοτικό προσδιορισμό των στοιχείων, δηλαδή για προσδιορισμό των σχετικών τους στοιχειακών συγκεντρώσεων (Frey 2007, Roomans and Dragomir 2007).

Η στοιχειακή ανάλυση με αυτήν την τεχνική είναι ταχεία αλλά υπόκειται σε ορισμένους περιορισμούς. Δεν μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ διαφορετικών ισοτόπων ή διαφορετικών οξειδωτικών καταστάσεων του ίδιου στοιχείου (Frey 2007). Η μέθοδος αυτή δεν είναι κατάλληλη για την ανίχνευση ιχνοστοιχείων καθώς η ελάχιστη συγκέντρωση στοιχείου που μπορεί να ανιχνευτεί είναι μερικά mmol/kg ή μερικά εκατοντάδες ppm (το πολύ μέχρι ~100 ppm), (Roomans and Dragomir 2007, Fernandez-Segura and Warley 2008) και η ελάχιστη ποσότητα της τάξης των  $10^{-18}$  g (Roomans and Dragomir 2007). Επειδή η ανάλυση είναι στοιχειακή είναι προτιμότερο να μην αναμιγνύονται στο δείγμα χωρίς λόγο επιπλέον στοιχεία. Για αυτόν τον λόγο είναι προτιμότερο τα δείγματα να μην είναι καλυμμένα με χρυσό ή αναμεμιγμένα με άλλα βαρέα μέταλλα (Roomans and Dragomir 2007). Είναι καλύτερο τα δείγματα να μην έχουν υποστεί διαδικασία μονιμοποίησης γιατί παρατηρείται έντονη απώλεια διαλυτών ιόντων όπως νάτριο, κάλιο, χλώριο, μαγνήσιο και ασβέστιο, εκτός αν είναι πολύ ισχυρά προσδεμένα στον ιστό (Roomans and Dragomir 2007,

Τα δεδομένα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τον ποσοτικό προσδιορισμό του δείγματος μετά από σχετικές διορθώσεις, αν και οι πιο συνήθεις αυτόματες διορθώσεις κρίνονται ακατάλληλες για βιολογικά υλικά (Fernandez-Segura and Warley 2008), καθώς έχουν αναπτυχθεί για μεταλλουργικά υλικά που έχουν αρκετά διαφορετικές ιδιότητες (Roomans and Dragomir 2007). Ως εναλλακτική, η ποσοτικοποίηση μπορεί να βασιστεί στον λόγο της έντασης της κορυφής, προς την ένταση του σήματος υποβάθρου στην ίδια θέση (ενέργεια) (Roomans and Dragomir 2007). Ωστόσο ο λόγος της έντασης των κορυφών δύο στοιχείων δεν ισοδυναμεί σε λόγο της στοιχειακής συγκέντρωσής τους, γιατί οι ακτίνες Χ δεν εκλύονται με την ίδια αποτελεσματικότητα από τα διάφορα

Fernandez-Segura and Warley 2008). Επίσης είναι προτιμότερο για τα δείγματα να είναι λεπτά (Roomans and Dragomir 2007). Αν όμως το δείγμα είναι υπερβολικά λεπτό (π.χ. μεμονωμένα κύτταρα) τότε υπάρχει ενδεχόμενο να ανιχνευτούν στοιχεία του υποστρώματος, για παράδειγμα αν τα κύτταρα βρίσκονται πάνω σε γυαλί ενδέχεται να ανιχνευτεί πυρίτιο λόγω του γυαλιού (Fernandez-Segura and Warley 2008). Μέχρι πρόσφατα μπορούσε να γίνει ανίχνευση μόνο των στοιχείων με ατομικό αριθμό μεγαλύτερο ή ίσο του 11 (Νάτριο), αλλά ορισμένοι νεότεροι ανιχνευτές μπορούν να ανιχνεύσουν στοιχεία με ατομικό αριθμό μεγαλύτερο ή ίσο του 5 (Βόριο) (Frey 2007). Το λογισμικό ανάλυσης του υπολογιστή έχει κατασκευαστεί σύμφωνα με τις απαιτήσεις του κλάδου της Επιστήμης Υλικών και όχι με της Βιολογίας και έτσι πιθανώς γίνει λανθασμένη αναγνώριση κάποιων στοιχείων επειδή οι κορυφές κάποιων στοιχείων συμπίπτουν. Για αυτόν τον λόγο είναι σημαντικό να γίνεται προσεκτική ταυτοποίηση των στοιχείων με χρήση όσων περισσότερων γραμμών γίνεται (Fernandez-Segura and Warley 2008). Κάποια από τα στοιχεία που έχουν αναλυθεί με τη μέθοδο αυτή σε φυτικούς ιστούς είναι κάλιο, ασβέστιο, στρόντιο, αργίλιο, μαγνήσιο και πυρίτιο (Hodson 2000).



**Εικόνα 2.7:** Δείγματα έτοιμα για παρατήρηση σε SEM-EDS. Τα υλικά που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία βρίσκονται στις θέσεις 1 (λειοτριβημένο ξηρό υλικό κόκκινης περιοχής) και 2 (λειοτριβημένο ξηρό υλικό μαύρης περιοχής).

Για την παρούσα εργασία το κομμάτι της στοιχειακής ανάλυσης πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας «Βασίλης Γαλανόπουλος» του Τμήματος Βιολογίας στο Πανεπιστήμιο Κρήτης, στο Ηράκλειο Κρήτης και η παρατήρηση του υλικού έγινε σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης JEOL JSM-6390LV Scanning Electron Microscope. Ως υλικό χρησιμοποιήθηκε ξηρό λεπτά λειοτριβημένο υλικό από τη μαύρη και την κόκκινη περιοχή των πετάλων του *Paraver rhoeas*, από άνθη που είχαν συλλεχθεί στις 3/4/2018. Μικρή ποσότητα από κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα και κολλήθηκε σε

αυτήν με διπλοκολλητική ταινία (Εικόνα 2.7). Τα δείγματα δεν επικαλύφθηκαν με χρυσό. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην υποδοχή του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης και με τη βοήθεια της εικόνας τους στην οθόνη έγινε εστίαση της ηλεκτρονιακής δέσμης πάνω σε μικρά τμήματα του υλικού. Η επανάληψη της κάθε μέτρησης πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικό σημείο του λειοτριβημένου υλικού. Για κάθε μέτρηση ελήφθησαν η εικόνα του φάσματος από το λογισμικό του υπολογιστή και η σχετική αναφορά κάθε μέτρησης. Η διαφορά δυναμικού (τάση) επιτάχυνσης των ηλεκτρονίων είναι 20 kV.

## 2.6 Φασματοφωτομετρία ορατού-υπεριώδους

Βασικές έννοιες για τη φασματοφωτομετρία ορατού-υπεριώδους είναι η διαπερατότητα (transmittance) και η απορρόφηση (absorbance). Θεωρούμε μία δέσμη μονοχρωματικής ακτινοβολίας η οποία διέρχεται από ένα διάλυμα. Η δέσμη εισέρχεται με φωτεινή ισχύ  $P_0$  στο διάλυμα και εξέρχεται με ισχύ  $P$ . Κατά την αλληλεπίδραση της φωτεινής δέσμης με το διάλυμα, η φωτεινή ισχύς ελαττώνεται, δηλαδή  $P < P_0$ . Η διαπερατότητα ( $T$ ) είναι καθαρός αριθμός και εκφράζεται από τον λόγο  $T = \frac{P}{P_0}$ . Μπορεί να εκφράζεται και σε εκατοστιαία μορφή ( $T\%$ ). Η απορρόφηση ( $A$ ) ορίζεται ως δεκαδικός λογάριθμος του αντίστροφου της διαπερατότητας, δηλαδή  $A = -\log T = \log \frac{P_0}{P}$  και είναι επίσης καθαρός αριθμός. Να σημειωθεί εδώ ότι η διαπερατότητα ορίζεται γραμμικά ενώ η απορρόφηση ορίζεται λογαριθμικά. Δηλαδή μεταβολή της απορρόφησης κατά μία μονάδα συνεπάγεται δεκαπλασιασμό ή υποδεκαπλασιασμό της διαπερατότητας και αντίστροφα. Δηλαδή αν  $A=1$ , συνεπάγεται ότι διέρχεται μόλις το 10% της προσπίπτουσας ισχύος, ενώ  $A=2$  συνεπάγεται ότι διέρχεται μόλις το 1%. Η απορρόφηση μπορεί να αναφέρεται και ως οπτική πυκνότητα (optical density – OD) ή απόσβεση (extinction – E) (Χατζηιωάννου και Κούππαρης 2014). Αξίζει επίσης να διαχωριστεί ο τρόπος ορισμού και υπολογισμού της απορρόφησης (absorbance) που μετριέται κατευθείαν από το φασματοφωτόμετρο (μέσω της διαπερατότητας) και της απορρόφησης (absorbance) που υπολογίζεται έμμεσα από της τιμές διαπερατότητας και ανάκλασης. Στην παρούσα εργασία έχει χρησιμοποιηθεί η έννοια της απορρόφησης absorbance όταν γίνεται αναφορά σε διαλύματα εκχυλίσματος ιστού και η έννοια της απορρόφησης absorbance όταν γίνεται αναφορά σε μετρήσεις σε άθικτους ιστούς.

Η ποσοτικοποίηση μιας ουσίας με τη χρήση φασματοφωτόμετρου ορατού-υπεριώδους βασίζεται στον νόμο των Beer-Lambert. Σύμφωνα με τον νόμο αυτόν η απορρόφηση του διαλύματος μιας ουσίας είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση μιας ουσίας και του μήκους διαδρομής του φωτός μέσα στο διάλυμα. Δηλαδή  $A = abc_{g/L} = \epsilon bc_{mol/L}$ , όπου  $b$  συμβολίζεται το μήκος της διαδρομής (σε cm),  $a$  ο συντελεστής αναλογίας εκφρασμένος σε  $g^{-1}Lcm^{-1}$  (απορροφητικότητα ή συντελεστής απόσβεσης) και  $\epsilon$  ο συντελεστής αναλογίας εκφρασμένος σε  $mol^{-1}Lcm^{-1}$ . Μεταξύ τους ισχύει η σχέση  $\epsilon = aMB$ , όπου  $MB$  το μοριακό βάρος της διαλυμένης ουσίας. Η ποσοτικοποίηση δείγματος άγνωστης συγκέντρωσης συνήθως προϋποθέτει την κατασκευή πρότυπης καμπύλης (ευθείας) απορρόφησης-συγκέντρωσης από δείγματα γνωστής συγκέντρωσης με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων (Χατζηιωάννου και Κούππαρης 2014).

Ο Νόμος των Beer-Lambert εφαρμόζεται και σε μίγματα ουσιών, στα οποία η μετρούμενη απορρόφηση θεωρείται ως άθροισμα των επιμέρους απορροφήσεων για κάθε μία διαλυμένη ουσία και για κάθε μία εφαρμόζεται ανεξάρτητα ο νόμος των Beer-Lambert. Εν γένει η ακρίβεια της ποσοτικοποίησης μειώνεται όσο αυξάνεται ο αριθμός των διαλυμένων ουσιών και συχνά δεν χρησιμοποιείται για διαλύματα με περισσότερα από τέσσερα συστατικά (Χατζηιωάννου και Κούππαρης 2014).

Η αναλογία απορρόφησης-συγκέντρωσης δεν ισχύει για υψηλές τιμές συγκέντρωσης στις οποίες υπάρχει θετική ή αρνητική απόκλιση. Αυτές οι αποκλίσεις μπορεί να οφείλονται



στην πυκνότητα των διαλυμάτων ( $c > 0,01M$ ), σε τεχνικές αποκλίσεις των οργάνων και επιπλέον σε ύπαρξη πολυχρωματικής ή παράσιτης ακτινοβολίας ή σε μεσολάβηση χημικών αντιδράσεων (Χατζηιωάννου και Κούππαρης 2014).

Η απεικόνιση της τιμής απορρόφησης ενός διαλύματος σε συνάρτηση με το μήκος κύματος ονομάζεται φάσμα απορρόφησης. Η ποσοτικοποίηση μέσω του νόμου Beer-Lambert γίνεται συνήθως στα σημεία που το διάλυμα της ουσίας εμφανίζει κάποιο μέγιστο στο φάσμα απορρόφησης. Αυτό γίνεται γιατί για τη δεδομένη συγκέντρωση είναι το μήκος κύματος που δίνει μέγιστη απορρόφηση και επομένως επιτυγχάνεται ευαισθησία. Επιπλέον στο σημείο του μεγίστου υπάρχει συνήθως ένα «πλατώ» (plateau) στο φάσμα απορρόφησης και έτσι μικρές μεταβολές στο μήκος κύματος κατά τη διάρκεια της μέτρησης δεν επηρεάζουν ιδιαίτερα το αποτέλεσμα (Χατζηιωάννου και Κούππαρης 2014).

Η οργανολογία του φασματοφωτόμετρου περιλαμβάνει μία πηγή φωτός σταθερής ισχύος, έναν επιλογέα που απομονώνει το επιθυμητό μήκος κύματος (μονοχρωμάτορας), θέση εισδοχής για κυψελίδα με το δείγμα, έναν ανιχνευτή ακτινοβολίας που μετατρέπει το οπτικό σήμα σε ηλεκτρικό και το σύστημα μέτρησης, το οποίο περιλαμβάνει συνήθως ενισχυτή του σήματος και όργανο ανάγνωσης. Για πρακτικούς λόγους δεν μπορεί να μετρηθεί το  $P_0$  και αντί για αυτό χρησιμοποιείται το τυφλό. Το τυφλό είναι ένα επιλεγμένο διάλυμα, ειδικό κάθε φορά, το οποίο ορίζεται στο φωτόμετρο ως διάλυμα μηδενικής απορρόφησης και ως προς αυτό συσχετίζονται οι ακόλουθες μετρήσεις (Χατζηιωάννου και Κούππαρης 2014).

## 2.7 Λήψη φασμάτων απορρόφησης από εκχυλίσματα πετάλων

Για μια γενικότερη άποψη στη φασματική συμπεριφορά των χρωστικών λήφθηκαν τα φάσματα απορρόφησης από την κόκκινη και τη μαύρη περιοχή των πετάλων *Paranervthoeas*. Λήφθηκαν περίπου 0,1 g υλικού στη μορφή ξηρής σκόνης ζυγισμένα σε αναλυτικό ζυγό KERN 770, και τοποθετήθηκαν σε 10 mL διαλύτη. Ακολούθησε ανάδευση και αεροστεγής σφράγιση, και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε σκότος για 1 ημέρα στους 5° C για να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση.

Τα δείγματα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 3500 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά, συλλέχθηκε το υπερκείμενο και αραιώθηκε όπου κρίθηκε απαραίτητο. Το δείγμα φωτομετρήθηκε σε γυάλινες κυψελίδες σε φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους. Amsterdam Biosciences Novaspec III. Η φωτομέτρηση έγινε σε μήκη κύματος από 330 nm έως 800 nm, με βήμα 1 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά ο αντίστοιχος διαλύτης.

Για την εκχύλιση του ξηρού υλικού χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαλύτες: 100% μεθανόλη, 100% αιθανόλη και 80% μεθανόλη - 1% HCl (Πίνακας 2.2). Η απόλυτη μεθανόλη και η απόλυτη αιθανόλη επιλέχθηκαν λόγω της ευρείας χρήσης τους και της ευκολίας εύρεσης σχετικών βιβλιογραφικών δεδομένων και η 80% μεθανόλη - HCl λόγω των καλών αποτελεσμάτων που είχε δώσει στον Αλεξανδρίδης (2004). Η προσθήκη HCl δημιουργεί όξινο pH και σταθεροποιεί το χρώμα των ανθοκυανινών (Swain 1976).

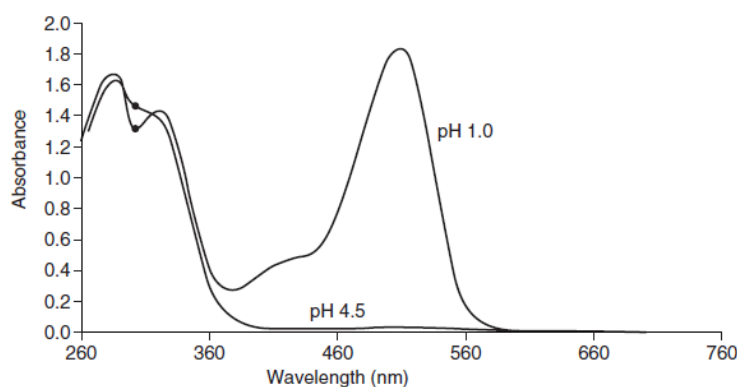
Ανάλογα με τον διαλύτη οι χρωστικές εμφανίζουν μέγιστα απορρόφησης σε διαφορετικές θέσεις. Έτσι στον κατάλληλο διαλύτη, η θέση των κορυφών σε ένα φάσμα απορρόφησης μπορεί να δείξει τη γενικότερη κατηγορία χρωστικών ενός δείγματος και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορούν να γίνουν υποθέσεις και για συγκεκριμένες χρωστικές. Αυτή η αρχή πραγματοποιείται με σύγκριση σε βιβλιογραφικούς καταλόγους που έχουν καταρτισθεί και δείχνουν τη θέση εμφάνιση μεγίστων για χρωστικές ή ομάδες χρωστικών σε διάφορους διαλύτες. Οι χρωστικές περιλαμβάνουν χλωροφύλλες, καροτενοειδή και φλαβονοειδή (Davies 1974, Holden 1974, Swain 1974).

**Πίνακας 2.2: Προετοιμασία των διαλυμάτων εκχύλισης χρωστικών που χρησιμοποιήθηκαν**

Διάλυμα	Παρασκευή διαλύματος
Απόλυτη 100% αιθανόλη (CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH)	Παραλαβή από τα αντιδραστήρια του εργαστηρίου
Απόλυτη 100% μεθανόλη (CH <sub>3</sub> OH)	Παραλαβή από τα αντιδραστήρια του εργαστηρίου
Διάλυμα 80% οξινισμένης μεθανόλης (CH <sub>3</sub> OH) 1% HCl	Αρχικά ανάμιξη 80 mL απόλυτης μεθανόλης με 20 mL απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια διάλυση 1 mL πυκνού HCl στο ανώτερο διάλυμα έως τελικό όγκο 100 mL

## 2.8 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών ανθοκυανινών

Για τον προσδιορισμό του ολικού φορτίου των μονομερών ανθοκυανινών επιλέχθηκε η φασματομετρική μέθοδος του διαφορικού pH (differential pH method). Οι ανθοκυανίνες φέρουν ένα εύρος απορρόφησης περίπου στα 490-550 nm, η οποία δεν συγχέεται με τα φάσματα απορρόφησης άλλων φαινολικών ενώσεων (Giusti and Wrolstad 2001). Η μέθοδος βασίζεται στα διαφορετικά φάσματα απορρόφησης των ανθοκυανινών σε δύο διαφορετικές τιμές pH, και συγκεκριμένα σε ισχυρά όξινο pH=1 και ασθενώς όξινο. Σε pH=1 η ανθοκυανίνη έχει πορτοκαλί έως μωβ χρώμα και βρίσκεται στη μορφή κατιόντος φλαβυλίου. Στη μορφή αυτή παρατηρείται έντονη απορρόφηση στο ορατό φάσμα, με μέγιστο απορρόφησης γύρω στα 520 nm (Εικόνα 2.10). Σε pH=4,5 η ανθοκυανίνη βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ των άχρωμων μορφών ψευδοβάσης και χαλκόνης και δεν απορροφά στο ορατό φάσμα (Εικόνα 2.10). Επομένως η συγκέντρωση των ολικών (μονομερών) ανθοκυανινών μπορεί να υπολογιστεί από την απορρόφηση περίπου στα 520 nm σε pH=1



**Εικόνα 2.10: Φάσματα απορρόφησης απομονωμένων ανθοκυανινών σε διαφορετικό pH.** Φαίνεται ότι η κορυφή του ορατού φάσματος σε pH=1 εξαλείφεται τελείως σε pH=4,5. Σε αυτήν την ιδιότητα βασίζεται η ποσοτικοποίηση ολικών ανθοκυανινών με τη μέθοδο του διαφορικού pH (εικόνα από Giusti and Wrolstad 2001).

μορφές ανθοκυανινών (Giusti and Wrolstad 2001). Για να αφαιρεθεί ο ενδεχόμενος θόρυβος (haze) επιλέγεται να μετρηθεί η απορρόφηση του κάθε διαλύματος (pH=1 και pH=4,5) στα 700 nm, και έπειτα η τιμή αυτή να αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες μετρήσεις. Στο συγκεκριμένο μήκος κύματος δεν αναμένεται απορρόφηση από κανενός είδους χρωστική στο διάλυμα, και η απορρόφηση αναμένεται να είναι πολύ μικρή. Η απορρόφηση θα οφείλεται σε φαινόμενα σκέδασης (scattering) του φωτός σε σωματίδια του διαλύματος, τα οποία σε αυξημένη συγκέντρωση προσδίδουν θολερότητα (Giusti and Wrolstad 2001).

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου αυτής έχει επιβεβαιωθεί για ποικιλία φυσικών χυμών και υγρών (Lee *et al.* 2005). Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ανθοκυανινών βασίζεται στα πρωτόκολλα των Giusti and Wrolstad (2001) και Lee *et al.* (2005) μετά από τροποποιήσεις που προέκυψαν από σχετικά προπαρασκευαστικά πειράματα.

Για την εκχύλιση των ανθοκυανινών χρησιμοποιήθηκε μικρή ποσότητα ξηρού υλικού (περίπου 0,1 g, όταν επαρκούσε η ποσότητα, ζυγισμένα σε αναλυτικό ζυγό KERN 770

τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων). Εξετάστηκε υλικό από την κόκκινη και τη μαύρη περιοχή των πετάλων του *Paraver rhoeas* από τέσσερις ημερομηνίες συλλογής. Κατά την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης μεθανολικό διάλυμα 1% HCl (Πίνακας 2.3), στις περισσότερες περιπτώσεις σε ποσότητα 10 mL ανά δείγμα. Σε κάθε περίπτωση ακολούθησε ανάδευση και η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε στο σκοτάδι στους 5° C για 24 ώρες. Το όξινο pH χρειάζεται για την αποτροπή της μετατροπής των ανθοκαουανινών στη μορφή της ψευδοβάσης (Swain 1974).

Για pH=1 χρησιμοποιήθηκες υδατικό διάλυμα KCl 0,025 M οξινισμένο με κατάλληλη ποσότητα πυκνού HCl (Πίνακας 2.3). Για pH=4.5 χρησιμοποιήθηκες υδατικό διάλυμα CH<sub>3</sub>COONa 0,4 M οξινισμένο με κατάλληλη ποσότητα πυκνού HCl (Πίνακας 2.3). Κατά την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων το pH ελέγχθηκε με πεχάμετρο σε πολυαναλυτή CONSORT C830 multi-parameter analyser. Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν φυλάχθηκαν σε πωματισμένες γυάλινες φιάλες στους 5° C. Ως τυφλό διάλυμα για τον μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου σε κάθε μέτρηση χρησιμοποιήθηκες για ευκολία και ταχύτητα απιονισμένο νερό, καθώς έχει μετρηθεί ότι δεν υπάρχει ουσιαστική διαφορά από την αντικατάσταση του ρυθμιστικού διαλύματος με απιονισμένο νερό στο τυφλό στις τελικές τιμές μέτρησης (Giusti and Wrolstad 2001).

**Πίνακας 2.3: Προετοιμασία διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ποσοτικοποίηση των ανθοκαουανινών**

Διάλυμα	Παρασκευή διαλύματος
Μεθανολικό διάλυμα 1% HCl	Διάλυση 1 mL πυκνού HCl σε απόλυτη μεθανόλη έως τελικό όγκο 100 mL.
Ρυθμιστικό διάλυμα KCl 0,025 M, pH=1	Διάλυση 0,744 g KCl σε περίπου 380 mL απιονισμένο νερό, και προσθήκη κατάλληλης ποσότητας πυκνού HCl (περίπου 11 mL) έως το διάλυμα να φτάσει σε pH=1. Συμπλήρωση με απιονισμένο νερό έως τελικό όγκο 400 mL.
Ρυθμιστικό διάλυμα CH <sub>3</sub> COONa 0,4 M, pH=4,5	Διάλυση 13,13 g άνυδρου CH <sub>3</sub> COONa σε απιονισμένο νερό σε όγκο έως περίπου 380 mL, και προσθήκη κατάλληλης ποσότητας πυκνού HCl (περίπου 14 mL) έως το διάλυμα να φτάσει σε pH=4,5. Συμπλήρωση με απιονισμένο νερό έως τελικό όγκο 400 mL.

Μετά από την εκχύλιση του υλικού για 1 ημέρα, ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3500 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά. Αφού φυγοκεντρήθηκαν τα στερεά κυτταρικά υπολείμματα, συλλέχθηκε το υπερκείμενο διάλυμα και αραιώθηκε -στις περισσότερες- περιπτώσεις 1:20 δηλαδή 0,5 mL εκχυλίσματος σε 19,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος (pH=7 και 4,5). Η αραιώση αυτή (1:200 g ξηρού ιστού προς τελικό όγκο) κρίθηκε η καταλληλότερη σύμφωνα με προκαταρκτικά πειράματα. Στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση και φωτομέτρηση στα 520 (μέγιστο απορρόφησης σύμφωνα με προκαταρκτικά πειράματα) και 690 nm- είχε πρώτα βρεθεί ότι δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στις μετρήσεις ανάμεσα στα 690 και 700 nm. Η φωτομέτρηση έγινε σε φασματοφωτόμετρο Pharmacia Biotech Novaspec II, σε κυψελίδες χαλαζία. Η φωτομέτρηση έγινε μετά από 15 λεπτά από την παρασκευή των τελικών διαλυμάτων αλλά σε λιγότερο από μία ώρα (Giusti and Wrolstad 2001).

Στα 690 nm οι μετρήσεις απορρόφησης λάμβαναν πολύ μικρές τιμές όπως αναμενόταν. Στα 520 nm λήφθηκε ζεύγος μετρήσεων για κάθε διάλυμα, οι οποίες δεν απέκλιναν μεταξύ τους. Λόγω του μικρού αριθμού μετρήσεων δεν υπολογίστηκε τυπικό σφάλμα, αλλά αντί αυτού υπολογίστηκε η μέση τιμή και ένα μέγιστο εύρος (ελάχιστο και μέγιστο) μέσα στο οποίο κυμαίνεται σύμφωνα με το ζεύγος μετρήσεων. Οι δύο τιμές μετρήσεων αναπαριστούν τα όρια του εύρους των θεωρητικά «φυσιολογικών» τιμών (Τριχόπουλος *et al.* 2001).

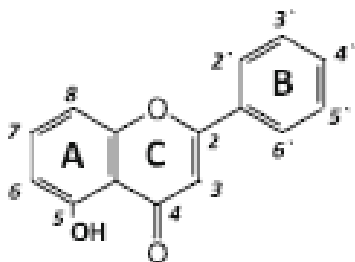
Η απορρόφηση που αντιστοιχεί στις ανθοκυανίνες υπολογίστηκε ως η διαφορά του  $pH=4,5$  (άχρωμη μορφή ανθοκυανινών) από το  $pH=1$  (έγχρωμη μορφή ανθοκυανινών) στα 520 nm (μέγιστο απορρόφησης) αφού πρώτα έχει αφαιρεθεί η απορρόφηση στα 690 nm λόγω σκέδασης. Δηλαδή η απορρόφηση λόγω ανθοκυανινών υπολογίστηκε ως:

$$A_{\text{ανθοκυανινών}} = (A_{520} - A_{690})_{pH=1} - (A_{520} - A_{690})_{pH=4,5}$$

Στη συνέχεια η απορρόφηση αντιστοιχήθηκε σε συγκέντρωση ισοδυνάμων ανθοκυανίνης σύμφωνα με τον νόμο των Beer-Lambert. Η χημική σύσταση των ανθοκυανινών στο υλικό δεν είναι γνωστή, αν και υπάρχει άποψη για γλυκοζίτες πελαργονιδίνης ή κυανιδίνης στην κόκκινη περιοχή σύμφωνα με Αργυρόπουλος (2009). Για αυτόν τον λόγο ως ισοδύναμο για την αντιστοιχία επιλέχθηκε ο 3-γλυκοζίτης γλυκόζης της κυανιδίνης, και επιπλέον επειδή είναι η πιο κοινή ανθοκυανίνη στη φύση (Giusti and Wrolstad 2001, Lee *et al.* 2005). Ως μοριακό του βάρος (molecular weight) χρησιμοποιήθηκε η τιμή 449.2 g/mol και ως συντελεστής εξασθένησης η τιμή  $26900 \text{ mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$  (Giusti and Wrolstad 2001, Lee *et al.* 2005). Όπως προκύπτει από τον νόμο των Beer-Lambert η συγκέντρωση των ολικών ανθοκυανινών υπολογίζεται από τη σχέση:  $\text{συγκέντρωση (g/L)} = \frac{A * MW * DF}{\epsilon * d}$  (διαμορφωμένο βασιζόμενο σε Giusti and Wrolstad (2001) και Lee *et al.*(2005)), όπου A είναι η διορθωμένη απορρόφηση όπως παρουσιάστηκε παραπάνω, MW και  $\epsilon$  το μοριακό βάρος και ο συντελεστής εξασθένησης αντίστοιχα του ισοδυνάμου 3-γλυκοζίτη γλυκόζης κυανιδίνης, DF είναι ο συντελεστής αραιώσης όπως προκύπτει από τις αναλογίες κατά τις αραιώσεις και d είναι το πλάτος της κυψελίδας σε cm, εν προκειμένω 1 cm. Στη συνέχεια ακολούθησε αναγωγή της συγκέντρωσης ανά γραμμάριο ξηρού και νωπού υλικού.

## 2.9 Ποσοτικός προσδιορισμός «ολικών φλαβονοειδών»

Η φασματομετρική μέθοδος προσδιορισμού των «ολικών φλαβονοειδών» (total flavonoid ή flavonoid content) στηρίζεται στη συμπλοκοποίηση των φλαβονοειδών με  $Al^{3+}$ . Παρά το όνομά της δεν υπολογίζει τα ολικά φλαβονοειδή αλλά το αποτέλεσμα εξαρτάται από την παραλλαγή της μεθόδου που εφαρμόζεται (Paroti *et al.* 2011, Pekal and Pyrzynska 2014).



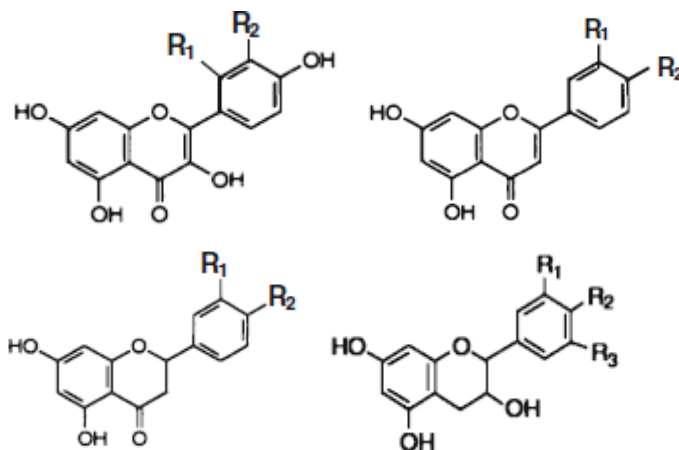
**Εικόνα 2.11: Γενικευμένη δομή φλαβονοειδούς.** Εικονίζεται η αρίθμηση των ατόμων άνθρακα (εικόνα από Pekal and Pyrzynska 2014).

Η αρχή της μεθόδου οφείλεται στη συμπλοκοποίηση των κατιόντων  $Al^{3+}$ . Ένα κατιόν αργιλίου μπορεί να σχηματίσει ένα, δύο ή και τρεις δεσμούς με τον ίδιο ή διαφορετικούς προσδέτες (ligands) (Paroti *et al.* 2011). Ως προσδέτες μπορούν να δράσουν όσα φλαβονοειδή φέρουν 5- ή 3-υδροξυ-4-κετονομάδες ή/και σε όξινες συνθήκες όλες οι ο-διυδροξυλομάδες. Οι 3'-, 4'-διυδροξυλομάδες του δακτυλίου B φαίνεται να έχουν μικρότερη επίδραση (Εικόνα 2.11) (Paroti *et al.* 2011).

Υπάρχει μεγάλη διακύμανση ως προς τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται, όπως αναφέρεται από τις Pekal and Pyrzynska (2014). Γενικά χρησιμοποιούνται δύο

κύριες μορφές πρωτοκόλλων. Στην πρώτη χρησιμοποιείται  $AlCl_3$  2-10% (μάζα/όγκο) και η αντίδραση γίνεται σε όξινες, ή σπανιότερα σε ουδέτερες συνθήκες. Η φωτομέτρηση γίνεται στην περιοχή 404-430 nm και για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιείται φλαβονόλη όπως κερκετίνη (quercetin), ρουτίνη (rutin), κερκετρίνη (quercetrin), γαλανγίνη (galangin) ή η φλαβαν-3-όλη κατεχίνη (catechin) (Pekal and Pyrzynska 2014).

Συγκριτική μελέτη μεταξύ των κλάσεων των φλαβονοειδών (Εικόνα 2.12) από τις Pekal and Pyrzynska (2014) έδειξε ότι με την πρώτη μέθοδο οι φλαβονόλες (Εικόνα 2.12) σχηματίζουν ισχυρά σύμπλοκα με το αργίλιο λόγω των θέσεων C-4 και C-5, ανεξάρτητα από τις ομάδες του δακτυλίου-B. Η μέγιστη απορρόφηση εμφανίζεται στην περιοχή 415-425 nm, και η



**Εικόνα 2.12: Γενικευμένες μορφές κοινών κατηγοριών φλαβονοειδών.** Εικονίζονται οι βασικές δομές φλαβονόλης (άνω αριστερά), φλαβόνης (άνω δεξιά), φλαβανόνης (κάτω αριστερά) και φλαβαν-3-όλης (κάτω δεξιά) (εικόνα από Pekal and Pyrzynska 2014).

γλυκοζυλίωση στον C-3 άνθρακα δεν εμποδίζει την οπτική απορρόφηση σε σχέση με τις αγλυκόνες, αντίθετα με ευρήματα προηγούμενης μελέτης από τους Denni and Mammen (2012) όπως αναφέρεται από Pekal and Pyrzynska (2014). Οι φλαβόνες (Εικόνα 2.12) που



φέρουν ο-διυδροξυλομάδα στον Β-δακτύλιο εμφανίζουν ισχυρή απορρόφηση στα 405-420 nm, ενώ οι υπόλοιπες φλαβόνες φέρουν μετατοπισμένα μέγιστα απορρόφησης στα 377 nm. Η απορρόφηση των φλαβανονών (Εικόνα 2.12) κοντά στα 420 nm είναι πολύ μικρή για ποσοτικό προσδιορισμό και η φλαβαν-3-όλη (Εικόνα 2.12)κατεχίνη εμφανίζει μέγιστο πολύ πιο χαμηλά από τα 400 nm σε βαθμό που δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα (Pekal and Pyrzynska 2014). Γενικά στα αποτελέσματα από αυτά τα πρωτόκολλα δεν φαίνεται να έχει μεγάλη σημασία ο δακτύλιος Β (Paroti *et al.* 2011).

Στη δεύτερη κατηγορία πρωτοκόλλων η αντίδραση συμπλοκοποίησης γίνεται αλκαλικό περιβάλλον παρουσία  $\text{NaNO}_2$ . Η φωτομέτρηση γίνεται στα 510 nm και για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιείται η κατεχίνη (Pekal and Pyrzynska 2014). Η προσθήκη  $\text{NaNO}_2$  προκαλεί τη νιτροποίηση (nitration) κάθε ο-διυδροξυλομάδας σε αρωματικούς δακτυλίους (ο-διφαινόλες) εφόσον στις 3 από τις 4 θέσεις (δύο ο-υδροξύλια και οι σχετικοί άνθρακες) δεν υπάρχει υποκατάσταση ή στερεοδομική παρεμπόδιση (Paroti *et al.* 2011, Pekal and Pyrzynska 2014).

Η δεύτερη μέθοδος είναι πολύ πιο εκλεκτική στα φλαβονοειδή που ανιχνεύει, χωρίς αυτό να ανταποκρίνεται σε συγκεκριμένες κλάσεις φλαβονοειδών. Για παράδειγμα, ανιχνεύει τη φλαβονόλη ρουτίνη αλλά όχι άλλες φλαβονόλες, τη φλαβόνη λουτεολίνη αλλά όχι άλλες φλαβόνες και τη φλαβαν-3-όλη κατεχίνη. Επιπλέον ανιχνεύει και άλλες αρωματικές ενώσεις με ο-διυδροξυλομάδα που δεν ανήκουν στα φλαβονοειδή (Pekal and Pyrzynska 2014). Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων αποτελούν οι ενώσεις ολευροπεΐνη (oleuropein) και καφεϊκό οξύ (caffeic acid) (Paroti *et al.* 2011).

Επομένως φαίνεται ότι η ονομασία προσδιορισμός των «ολικών φλαβονοειδών» είναι παραπλανητική. Επιπλέον μεταξύ των δύο διαφορετικών διαδικασιών παρατηρείται μεγάλη διαφορά στα αποτελέσματα (Paroti *et al.* 2011, Pekal and Pyrzynska 2014). Θεωρείται ότι η εκδοχή αντίδρασης σε όξινο pH χωρίς  $\text{NaNO}_2$ , είναι περισσότερο ακριβής (Paroti *et al.* 2011). Η μέθοδος αυτή αναφέρεται και ως μέθοδος προσδιορισμού ολικών φλαβονών και φλαβονολών (total flavones and flavonols), διότι περιορίζεται σε αυτές (Chang *et al.* 2002, Cvek *et al.* 2007).

Λόγω της υδατοδιαλυτής φύσης των περισσότερων φλαβονοειδών είναι προτιμότερο να χρησιμοποιείται κάποιος πολικός διαλύτης για εκχύλιση όπως νερό ή αλκοόλη. Ωστόσο η εκχύλιση με νερό ή κυρίως υδατικά διαλύματα μπορεί να έχει δυσλειτουργικές επιπτώσεις όπως η συν-απομόνωση και άλλων ουσιών που αλληλεπιδρούν με τα φλαβονοειδή, η πιθανή δραστικότητα γλυκοσιδασών, φαινολασών και άλλων υδρολυτικών ενζύμων και η αδυναμία απομόνωσης μη υδρόφιλων φλαβονοειδών (Swain 1974). Συνηθέστεροι διαλύτες εκχύλισης είναι η μεθανόλη και η αιθανόλη. Ωστόσο η κατάλληλη επιλογή διαλύτη μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το είδος του φυτικού δείγματος και το γενικότερο βιοχημικό και χημικό του περιεχόμενο (Swain 1974).

Αν χρειάζεται να γίνει μια αδρή κατηγοριοποίηση των φλαβονοειδών ενός δείγματος με φασματοφωτομετρικές μεθόδους αυτό μπορεί να γίνει με παρατήρηση του φάσματος απορρόφησης. Σε πολλά φλαβονοειδή παρατηρείται η τάση αύξησης της θέσης μεγίστου απορρόφησης όσο αυξάνονται οι υδροξυλομάδες του φλαβονοειδούς. Συμπληρωματικά

μπορούν να ληφθούν μετρήσεις σε διαφορετικά pH ή με την παρουσία ιόντων αργιλίου (Swain 1974).

Μετά από κάποια προπειράματα και από βιβλιογραφική μελέτη επιλέχθηκε να ακολουθηθεί η πρώτη μέθοδος, δηλαδή χωρίς το  $\text{NaNO}_2$ . Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης επιλέχθηκε η φλαβονόλη κερκετίνη. Λόγω έλλειψης αντιδραστηρίων η πρότυπη καμπύλη δεν κατασκευάστηκε αλλά χρησιμοποιήθηκε η πρότυπη καμπύλη όπως παρασκευάστηκε από τους Paroti *et al.* (2011). Η πρότυπη καμπύλη κερκετίνης είναι η ευθεία  $y=11,33x-0,04$  ( $R^2=0,9759$ ), όπου  $x$  η συγκέντρωση κερκετίνης σε mM και  $y$  η απορρόφηση. Για την σωστότερη πειραματική αντιμετώπιση, στα πειράματα ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία προσδιορισμού των φλαβονοειδών, σύμφωνα με Paroti *et al.* (2011) με βάση τους Cvek *et al.* (2007), ακριβώς όπως ακολουθήθηκε και για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης. Για τη διαδικασία εξαγωγής ακολουθήθηκε για όλα τα δείγματα η διαδικασία που θεωρήθηκε η βέλτιστη για φύλλα ελιάς (Paroti *et al.* 2011), δηλαδή απόλυτη αιθανόλη για 1 ημέρα στους  $4^\circ\text{C}$  σε σκότος. Συμπληρωματικά χρησιμοποιήθηκε ως μέσω εκχύλισης 80% αιθανόλη (Πίνακας 2.4) (Chang *et al.* 2002, Cvek *et al.* 2007) για 1 ημέρα σε θερμοκρασία δωματίου.

**Πίνακας 2.4: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον προσδιορισμό των «ολικών φλαβονοειδών»**

Διάλυμα	Παρασκευή διαλύματος
Απόλυτη 100% αιθανόλη ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ )	Παραλαβή από τα αντιδραστήρια του εργαστηρίου
Διάλυμα 80% αιθανόλης ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ )	Ανάμιξη 80 mL 100% αιθανόλης με 20 mL απιονισμένο νερό
Διάλυμα 5% οξικού οξέος ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) σε μεθανόλη ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )	Διάλυση 5 mL άνυδρου οξικού οξέος σε απόλυτη μεθανόλη έως τελικό όγκο 100 mL
Διάλυμα 2% χλωριούχου αργιλίου ( $\text{AlCl}_3$ ) σε οξινισμένη μεθανόλη	Αργή διάλυση 2 g χλωριούχου αργιλίου σε διάλυμα οξινισμένης μεθανόλης (5% $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) έως τελικό όγκο 100 mL

Η εκχύλιση έγινε με 0,1 g ξηρού υλικού (όπου επαρκούσε το υλικό), μετρημένων σε αναλυτικό ζυγό KERN 770, σε 10 mL διαλύτη. Μετά ακολούθησε φυγοκέντρηση του υλικού για 10 λεπτά στις 3500 στροφές/λεπτό και στη συνέχεια λήφθηκε το υπερκείμενο. Στη συνέχεια έγινε ανάμιξη 2 mL δείγματος (το υπερκείμενο μετά από κατάλληλη αραιώση), με 2,8 mL 5% οξινισμένης μεθανόλης (Πίνακας 2.4) και 0,2 mL 2%  $\text{AlCl}_3$  σε οξινισμένη μεθανόλη (Πίνακας 2.4). Ακολούθησε ανάμιξη και αναμονή για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε σκότος. Η φωτομέτρηση έγινε στα 415 nm, όπως και για την πρότυπη καμπύλη. Στο τυφλό για τον μηδενισμό του φωτόμετρου χρησιμοποιήθηκε το ίδιο μίγμα με τη διαφορά ότι αντί για δείγμα χρησιμοποιήθηκε ίδια ποσότητα διαλύτη εκχύλισης. Η φωτομέτρηση έγινε σε κυψελίδες χαλαζία σε φασματοφωτόμετρο Pharmacia Biotech Novaspec II. Μετά την αντιστοίχιση της απορρόφησης σε ισοδύναμα κερσετίνης, ακολούθησε η κατάλληλη αναγωγή σε mg ολικών φλαβονών και φλαβονολών ανά g ξηρής

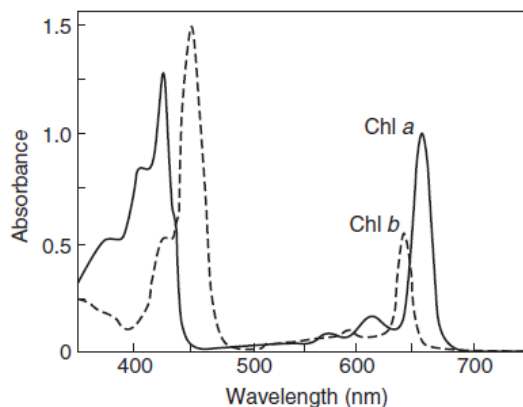
και νωπής μάζας ιστού για την κόκκινη και τη μαύρη περιοχή του *Paraver rhoeas* για τέσσερις ημερομηνίες συλλογής.

Κάθε δείγμα φωτομετρήθηκε τρεις φορές για εξάλειψη των σφαλμάτων του φωτομέτρου. Από κάθε τριάδα μετρήσεων υπολογίστηκε η μέση τιμή όρος ( $\bar{x}$ ) και το τυπικό σφάλμα του μέσου (SE) που αντιστοιχεί στο σφάλμα του οργάνου. Σε κάποιες περιπτώσεις στον υπολογισμό συνυπολογίστηκαν μετρήσεις απορρόφησης του ίδιου δείγματος που είχε υποστεί αραίωση διαφορετικού βαθμού. Η προσθαφαίρεση του τυπικού σφάλματος του μέσου γύρω από τη μέση τιμή αντιστοιχεί το εύρος τιμών στο οποίο βρίσκεται η πραγματική τιμή κατά πιθανότητα 68% (Τριχόπουλος *et al.* 2001, Τρικαλινός 2015), υπό τη θεώρηση ότι η κατανομή των μετρήσεων γύρω από τη μέση («πραγματική») τιμή είναι κανονική (Τριχόπουλος *et al.* 2001). Για τον υπολογισμό του τελικού σφάλματος στη συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν οι μαθηματικές κανόνες διάδοσης σφαλμάτων σύμφωνα με τον Τρικαλινό (2015). Στις τελικές τιμές συγκέντρωσης υπολογίστηκε το διάστημα στο οποίο βρίσκεται η πραγματική τιμή κατά πιθανότητα 95% ( $\bar{x} \pm 1,96 * SE$ ), με την προϋπόθεση της κανονικής κατανομής (Τριχόπουλος *et al.* 2001).

## 2.10 Ποσοτικός προσδιορισμός χλωροφυλλών και ολικών καροτενοειδών

Έχουν γίνει διαχρονικά προσπάθειες ποσοτικοποίησης της χλωροφύλλης α, της χλωροφύλλης β και των ολικών καροτενοειδών (καροτένια και ξανθοφύλλες) από ένα διάλυμα με απλές φασματομετρικές μετρήσεις.

Προκειμένου να κατασκευαστούν αυτές οι εξισώσεις ώστε να είναι διαθέσιμες για ευρεία χρήση πρέπει πρώτα να επιλεγθεί ο κατάλληλος διαλύτης (π.χ. διαιθυλαιθέρας) και να



**Εικόνα 2.13: Φάσματα απορρόφησης χλωροφύλλης α και χλωροφύλλης β σε διαιθυλαιθέρα.** Το φάσμα της χλωροφύλλης α εικονίζεται με συνεχή γραμμή και της χλωροφύλλης β με διακεκομμένη. Κάθε χλωροφύλλη παρουσιάζει δύο μέγιστα στην ορατή περιοχή, ένα στην κόκκινη και ένα στην κυανή. Η ποσοτικοποίηση σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο κείμενο γίνεται με τα μέγιστα της κόκκινη περιοχής (εικόνα από Lichtenthaler and Buschmann 2001a).

ληφθούν αναλυτικά τα φάσματα από διαλύματα χλωροφύλλης α και β και επιλεγμένα καροτενοειδή (Lichtenthaler and Buschmann 2001a). Οι χλωροφύλλες απορροφούν στην κυανή και την κόκκινη περιοχή του ορατού φάσματος (Εικόνα 2.13). Η χλωροφύλλη α φέρει δύο μέγιστα περίπου στα 428 nm (κυανή περιοχή) και 661 nm (κόκκινη περιοχή) και η χλωροφύλλη β φέρει μετατοπισμένες θέσεις μεγίστων περίπου στα 453 nm (κυανή περιοχή) και στα 642 nm (κόκκινη περιοχή) (Εικόνα 2.13). Τα μεμονωμένα καροτενοειδή φέρουν απορρόφηση σε μία ευρύτερη κυανή περιοχή μεταξύ 400 nm και 500 nm και το φάσμα τους εμφανίζει εκεί 2-3 μέγιστα (maxima) (Εικόνα 2.14) (Lichtenthaler and Buschmann 2001a).

Η θέση των μεγίστων απορρόφησης εξαρτάται από τον διαλύτη και ως έναν βαθμό και από το φασματοφωτόμετρο. Όσο αυξάνεται η πολικότητα του διαλύτη τα μέγιστα των χλωροφυλλών μετατοπίζονται σημαντικά προς μεγαλύτερα μήκη κύματος. Σημαντικές αλλαγές επέρχονται και στους συντελεστές απορρόφησης για κάθε μήκος κύματος (absorption coefficient). Λόγω του φασματοφωτόμετρου η θέση του μεγίστου μπορεί να διαφέρει κατά 1-1,5 nm (Lichtenthaler and Buschmann 2001a).

Η ποσοτικοποίηση των χρωστικών γίνεται με βάση τον νόμο των Beer-Lambert, σύμφωνα με τον οποίο η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης – εντός κάποιων ορίων – δηλαδή  $A = \alpha_w d$ , όπου  $A$  είναι η απορρόφηση,  $\alpha$  ο ειδικός συντελεστής απορρόφησης (specific absorbance coefficient) μετρημένος σε  $L g^{-1} cm^{-1}$ ,  $c_w$  η συγκέντρωση σε g/L και  $d$  το πλάτος της κυψελίδας σε cm (συνήθως 1). Ο συντελεστής απορρόφησης εξαρτάται από τη διαλυμένη ουσία, τον διαλύτη και το μήκος κύματος (Lichtenthaler and Buschmann 2001a). Ο νόμος των Beer-Lambert ισχύει και αθροιστικά αν η απορρόφηση ενός μίγματος αναλυθεί στις επιμέρους απορροφήσεις των συστατικών του. Για τις χλωροφύλλες χρησιμοποιούνται οι κορυφές στην κυανή περιοχή, έστω  $\max_a$  και  $\max_b$  για τις χλωροφύλλες α και β αντίστοιχα, ώστε να μην εμπλέκονται τα καροτενοειδή στην

απορρόφηση (Lichtenthaler and Buschmann 2001a). Επομένως για ένα μίγμα των χρωστικών ισχύει γενικά  $A = A_{\text{chla}} + A_{\text{chlb}}$ .

Για τη θέση μεγίστου της α ισχύει:

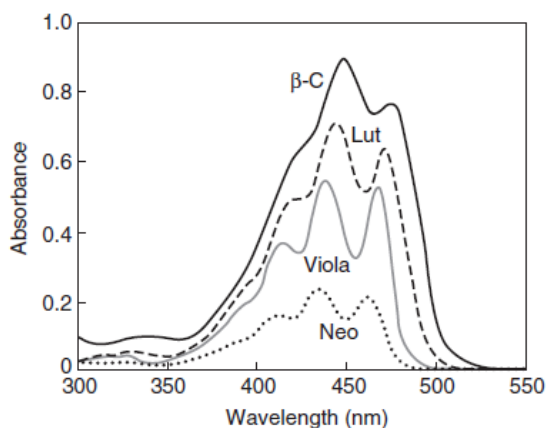
$$A_{\text{maxa}} = (A_{\text{maxa}})_a + (A_{\text{maxa}})_b = \alpha_{\text{maxa,a}}c_a d + \alpha_{\text{maxa,b}}c_b d$$

Αντίστοιχα για τη θέση μεγίστου της β ισχύει:

$$A_{\text{maxb}} = (A_{\text{maxb}})_a + (A_{\text{maxb}})_b = \alpha_{\text{maxb,a}}c_a d + \alpha_{\text{maxb,b}}c_b d$$

Από τις συγκεκριμένες δύο εξισώσεις ζητούμενες (άγνωστες) είναι οι τιμές συγκέντρωσης. Οι τιμές ολικής απορρόφησης μετριοούνται με φωτόμετρο στο δείγμα ενώ οι τιμές των συντελεστών απορρόφησης έχουν υπολογιστεί από μετρήσεις σε καθαρά διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης. Στην ουσία μόνοι άγνωστοι από τις δύο εξισώσεις είναι οι δύο τιμές συγκέντρωσης. Αν το σύστημα επιλυθεί ως προς τις δύο αυτές τιμές προκύπτουν οι ακόλουθες εξισώσεις:

$$c_a = \frac{\alpha_{\text{maxb,b}} A_{\text{maxa}}}{z} - \frac{\alpha_{\text{maxa,b}} A_{\text{maxb}}}{z} \text{ και } c_b = \frac{\alpha_{\text{maxa,a}} A_{\text{maxb}}}{z} - \frac{\alpha_{\text{maxb,a}} A_{\text{maxa}}}{z}$$



**Εικόνα 2.14: Φάσματα απορρόφησης κοινών καροτενοειδών σε διαιθυλαιθέρα.** Τα καροτενοειδή είναι β-καροτένιο (σκούρα γραμμή), λουτεΐνη (διακεκομμένη γραμμή), βιολαξανθίνη (γκρι γραμμή) και νεοξανθίνη (στικτή γραμμή). Το κάθε καροτενοειδές εμφανίζει 2-3 μέγιστα. Η ποσοτικοποίηση των ολικών καροτενοειδών, με τη μέθοδο που περιγράφεται στο κείμενο, γίνεται συνήθως στο ενδεικτικό μήκος κύματος 470 nm. (εικόνα από Lichtenthaler and Buschmann 2001a).

όπου  $z$  είναι η τιμή της παράστασης  $z = \alpha_{\text{maxa,a}}\alpha_{\text{maxb,b}} - \alpha_{\text{maxb,a}}\alpha_{\text{maxa,b}}$ . Στις τελικές εξισώσεις παραλείπεται το μήκος της κυψελίδας που θεωρείται 1 cm (Lichtenthaler and Buschmann 2001a).

Για την εκτίμηση των ολικών καροτενοειδών ως τιμή μεγίστου χρησιμοποιείται η τιμή 470 nm, η οποία είναι κατά προσέγγιση μία από τις θέσεις μεγίστων των καροτενοειδών (Εικόνα 2.14). Για την ποσοτικοποίηση εφαρμόζεται πάλι η αρχή των Beer-Lambert για σύνθετο μίγμα. Η απορρόφηση στα 470 nm συνυπολογίζεται ως το άθροισμα τριών απορροφήσεων, δηλαδή λόγω ολικών καροτενοειδών (συμβολίζονται  $x+c$ ), λόγω χλωροφύλλης α και χλωροφύλλης β. Δηλαδή:

$$A_{470} = A_{470,(x+c)} + A_{470,a} + A_{470,b} = a_{470,(x+c)}c_{(x+c)}d + a_{470,a}c_a d + a_{470,b}c_b d$$

Στην τελική εξίσωση χρησιμοποιούνται οι συγκεντρώσεις χλωροφύλλης α και β που έχουν ήδη βρεθεί. Η τελική εξίσωση προκύπτει από την επίλυση της εξίσωσης ως προς τη συγκέντρωση ολικών καροτενοειδών και θεώρηση του πλάτους της κυψελίδας 1 cm:

$$C_{(x+c)} = \frac{A_{470} - \alpha_{470,a} C_a - \alpha_{470,b} C_b}{a_{470,(x+c)}} \quad (\text{Lichtenthaler and Buschmann 2001a}).$$

Για την ποσοτικοποίηση των καροτενοειδών ιδιαίτερη σημασία έχει να έχει προηγηθεί σωστή ποσοτικοποίηση της χλωροφύλλης β και όχι της χλωροφύλλης α, καθώς η χλωροφύλλη β έχει μεγαλύτερη επίδραση στο αποτέλεσμα (Lichtenthaler and Buschmann 2001a). Επίσης η ποσοτικοποίηση της χλωροφύλλης β με αυτήν τη μέθοδο είναι πιο επιρρεπής σε σφάλματα σε σχέση με τη χλωροφύλλη α (Holden 1976). Οι εξισώσεις ποσοτικοποίησης συνήθως πολλαπλασιάζονται επί 1000 ώστε το αποτέλεσμα να εκφράζεται σε μg/mL αντί για mg/mL (Porra 2002).

Η πρώτη εφαρμογή αυτής της μεθόδου για προσδιορισμό των συγκεντρώσεων χλωροφύλλης α και β έγινε από τον Arnon το 1949, ο οποίος βασίστηκε στις προγενέστερες φασματοφωτομετρικές μετρήσεις του Mackinney. Ο Arnon χρησιμοποίησε ως διαλύτη 80% υδατική ακετόνη και οι εξισώσεις του ήταν σε χρήση για πολλά χρόνια, αλλά έχει αποδειχτεί ότι εν τέλει ήταν αρκετά ανακριβείς (Porra 2002).

Οι εξισώσεις αυτές έχουν προκύψει από μετρήσεις σε φύλλα ή φύκη. Στα φύλλα κυρίαρχο στοιχείο του φάσματος απορρόφησης είναι οι χλωροφύλλες και δευτερεύον τα καροτενοειδή (Lichtenthaler and Buschmann 2001a). Ανάλογα με τις διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι διαλύτες για την εξαγωγή και τη μέτρηση των χλωροφυλλών και των καροτενοειδών (Πίνακας 2.5). Ακόμα και για τους ίδιους διαλύτες έχουν προταθεί αρκετές διαφορετικές μορφές των εξισώσεων (Πίνακας 2.5), οι οποίες διαφέρουν στη θέση των μεγίστων απορρόφησης και στους συντελεστές απόσβεσης. Κάποιες διαφορετικές εκφράσεις των εξισώσεων φαίνονται στον Πίνακα 2.5, με την αναφορά στην οποία προτείνονται ή χρησιμοποιούνται:

**Πίνακας 2.5: Διαφορετικές εκφράσεις των εξισώσεων ποσοτικοποίησης χλωροφυλλών και ολικών καροτενοειδών**

Διαλύτης	Χρωστική (μg/mL)	Εξίσωση	Βιβλιογραφική αναφορά
80% ακετόνη	Χλωροφύλλη α	12,70(A663)-2,69(A645)	Arnon 1949 όπως παρατίθεται από Porra 2002
	Χλωροφύλλη β	22,9(A645)-4,68(A663)	
	Χλωροφύλλη α	12,21(A663)-2,81(A646)	Lichtenthaler and Wellburn 1983
	Χλωροφύλλη β	20,13(A646)-5,03(A663)	
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-3,73ca-104cb)]/229	Wellburn 1994
	Χλωροφύλλη α	12,25(A663,2)-2,79(646,8)	
	Χλωροφύλλη β	21,5(A646,8)-5,1(663,2)	
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-1,82ca-85,02cb]/198	Wellburn 1994
	Χλωροφύλλη α	12,21(A663)-2,81(646)	
	Χλωροφύλλη β	20,13(A646)-5,03(A663)	Wellburn 1994
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-3,72ca-104cb]/198	
	Χλωροφύλλη α	12,25(A663,2)-2,79(A646,8)	Lichtenthaler and Buschmann 2001a
	Χλωροφύλλη β	21.50(A646,8)-5.10(663,2)	
	Ολικά	[1000(A470)-1,82ca-	



	καροτενοειδή	85,02cb]/198		
	Χλωροφύλλη α	12,25(A663,2)-2,79(A646,8)	Sumanta <i>et al.</i> 2014	
	Χλωροφύλλη β	21,5(A646,8)-5,14(A663,2)		
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-1,82ca-85,02cb]/198		
Ρυθμισμένη 80% ακετόνη	Χλωροφύλλη α	12,25(A663,6)-2,55(A646,6)	Porra 2002	
	Χλωροφύλλη β	20,31(A646,6)-4,91(A663,3)		
90% ακετόνη	Χλωροφύλλη α	11,93(A664)-1,93(A647)	Jeffrey and Humphrey 1975	
	Χλωροφύλλη β	20,36(A647)-5,50(A664)		
		Χλωροφύλλη α	11,9442(A664)-1,7485(A647)-0,3319(A630)-1,4306(A691)	Ritchie 2008
	Χλωροφύλλη β	19,8839(A647)-4,8860(A664)-1,2825(A630)-2,3416(A691)		
100% ακετόνη	Χλωροφύλλη α	11,75(A663)-2,81(A646)	Lichtenthaler and Wellburn 1983	
	Χλωροφύλλη β	20,13(A646)-5,03(A663)		
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-3,27ca-104cb]/229		
	Χλωροφύλλη α	11,24(A661.6)-2,04(A644.8)	Lichtenthaler and Buschmann 2001a	
	Χλωροφύλλη β	20,13(A644.8)-4,19(A661.6)		
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-1,90ca-63,14cb]/214		
		Χλωροφύλλη α	11,63(A665)-2,39(A649)	Ριζοπούλου <i>et al.</i> 2015
		Χλωροφύλλη β	20,11(A649)-5,18(A665)	
	Χλωροφύλλη α	13,7(A665)-5,76(A649)	Wintermans and de Mots 1965 (*)	
96% αιθανόλη	Χλωροφύλλη β	25,8(A649)-7,6(A665)	Lichtenthaler and Wellburn 1983	
	Χλωροφύλλη α	13,95(A665)-6,88(A649)		
	Χλωροφύλλη β	24,96(A649)-7,32(A665)		
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-2,05ca-114,8cb]/245		
95% αιθανόλη	Χλωροφύλλη α	13,36(A664,1)-5,19(A648,6)	Lichtenthaler and Buschmann 2001a	
	Χλωροφύλλη β	27,43(A648,6)-6,12(A664,1)		
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-2,13ca-97,64cb]/209		
	Χλωροφύλλη α	13,36(A664)-5,19(A649)	Sumanta <i>et al.</i> 2014	
	Χλωροφύλλη β	27,43(A649)-8,12(A664)		
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-2,13ca-97,63cb]/209		
Μεθανόλη	Χλωροφύλλη α	16,5(A665)-8,3(A650)	Holden 1976	
	Χλωροφύλλη β	33,8(A650)-12,5(A665)		
	Χλωροφύλλη α	15,65(A666)-7,34(A653)	Lichtenthaler and Wellburn 1983	
	Χλωροφύλλη β	27,05(A653)-11,21(A666)		
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-2,86ca-129,2cb]/245		
	Χλωροφύλλη α	16,72(A665,2)-9,16(A652,4)	Wellburn 1994	
	Χλωροφύλλη β	34,09(A652,4)-15,28(A665,2)		
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-1,63ca-104,96cb]/221		
		Χλωροφύλλη α	15,65(A666)-7,34(A653)	Wellburn 1994

	Χλωροφύλλη β	27,05(A653)-11,21(A666)	Lichtenthaler and Buschmann 2001a
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-2,86ca-129,2cb]/221	
	Χλωροφύλλη α	16,72(A665,2)-9,16(A652,4)	
	Χλωροφύλλη β	34,09(A652,4)-15,28(A665,2)	
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-1,63ca-104,96cb]/221	
	Χλωροφύλλη α	16,29(A665,2)-8,54(A652,0)	
	Χλωροφύλλη β	30,66(A652,0)-13,58(A665,2)	
	Χλωροφύλλη α	16,72(A665,2)-9,16(A652,4)	
	Χλωροφύλλη β	34,09(A652,4)-15,28(A665,2)	
90% μεθανόλη	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-1,63ca-104,96cb]/221	Sumanta <i>et al.</i> 2014
	Χλωροφύλλη α	16,82(A665,2)-9,28(A652,4)	
	Χλωροφύλλη β	36,92(A652,4)-16,54(A665,2)	
Διαιθυλαιθέρας	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-1,82ca-85,02cb]/198	Lichtenthaler and Buschmann 2001a
	Χλωροφύλλη α	9,93(A660)-0,78(A642,5)	
	Χλωροφύλλη β	17,6(A642,5)-2,8(A660)	
	Χλωροφύλλη α	10,1(A662)-1,01(A644)	Comar and Zschiele 1942 (*)
	Χλωροφύλλη β	16,4(A644)-2,57(A662)	Smith and Benitez 1955 (*)
	Χλωροφύλλη α	10,05(A662)-0,766(A644)	Lichtenthaler and Wellburn 1983
	Χλωροφύλλη β	16,37(A644)-3,14(A662)	
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-1,28ca-56,7cb]/230	
	Χλωροφύλλη α	10,05(A660,6)-0,97(A642,2)	Wellburn 1994
	Χλωροφύλλη β	16,36(A642,2)-2,43(A660,6)	
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-1,43ca-35,87cb]/205	
	Χλωροφύλλη α	10,05(A662)-0,77(A644)	Wellburn 1994
	Χλωροφύλλη β	16,37(A644)-3,14(A662)	
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-1,28ca-56.7cb]/205	
	Διαιθυλαιθέρας (καθαρός)	Χλωροφύλλη α	10,05(A660.6)-0.97(A642.2)
Χλωροφύλλη β		16.36(A642.2)-2.43(A660.6)	
Ολικά καροτενοειδή		[1000(A470)-1.43ca-35.87cb]/205	
Διαιθυλαιθέρας (άνυδρος)	Χλωροφύλλη α	10,05(A660,6)-0,97(A642,2)	Lichtenthaler and Buschmann 2001a
	Χλωροφύλλη β	16,36(A642,2)-2,43(A660,6)	
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-1,43ca-35,87cb]/205	
Διαιθυλαιθέρας (ένυδρος)	Χλωροφύλλη α	9,93(A660,6)-0,75(A641,8)	Lichtenthaler and Buschmann 2001a
	Χλωροφύλλη β	16,23(A641,8)-2,42(A660,6)	
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-1,30ca-33,12cb]/213	
Διαιθυλαιθέρας (ένυδρος)	Χλωροφύλλη α	10,36(A661,6)-1,28(A643,2)	Lichtenthaler and Buschmann 2001a
	Χλωροφύλλη β	17,149(A643,2)-2,72(A661,6)	
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-1,38ca-48,05cb]/211	
Χλωροφόρμιο	Χλωροφύλλη α	11,47(A665,6)-2(A647,6)	Wellburn 1994

	Χλωροφύλλη β	21,85(A647,6)-4,53(A665,6)	Wellburn 1994
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-1,43ca-35,87cb]/205	
	Χλωροφύλλη α	10,91(A666)-1,2(A648)	
	Χλωροφύλλη β	16,38(A648)-4,57(A666)	
Διμεθυλοφορμαμίδιο	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-1,42ca-46,09cb]/202	Wellburn 1994
	Χλωροφύλλη α	12(A663,8)-3,11(A646,8)	
	Χλωροφύλλη β	36,92(A646,8)-16,54(A663,8)	Wellburn 1994
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-1,12ca-34,07cb]/245	
	Χλωροφύλλη α	11,67(A664)-2,69(A647)	Wellburn 1994
	Χλωροφύλλη β	20,81(A647)-4,53(A664)	
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-0,89ca-52,02cb]/245	Porra 2002
	Χλωροφύλλη α	12,00(A663,8)-3,11(A646,8)	
Διμεθυλοσουλφοξειδιο	Χλωροφύλλη β	20,78(A646,8)-4,88(A663,8)	Wellburn 1994
	Χλωροφύλλη α	12,47(A665,1)-3,62(A649,1)	
	Χλωροφύλλη β	25,06(A649,1)-6,5(A665,1)	Wellburn 1994
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-1,91ca-95,15cb]/220	
	Χλωροφύλλη α	12,19(A665)-3,45(A649)	Wellburn 1994
	Χλωροφύλλη β	21,99(A649)-5,32(A665)	
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A470)-2,14ca-70,16cb]/220	Sumanta <i>et al.</i> 2014
	Χλωροφύλλη α	12,47(A665,1)-3,62(A649,1)	
	Χλωροφύλλη β	25,06(A649,1)-6,5(A665,1)	
	Ολικά καροτενοειδή	[1000(A480)-1,29ca-53,78cb]/220	

**Σημειώσεις:**

1. Αναφέρονται ενδεικτικά περιπτώσεις κατά τις οποίες έχει γίνει παραγωγή ή χρήση διαφορετικών εξισώσεων και διαφορετικών διαλυτών.
2. Οι εξισώσεις που αξιοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία φαίνονται σκιασμένες με πορτοκαλί χρώμα.
3. Ο Wellburn (1994) προτείνει δύο εναλλακτικές των εξισώσεων αναλόγως αν το φασματοφωτόμετρο έχει δυνατότητα χρήσης υποδιαστολής κατά την επιλογή μήκους κύματος.
4. Ο Wellburn (1994) διακρίνει τρεις περιπτώσεις του διαλύτη διαιθυλαιθέρα.
5. Ο Ritchie (2008) χρησιμοποιεί εξισώσεις με τέσσερις παράγοντες γιατί αναφέρεται σε φύκη και συνυπολογίζονται οι χλωροφύλλες α, β, c, d.
6. Οι εξισώσεις των Ριζοπούλου *et al.* (2015) προέρχονται από την εργαστηριακή άσκηση Χρωστικές Πλαστιδίων του εργαστηριακού μέρους του μαθήματος Φυσιολογία Φυτών.
7. Οι βιβλιογραφικές αναφορές με αστερίσκο (\*) ελήφθησαν από Holden (1976).

Γενικά οι εξισώσεις για τις χλωροφύλλες από τη βιβλιογραφία μπορούν να εφαρμοστούν εφόσον η θέση του παρατηρούμενου πειραματικά μεγίστου δεν διαφέρει πάνω από 2 nm από τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Lichtenthaler and Buschmann 2001a). Για την ποσοτικοποίηση των ολικών καροτενοειδών τα όρια είναι πιο χαλαρά, γιατί η επίδραση των χλωροφυλλών στο τελικό αποτέλεσμα είναι μικρή (Lichtenthaler and Buschmann 2001a).

Η θολερότητα του ομογενοποιημένου μπορεί να εκτιμηθεί από την απορρόφηση (σκέδαση) στα 750 nm. Αν είναι πολύ υψηλή μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στις μετρήσεις (Lichtenthaler and Buschmann 2001). Οι μετρήσεις απορρόφησης για φύλλα πρέπει να βρίσκονται ανάμεσα στα όρια 0,3 με 0,85 (Lichtenthaler and Buschmann 2001a).

Συγκριτική μελέτη των εξαγόμενων συγκεντρώσεων για χλωροφύλλες α, β και ολικά καροτενοειδή από εξισώσεις για διάφορους διαλύτες (80% ακετόνη, 95% αιθανόλη, διαιθυλεθαίρας, διμεθυλοφορμαμίδιο, διμεθυλοσουλφοξείδιο και μεθανόλη) έδειξε αντικρουόμενα αποτελέσματα. Ως υλικό μελέτης χρησιμοποιήθηκαν φύλλα από τρία είδη πτεριδόφυτων. Γενικά παρατηρήθηκε διακύμανση ως προς την ποσοτικοποίηση ανάλογα με τον διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε, ακόμα και ανάμεσα στα είδη. Για τις χλωροφύλλες σχετικά καλοί διαλύτες για εκχύλιση αποδείχθηκαν στις περισσότερες περιπτώσεις ο διαιθυλαιθέρας και στη συνέχεια η μεθανόλη, ενώ σχετικά ακατάλληλος διαλύτης αποδείχθηκε η αιθανόλη, χωρίς τα αποτελέσματα αυτά να είναι απόλυτα. Για τα καροτενοειδή καλοί διαλύτες εκχύλισης φάνηκαν η μεθανόλη, το διμεθυλοσουλφοξείδιο, η ακετόνη και ο διαιθυλεθαίρας (με διαφοροποιήσεις ανάλογα με το δείγμα), ενώ η χρήση της αιθανόλης φάνηκε προβληματική. Συγκεντρωτικά ο διαιθυλαιθέρας κρίνεται καταλληλότερος διαλύτης για εξαγωγή χλωροφυλλών και το διμεθυλοσουλφοξείδιο για εξαγωγή καροτενοειδών (Sumanta *et al.* 2014).

Για τις χλωροφύλλες θεωρείται προτιμότερη η ανάλυση σε νωπό αντί για ξηρό υλικό, αν και η αποθήκευση του νωπού σε ορισμένα είδη μπορεί να προκαλέσει ταχεία αποδόμηση των χλωροφυλλών. Η ξήρανση του υλικού μπορεί να οδηγήσει στη μετατροπή τους σε φαιοφυτίνες και επιπλέον η εξαγωγή των χλωροφυλλών είναι δυσκολότερη σε ξηρό υλικό (Holden 1976). Από τους κοινότερους διαλύτες εκχύλισης των χλωροφυλλών είναι η ακετόνη και η μεθανόλη – σπανιότερα επιλέγεται αιθανόλη ή μίγμα μεθανόλης και πετρελαϊκού αιθέρα- και η εκχύλιση είναι προτιμότερο να μην πραγματοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες και έκθεση σε ηλιακό φως. Η ακετόνη προτείνεται να είναι τουλάχιστον 80% και η μεθανόλη 90% ώστε εκτός από την αποτελεσματικότερη εκχύλιση να αποτραπεί και η δράση πιθανών χλωροφυλλασών (chlorophyllasses) (Holden 1976).

Τα καροτενοειδή απαιτούν προσεκτικούς χειρισμούς γιατί είναι ασταθή χημικά. Πιο συγκεκριμένα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στο φως, στην υψηλή θερμοκρασία, στο οξυγόνο, στα οξέα και σε ορισμένες περιπτώσεις και στις βάσεις (Davies 1976). Γενικά είναι προτιμότερη η εξαγωγή των καροτενοειδών από νωπά δείγματα παρά από αποξηραμένα. Στους νωπούς ιστούς γίνεται συνήθως εκχύλιση με έναν πολικό διαλύτη (ακετόνη, αιθανόλη ή μεθανόλη) και στη συνέχεια δεύτερη εκχύλιση του εκχυλίσματος σε μη πολικό διαλύτη (διαιθυλαιθέρα). Στα ξηρά υλικά μπορεί να γίνει απευθείας εφαρμογή του διαιθυλαιθέρα στο υλικό (Davies 1976).

Για την παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε εξέταση για χλωροφύλλες α, β και ολικά καροτενοειδή σε δείγματα από τη μαύρη και την κόκκινη περιοχή των πετάλων *Paraver rhoeas* που είχαν συλλεχθεί στις 3/4/2018. Οι εξισώσεις που επιλέχθηκαν είναι αυτές των Lichtenthaler and Wellburn (1983) σε διαλύτες καθαρή ακετόνη και διαιθυλαιθέρα (σκιασμένες στον πίνακα 2.5). Οι συγκεκριμένοι διαλύτες επιλέχθηκαν λόγω της άμεσης διαθεσιμότητάς τους στο εργαστήριο, της ευρείας βιβλιογραφικής τους χρήσης

και των καλών αποτελεσμάτων που δίνουν (Sumanta *et al.* 2014). Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί διαλύτες εκχύλισης ώστε να μπορούν να αλληλεπιδράσουν διαφορετικά με τις χρωστικές και να υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα εκχύλισής τους - αν υπάρχουν. Αρχικά ζυγίστηκαν περίπου 0,1 g ξηρού υλικού (κόκκινης και μαύρης περιοχής) ζυγισμένα σε αναλυτικό ζυγό KERN 770, και τοποθετήθηκαν σε 10 mL διαλύτη (ακετόνη και διαιθυλαιθέρα). Σε κάθε σωλήνα τοποθετήθηκε μικρή ποσότητα (όγκος μιας φακής) στερεού  $\text{CaCO}_3$  (Ριζοπούλου *et al.* 2015) με σκοπό την εξουδετέρωση του πιθανώς όξινου pH λόγω φυτικών οξέων. Όξινο pH θα προκαλούσε μετατροπή των χλωροφυλλών σε φαιοφυτίνες οι οποίες έχουν διαφορετικές φασματικές ιδιότητες (Holden 1976, Lichtenhaler and Buschmann 2001b). Εναλλακτικά αντί για  $\text{CaCO}_3$  θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί  $\text{MgCO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ή διμεθυλανιλίνη (Holden 1976). Μικρή ποσότητα (1-2%) φαιοφυτινών δεν μεταβάλλει το αποτέλεσμα (Lichtenhaler and Buschmann 2001b). Τα τέσσερα δείγματα αναδεύτηκαν και τοποθετήθηκαν κλεισμένα αεροστεγώς και σε σκοτάδι, στους  $4^\circ \text{C}$  για 24 ώρες για να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση. Τα δείγματα λήφθηκαν, ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3500 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά και συλλογή του υπερκείμενου. Στη συνέχεια τα δείγματα φωτομετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο Pharmacia Biotech Novaspec II στα καθορισμένα μήκη κύματος χωρίς να προηγηθεί αραίωση (η απορρόφηση ήταν χαμηλή). Η συγκέντρωση χλωροφύλλης α, χλωροφύλλης β και ολικών καροτενοειδών υπολογίστηκε με τις εξισώσεις και στη συνέχεια έγινε αναγωγή ανά μονάδα ξηρής και νωπής μάζας. Ως τυφλό για τη φωτομέτρηση χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά ο αντίστοιχος καθαρός διαλύτης. Στα τελικά αποτελέσματα έγινε αναγωγή των συγκεντρώσεων σε  $\mu\text{g}$  ανά g ξηρού και νωπού ιστού.

Κάθε φωτομέτρηση επαναλήφθηκε τρεις φορές για μείωση πιθανών σφαλμάτων του φασματοφωτόμετρου. Από κάθε τριάδα μετρήσεων υπολογίστηκε η μέση τιμή ( $\bar{x}$ ) και το τυπικό σφάλμα του μέσου (SE) που αντιστοιχεί στο σφάλμα του οργάνου. Η προσθαφαίρεση του τυπικού σφάλματος του μέσου γύρω από τη μέση τιμή, αντιστοιχεί το εύρος τιμών στο οποίο βρίσκεται η πραγματική τιμή κατά πιθανότητα 68% (Τριχόπουλος 2001 *et al.*, Τρικαλινός 2015), υπό τη θεώρηση ότι η κατανομή των μετρήσεων γύρω από τη μέση («πραγματική») τιμή είναι κανονική (Τριχόπουλος *et al.* 2001). Για τον υπολογισμό του τελικού σφάλματος στη συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν οι μαθηματικές κανόνες διάδοσης σφαλμάτων σύμφωνα με τον Τρικαλινό (2015). Στις τελικές τιμές συγκέντρωσης υπολογίστηκε το διάστημα στο οποίο βρίσκεται η πραγματική τιμή κατά πιθανότητα 95% ( $\bar{x} \pm 1,96 * SE$ ), με την προϋπόθεση της κανονικής κατανομής (Τριχόπουλος *et al.* 2001).

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Παρατηρήσεις στο πεδίο και υδατοπεριεκτικότητα

Έγινε συλλογή στο πεδίο μόνο των ανθέων εκείνων των οποίων τα άνθη έφεραν σκούρα (μαύρη) περιοχή στη βάση τους. Η εμφάνιση τέτοιας περιοχής ήταν πιο συχνή σε άνθη μεγάλου μεγέθους. Κατά τις τρεις πρώτες συλλογές (21/3/2018, 3/4/2018 και 19/4/2018) τα φυτά ήταν εμφανή και τα άνθη φαίνονταν σε καλή κατάσταση. Κατά τις δύο τελευταίες συλλογές (2/5/2018 και 4/5/2018) φαίνεται ανθοφορία βρισκόταν στο τέλος της (Rhizoroulou and Pantazi 2015) και τα άνθη ήταν πλέον πολύ πιο δυσεύρετα. Επιπλέον, πολλά από τα άνθη δεν βρίσκονταν σε καλή κατάσταση. Σε πολλές περιπτώσεις τα πέταλα ήταν ταλαιπωρημένα και πολύ εύθραυστα κατά την αποκόλλησή τους από τη στεφάνη του άνθους.

Στις τέσσερις συλλογές που προορίστηκαν για ξήρανση σε κλίβανο, ζυγίστηκε το νωπό και η ξηρό βάρος της κόκκινης και της μαύρης περιοχής και υπολογίστηκε το επί τοις εκατό υδατικό περιεχόμενο και παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.1. Ο υπολογισμός έγινε από τη σχέση:

$$\text{Υδατοπεριεκτικότητα (\%)} = \left( \frac{\text{Νωπό βάρος} - \text{Ξηρό βάρος}}{\text{Νωπό βάρος}} \right) * 100\%$$

**Πίνακας 3.1: Υδατοπεριεκτικότητα φυτικών δειγμάτων**

Ημερομηνία συλλογής	Πλήθος δειγμάτων	Χρωματική περιοχή	Υδατικό περιεχόμενο (%)
21/3/2018	87	Κόκκινη	83,81
		Μαύρη	83,80
3/4/2018	400	Κόκκινη	83,21
		Μαύρη	83,55
19/4/2018	20	Κόκκινη	87,17
		Μαύρη	87,47
4/5/2018	54	Κόκκινη	85,34
		Μαύρη	85,85
Μέσος όρος	-	Κόκκινη	84,88 ± 1,73
		Μαύρη	85,17 ± 1,81

Τα περιθώρια σφάλματος που χρησιμοποιούνται στους μέσους όρους είναι τα διαστήματα 95% εμπιστοσύνης κανονικής κατανομής γύρω από τη μέση τιμή, δηλαδή  $\bar{x} \pm 1,96 * SE$ , όπως προέκυψαν από τις επιμέρους τιμές υδατοπεριεκτικότητας.



### 3.2 Μακροσκοπικές παρατηρήσεις

Τα 87 άνθη *Papaver rhoeas* της πρώτης συλλογής (21/3/2018) υποβλήθηκαν σε μακροσκοπική παρατήρηση με γυμνό οφθαλμό και φωτογραφήθηκαν (Εικόνα 3.1).



**Εικόνα 3.1:** Άνθη *Papaver rhoeas*. Επιλογή από τα άνθη που συλλέχθηκαν και πραγματοποιήθηκαν οι μορφολογικές παρατηρήσεις.

καμπυλότητα προσδίδοντας κοίλη όψη προς την άνω (εσωτερική) πλευρά του και ένα κωδωνοειδές σχήμα στο ολικό άνθος. Η καμπυλότητα ήταν πιο εμφανής στη βάση του πετάλου. Τα πέταλα έχουν βελούδινη υφή. Η νεύρωση του φύλλου οργανώνεται σε δεσμίδες και ξεκινά ακτινωτά από τη βάση του πετάλου έως το περιθώριο. Το σχήμα του πετάλου ήταν ποικίλο, από επίμηκες-πρισματικό έως πλατύ-δισκοειδές. Το μέγεθος του πετάλου κυμαινόταν ενδεικτικά από τιμές 2,4 X 1,8 cm έως 5,9 X 7,5 cm (διαστάσεις άξονα κατά την ακτίνα X άξονα κάθετου στην ακτίνα). Το εξωτερικό περιθώριο του πετάλου ήταν ελαφρώς κυματοειδές. Το πέταλο στη βάση εμφανίζει μια ελαφρά στένωση.

Το χρωματικό μοτίβο σε κάθε πέταλο αποτελείται από δύο κύριες περιοχές: μία κυρίαρχη κόκκινη και μία μαύρη στη βάση. Το κόκκινο χρώμα είναι συνήθως πολύ έντονο. Σε πολλές περιπτώσεις μεταξύ της κόκκινης και της μαύρης περιοχής παρεμβάλλεται μία συνήθως λεπτή λευκή ζώνη. Όπου υπάρχει λευκή ζώνη, αυτή είναι συνήθως ορατή μόνο από την εσωτερική των πετάλων και από την εξωτερική πλευρά φαίνεται αδιόρατα (Εικόνα 3.3). Στις περιπτώσεις που η λευκή ζώνη

Τα άνθη αποτελούνταν από 4 πέταλα (βρέθηκε 1 άνθος με 5 πέταλα), πολυάριθμους νηματοειδείς στήμονες, πλατύ – κοντό ύπερο με πολυάριθμες σιγματικές ακτίνες και ποδίσκο με τρίχες (Εικόνα 3.2). Σε όλα τα άνθη τα σέπαλα είχαν αποπέσει (Mitich 2000). Τα τέσσερα πέταλα βρίσκονται σε δύο σπονδυλώματα ανά δύο που επικαλύπτονται σταυροειδώς. Το κάθε πέταλο εμφάνιζε



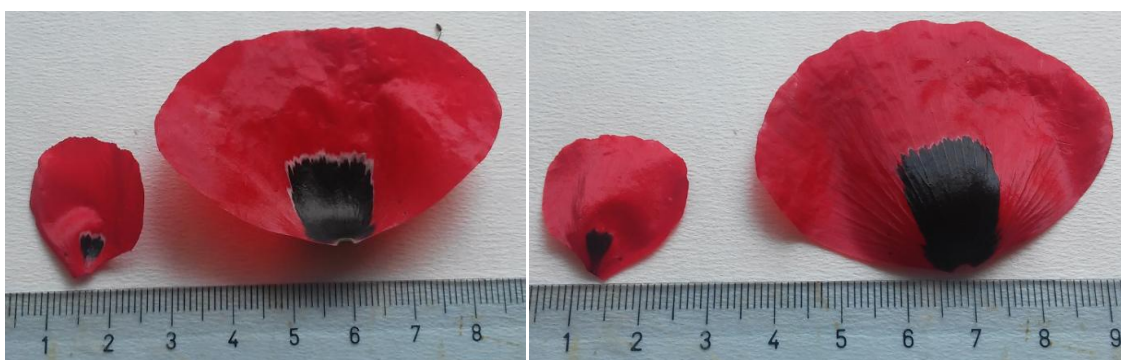
**Εικόνα 3.2:** Εσωτερικό άνθους *Papaver rhoeas*. Άνθος από το οποίο έχουν αφαιρεθεί τα δύο πέταλα. Διακρίνονται ο ύπερος και οι νηματοειδείς στήμονες καθώς και τη λευκή ζώνη στο εσωτερικό των πετάλων. Επίσης διακρίνεται το καμπυλόσχημο σχήμα των πετάλων και το κωδωνοειδές σχήμα του άνθους.

έχει λίγο μεγαλύτερο πλάτος, διακρίνονται τρεις επιμέρους χρωματικές ζώνες, και από μέσα προς τα έξω αυτές είναι χρώματος γκρίζου, πραγματικά λευκού και ελαφρού ρόδινου (Εικόνα 3.8). Η πραγματικά λευκή ζώνη είναι ιδιαίτερα λεπτή. Στις περισσότερες περιπτώσεις η μαύρη περιοχή έχει πρισματικό σχήμα με πριονωτό περίγραμμά του προς το εξωτερικό του πετάλου. Η λευκή γραμμή – όπου υπάρχει – ακολουθεί το πριονωτό περίγραμμα της μαύρης περιοχής. Εν γένει το μαύρο περιλαμβάνει μικρή έκταση του πετάλου, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις είναι ιδιαίτερα εκτεταμένο (Εικόνα 3.8).

Στο φωτογραφικό υλικό των εικόνων 3.3 έως 3.8 φαίνονται τα μορφολογικά γνωρίσματα των πετάλων και τη διακύμανσή τους. Οι φωτογραφίες έχουν ληφθεί με κάμερα κινητού τηλεφώνου. Γενικά η φωτογράφιση έχει πραγματοποιηθεί υπό φυσικό διάχυτο φωτισμό. Στις περιπτώσεις που έχει χρησιμοποιηθεί φωτογραφικό φλας, αναφέρεται στη λεζάντα.



**Εικόνα 3.3:** Άνω και κάτω όψη πετάλου *Papaver rhoeas*. Η άνω επιφάνεια του πετάλου εικονίζεται αριστερά και η κάτω δεξιά. Φαίνεται ότι η λευκή ζώνη είναι ορατή μόνο από τη μέσα πλευρά. Επίσης εικονίζεται το πριονωτό άνω περιθώριο της μαύρης περιοχής.



**Εικόνα 3.4:** Ποικιλότητα του μεγέθους σε πέταλα *Papaver rhoeas*. Εικονίζονται δύο ακραίες περιπτώσεις μεγέθους. Παρατηρείται ότι στα μικρά πέταλα υπερτερεί το επίμηκες σχήμα ενώ στα μεγάλα το πλατύ. Εικονίζονται η άνω επιφάνεια (αριστερά) και η κάτω επιφάνεια (δεξιά) των πετάλων. Φαίνεται ότι από την κάτω επιφάνεια η λευκή ζώνη δεν είναι συνήθως ορατή.



**Εικόνα 3.5:** Ποικιλότητα του σχήματος σε πέταλα *Papaver rhoeas*. Εικονίζεται διαβάθμιση πέντε περιπτώσεων πετάλων από επίμηκες σχήμα (αριστερά) μέχρι πλατύ σχήμα (δεξιά). Εικονίζεται η άνω όψη των πετάλων. Στη φωτογραφία έχει χρησιμοποιηθεί φλας.





**Εικόνα 3.6:** Ποικιλότητα του μεγέθους της λευκής ζώνης σε πέταλα *Papaver rhoeas*. Εικονίζεται διαβάθμιση πέντε περιπτώσεων πετάλων από πλήρη απουσία λευκής ζώνης (αριστερά) μέχρι πολύ έντονη παρουσία (δεξιά). Πιο συγκεκριμένα από αριστερά προς τα δεξιά φαίνονται περιπτώσεις πλήρους απουσίας λευκής ζώνης, αδιόρατης λευκής ζώνης, λεπτής ζώνης, έντονης ζώνης και πολύ έντονης ζώνης. Εικονίζεται η άνω όψη (άνω) και η κάτω όψη (κάτω) των πετάλων. Φαίνεται ότι από την κάτω πλευρά η λευκή ζώνη δεν είναι συνήθως ορατή. Στην κάτω φωτογραφία έχει χρησιμοποιηθεί φλας.



**Εικόνα 3.7:** Ποικιλότητα του μεγέθους της μαύρης περιοχής σε πέταλα *Papaver rhoeas*. Εικονίζεται διαβάθμιση τριών πετάλων από πολύ περιορισμένη μαύρη περιοχή (αριστερά) μέχρι πολύ εκτεταμένη (δεξιά). Εικονίζεται η άνω όψη των πετάλων.



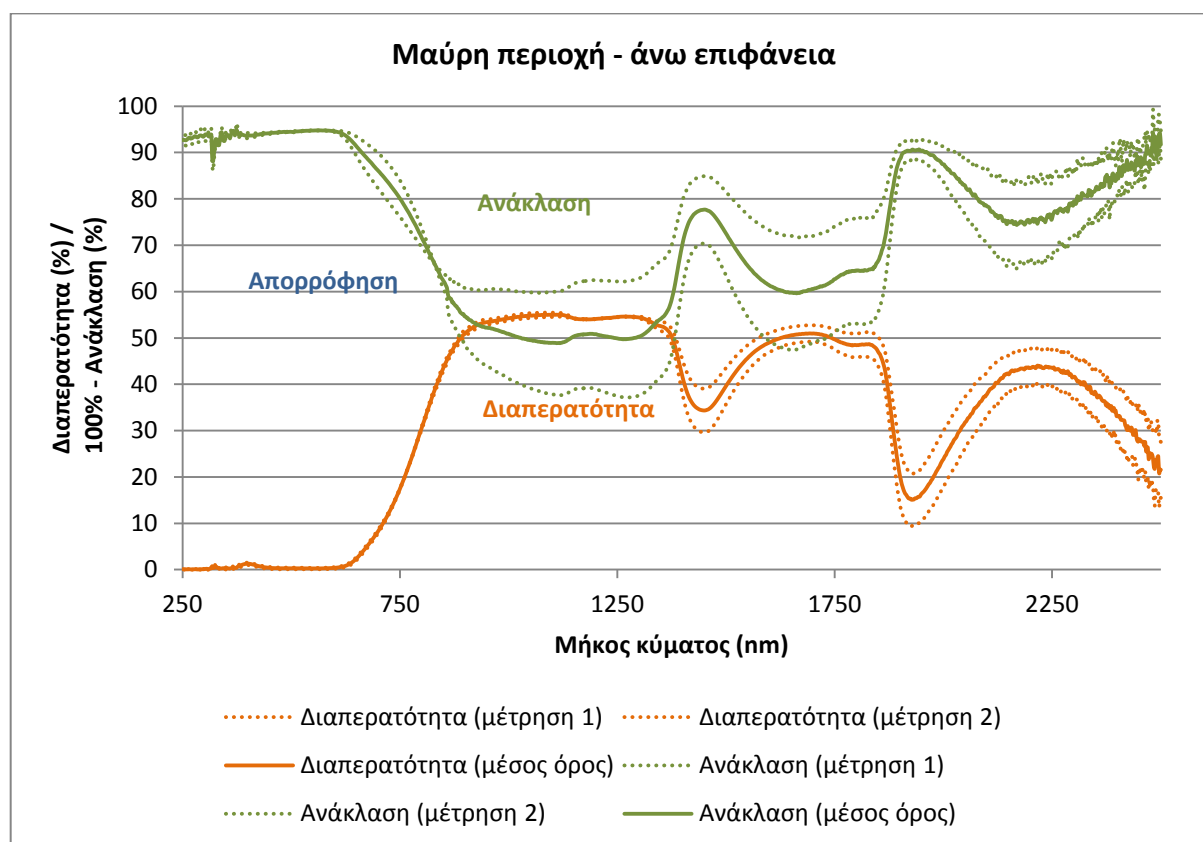
**Εικόνα 3.8:** Χρωματική διαβάθμιση στη λευκή περιοχή σε πέταλο *Papaver rhoeas*. Εικονίζεται χρωματική διαβάθμιση της λευκής ζώνης (γκρι, λευκή, ροζ) σε ένα πέταλο με εξαιρετικά ανεπτυγμένη λευκή ζώνη. Εικονίζεται η άνω όψη των πετάλων.

### 3.3 Οπτικές ιδιότητες άθικτων πετάλων

Μετρήσεις διαπερατότητας και ανάκλασης και υπολογισμός της απορρόφησης πραγματοποιήθηκαν σε νωπά πέταλα. Στις γραφικές παραστάσεις εικονίζονται είτε η απορρόφηση, είτε η διαπερατότητα με την ανάκλαση σε ανάστροφο άξονα. Για τη μαύρη περιοχή έχουν πραγματοποιηθεί δύο σειρές από κάθε μέτρηση (μέτρηση 1 και μέτρηση 2), ενώ για την κόκκινη περιοχή μόνο μία σειρά μετρήσεων (μέτρηση 1). Στις γραφικές παραστάσεις έχουν επιλεγθεί να δοθούν χωριστά το ολικό φάσμα 250-2500 nm και ειδικότερα η περιοχή 250-800 nm που περιλαμβάνει το ορατό φάσμα και τις κοντινές περιοχές του και δίνει επομένως πληροφορίες για το χρώμα του άνθους.

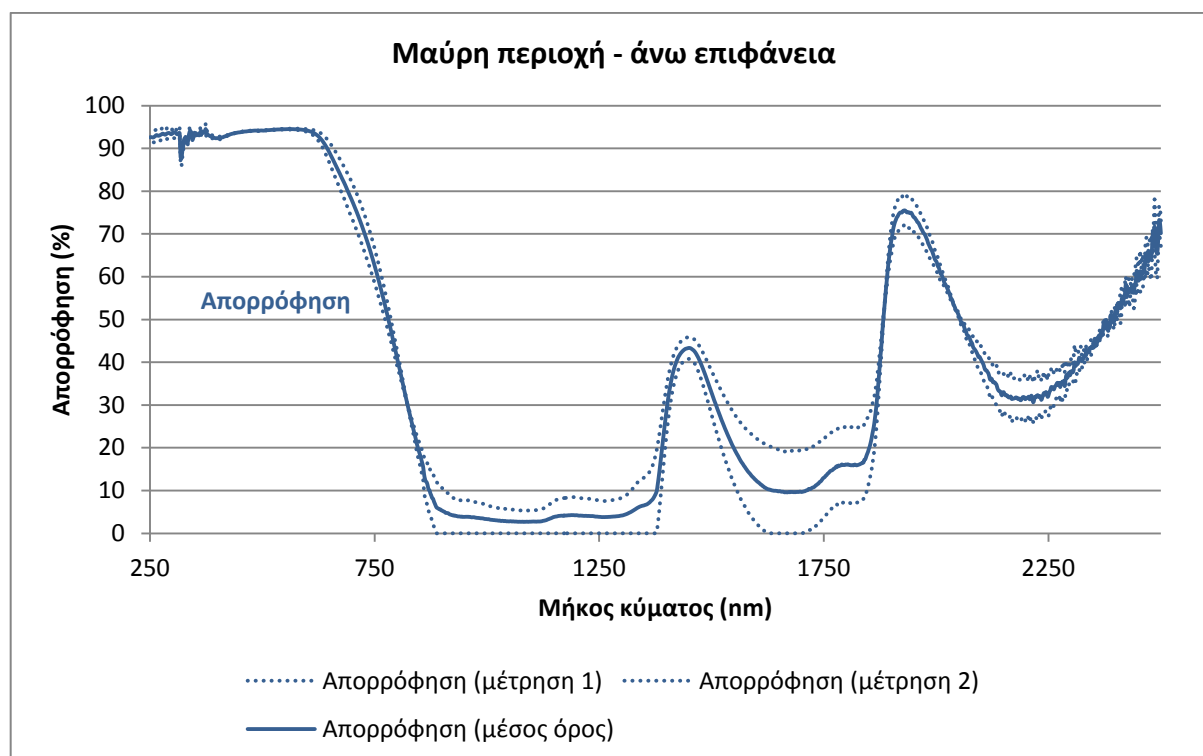
Σύμφωνα με τον ορισμό τους όλες οι τιμές διαπερατότητας, ανάκλασης και απορρόφησης πρέπει να κυμαίνονται στο διάστημα 0-100%. Επακόλουθο αυτού είναι ότι οι καμπύλες διαπερατότητας και ανάκλασης στις γραφικές παραστάσεις δεν πρέπει να τέμνονται γιατί έτσι προκύπτει αρνητική απορρόφηση. Από τα δεδομένα προέκυψαν κάποιες αρνητικές τιμές διαπερατότητας, ανάκλασης και απορρόφησης, οι οποίες αντικαταστάθηκαν με 0. Δεν δόθηκε μεγάλη σημασία όταν οι αρνητικές τιμές ήταν έως -5%, όπως ήταν και στις περισσότερες από αυτές τις περιπτώσεις. Σε ορισμένες περιπτώσεις που η διαφορά ήταν μεγαλύτερη (αυτό συνέβη μόνο για τιμές απορρόφησης) γίνεται ειδική αναφορά στη συνέχεια.

#### 3.3.1 Μαύρη περιοχή – άνω επιφάνεια



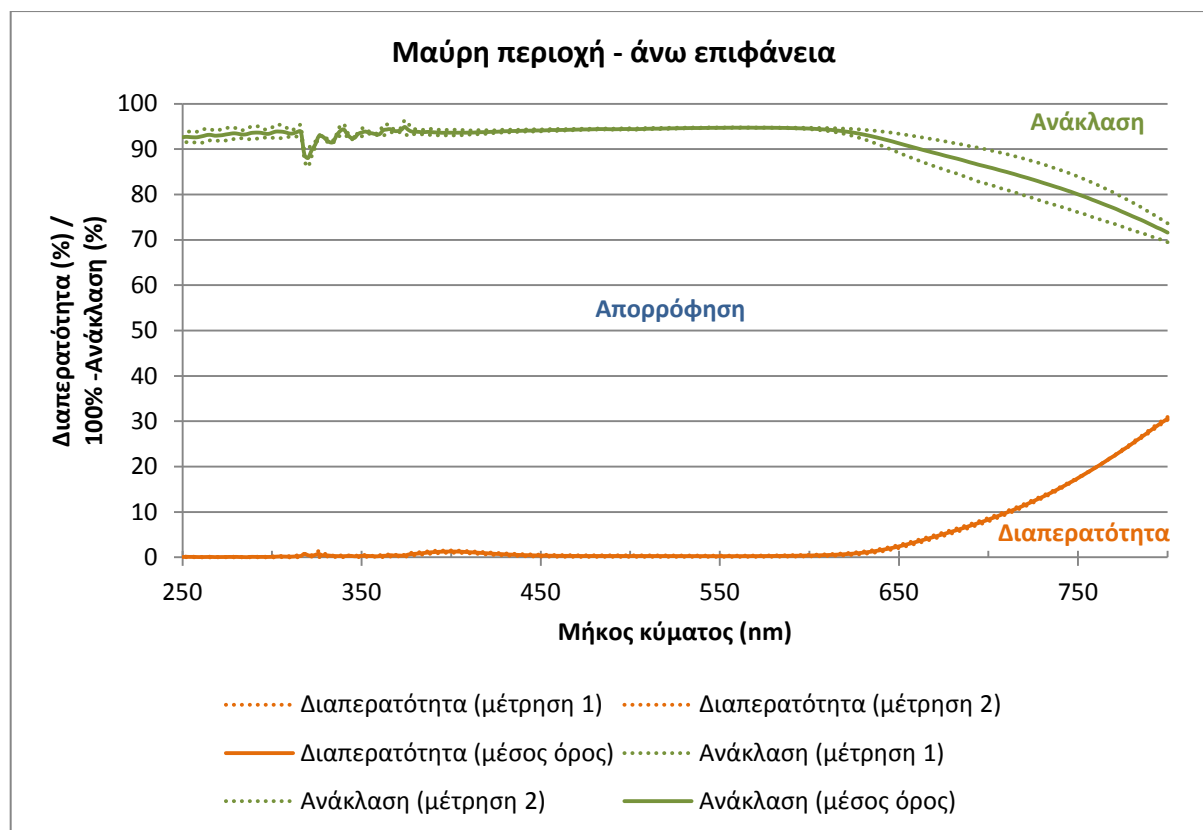
Εικόνα 3.9: Διαπερατότητα και ανάκλαση για την άνω επιφάνεια της μαύρης περιοχής στα 250-2500 nm.

Στην εικόνα 3.9 οι καμπύλες της διαπερατότητας και της απορρόφησης έχουν παρόμοια μορφή, όπως φαίνεται και από τη συμμετρική τους απεικόνιση. Οι δύο σειρές μετρήσεων για τη διαπερατότητα δίνουν εντυπωσιακή εγγύτητα στις τιμές τους. Αντιθέτως οι δύο καμπύλες από τις δύο σειρές μετρήσεων (μέτρηση 1 και μέτρηση 2) για την ανάκλαση δίνουν παρόμοια μορφή στις καμπύλες αλλά μεγάλη διαφορά στις τιμές για όλο το υπέρυθρο φάσμα (Εικόνα 3.9). Η καμπύλη της ανάκλασης «μέτρηση 2» παρουσιάζει ευρεία και πολύ μεγάλης κλίμακας διασταύρωση με την καμπύλη διαπερατότητας. Για αυτόν τον λόγο κρίθηκε ότι υπήρξε κάποιο πρόβλημα σε εκείνη τη σειρά μετρήσεων και μετέπειτα όπου χρειάστηκαν συγκρίσεις για όλο το φάσμα, χρησιμοποιήθηκε μόνο η σειρά μετρήσεων «μέτρηση 1» για την ανάκλαση (Εικόνα 3.9). Με αυτή τη σύμβαση οι τιμές διαπερατότητας είναι εν γένει υψηλότερες από τις τιμές ανάκλασης.



**Εικόνα 3.10: Απορρόφηση για την άνω επιφάνεια της μαύρης περιοχής στα 250-2500 nm.**

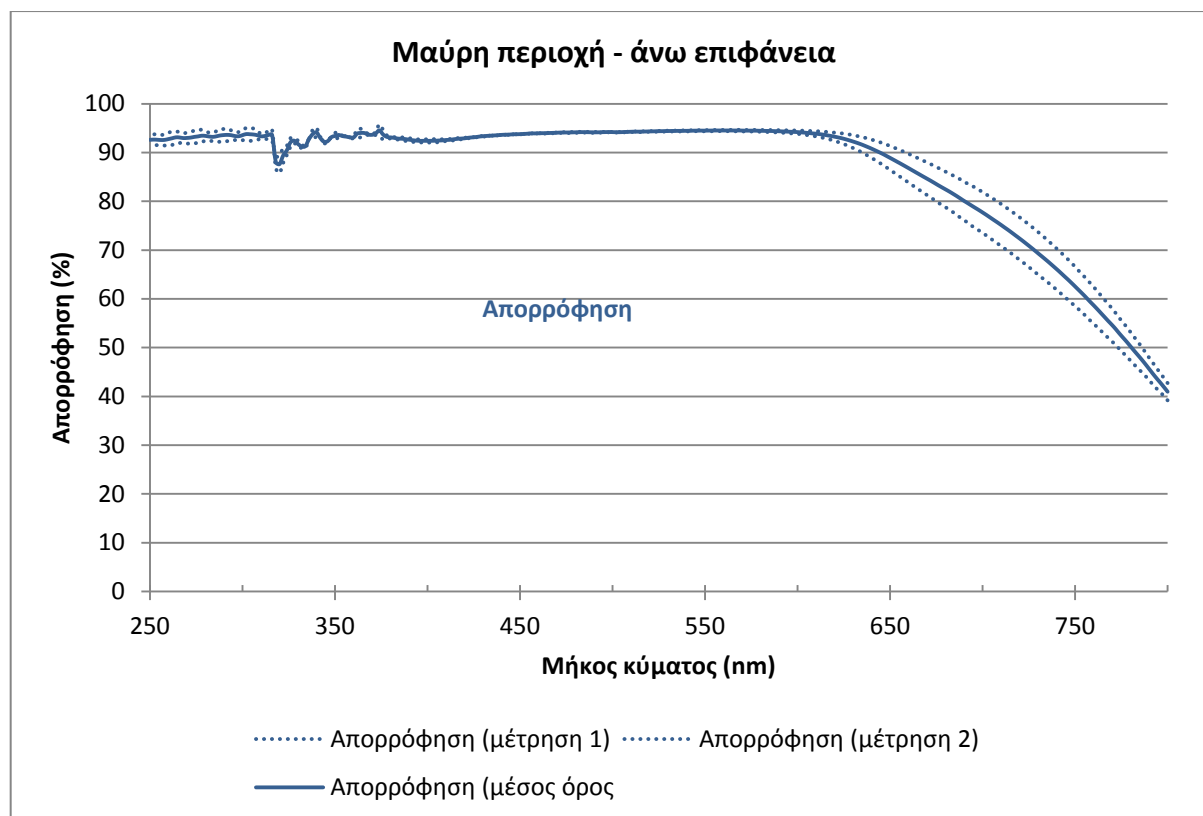
Στην εικόνα 3.10 οι αρνητικές τιμές για την απορρόφηση που προέκυψαν από τη (μέτρηση 1) θεωρήθηκαν 0. Για τους λόγους που αναφέρθηκαν, όταν το φάσμα απορρόφησης χρησιμοποιείται για σύγκριση θα χρησιμοποιείται η (μέτρηση 2) ως αληθής τιμή και όχι ο μέσος όρος. Στο φάσμα παρατηρούνται δύο περιοχές μεγάλης απορρόφησης στην υπέρυθη περιοχή και σταθερά μεγάλη απορρόφηση στο ορατό και το υπεριώδες (Εικόνα 3.10).



**Εικόνα 3.11:** Διαπερατότητα και ανάκλαση για την άνω επιφάνεια της μαύρης περιοχής στα 250-800 nm.

Στην υπεριώδη και ορατή περιοχή η διαπερατότητα και η ανάκλαση (Εικόνα 3.11) φαίνεται να έχουν σταθερά μικρές τιμές με εξαίρεση μια σταδιακή αύξηση προς το τέλος του ορατού. Οι δύο σειρές μετρήσεων εμφανίζουν επαναληψιμότητα. Οι τιμές διαπερατότητας είναι μηδενικές. Σε αυτό το σημείο του φάσματος (250-800 nm) οι δύο σειρές μετρήσεων για την ανάκλαση εμφανίζονται πολύ κοντινές και για αυτόν τον λόγο όπου χρειάζεται σύγκριση για την περιοχή 250-800 nm θα θεωρούνται και οι δύο σειρές ανάκλασης ως αληθείς (Εικόνα 3.11).

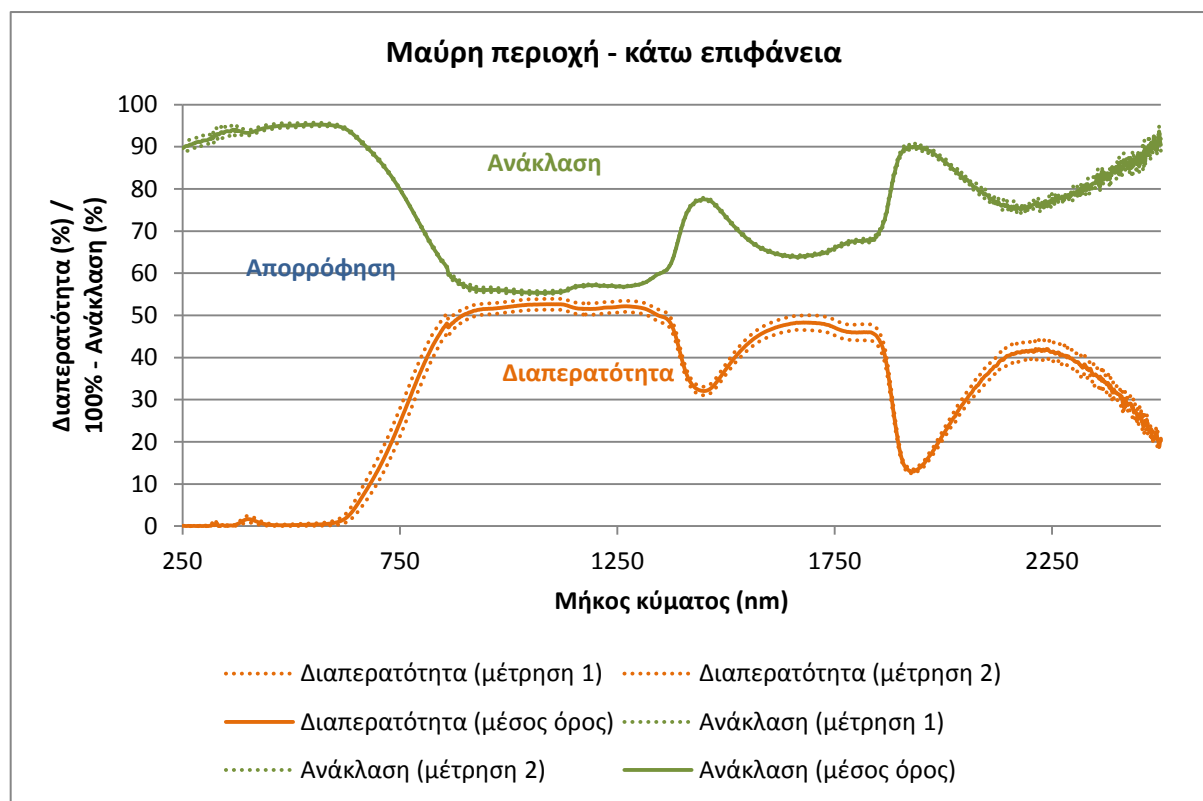




**Εικόνα 3.12:** Απορρόφηση για την άνω επιφάνεια της μαύρης περιοχής στα 250-800 nm.

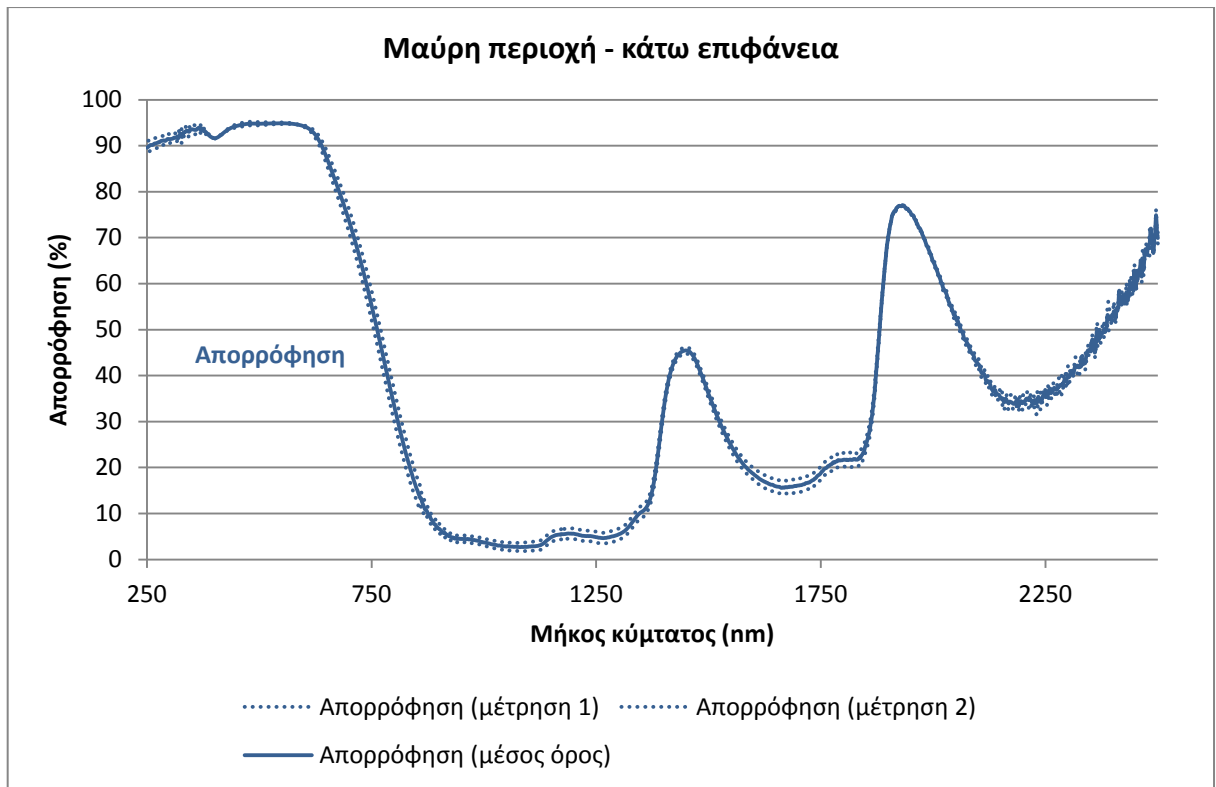
Οι τιμές απορρόφησης (Εικόνα 3.12) φαίνονται πολύ υψηλές (93-94,5%) και σχεδόν σταθερές έως περίπου τα 630 nm που αρχίζουν να φθίνουν.

### 3.3.2 Μαύρη περιοχή – κάτω επιφάνεια



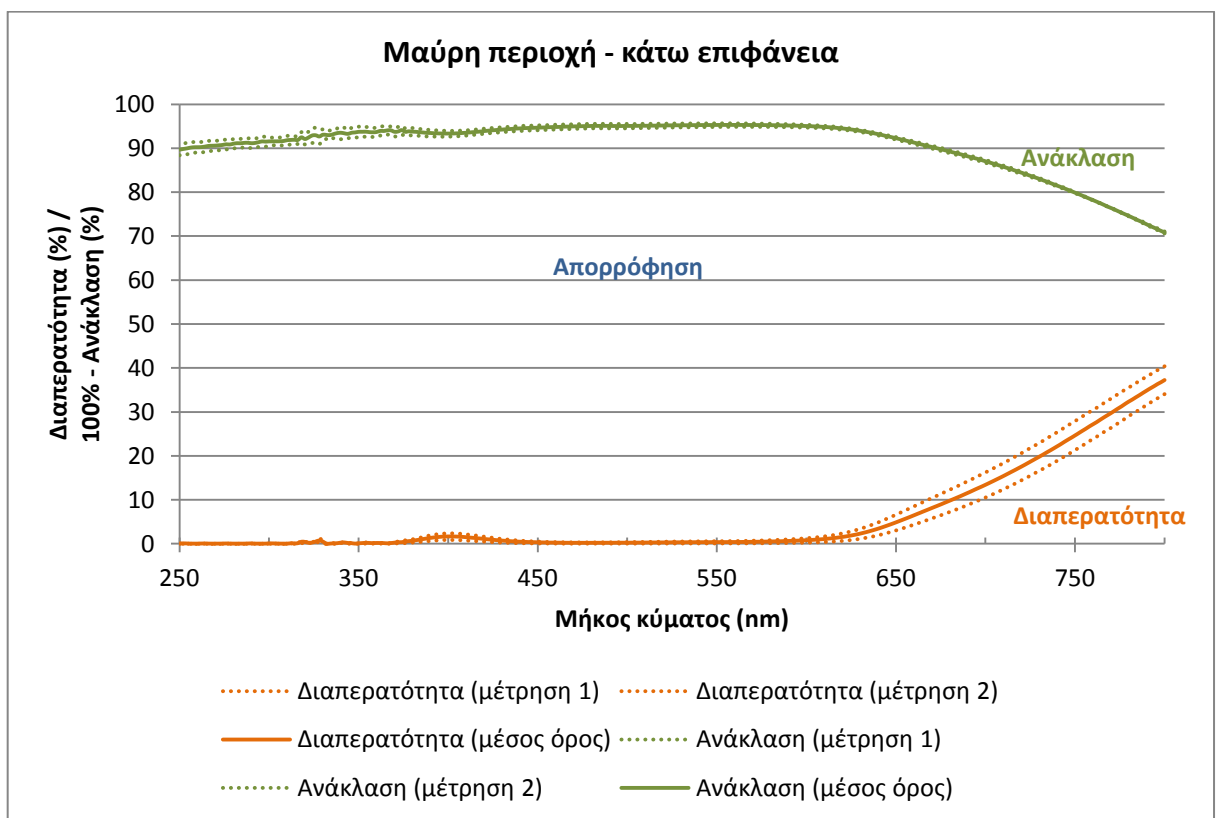
**Εικόνα 3.13:** Διαπερατότητα και ανάκλαση για την κάτω επιφάνεια της μαύρης περιοχής στα 250-2500 nm.

Οι καμπύλες της διαπερατότητας και της απορρόφησης (Εικόνα 3.13) έχουν παρόμοια μορφή, όπως φαίνεται και από τη συμμετρική τους απεικόνιση. Οι δύο σειρές μετρήσεις για τη διαπερατότητα και για την ανάκλαση δείχνουν εντυπωσιακή επαναληψιμότητα στις τιμές τους. Εν γένει οι τιμές διαπερατότητας είναι μεγαλύτερες από τις τιμές ανάκλασης (Εικόνα 3.13).



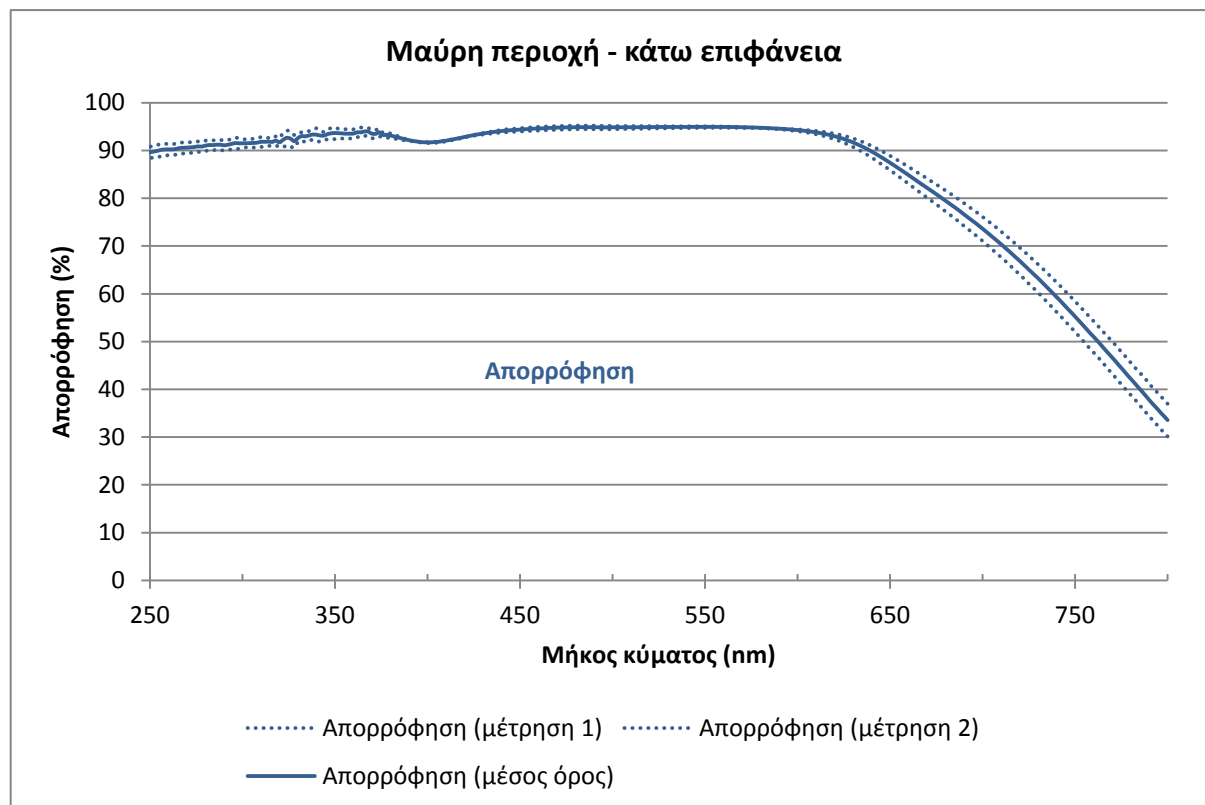
Εικόνα 3.14: Απορρόφηση για την κάτω επιφάνεια της μαύρης περιοχής στα 250-2500 nm.

Η καμπύλη απορρόφησης (Εικόνα 3.14) εμφανίζει δύο μέγιστα στην υπέρυθρη περιοχή και επιπλέον πολύ υψηλές τιμές στις περιοχές του υπεριώδους και του ορατού.



**Εικόνα 3.15: Διαπερατότητα και ανάκλαση για την κάτω επιφάνεια της μαύρης περιοχής στα 250-800 nm.**

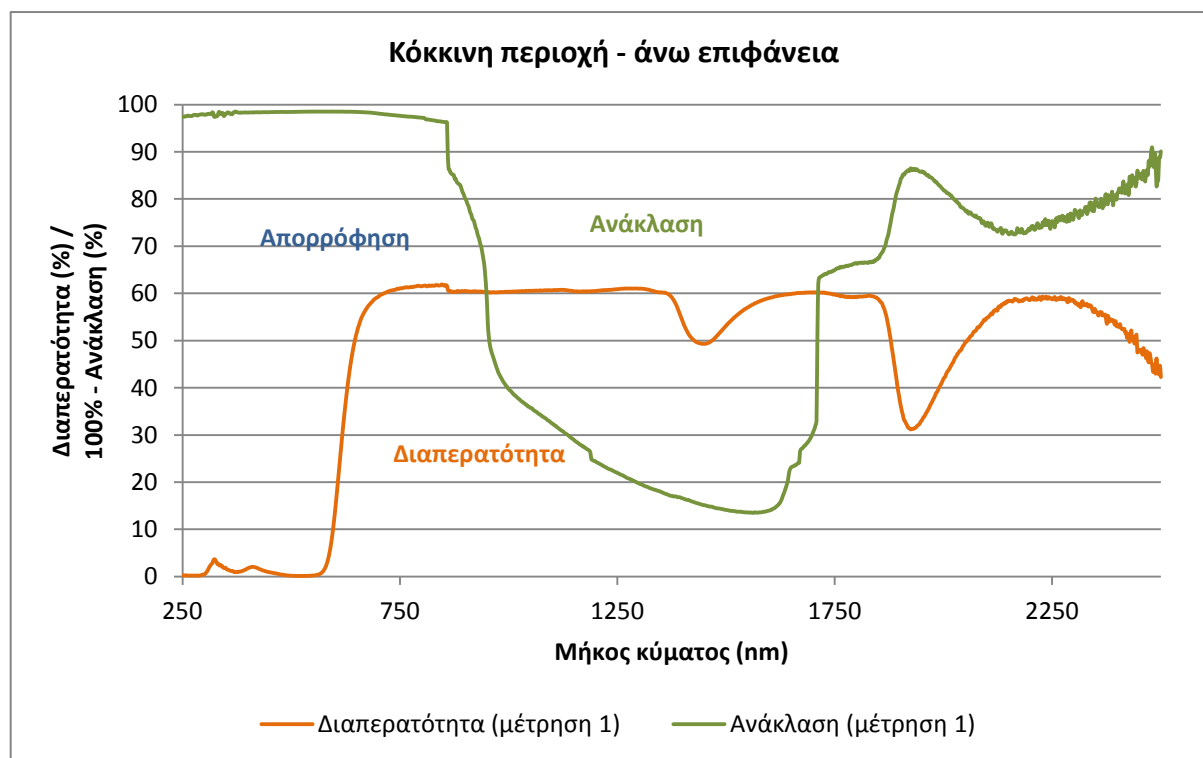
Στην περιοχή του υπεριώδους και ορατού η διαπερατότητα και η ανάκλαση (Εικόνα 3.15) είναι πολύ χαμηλές (η διαπερατότητα μηδενική) έως περίπου τα 650 nm που οι τιμές τους αρχίζουν να αυξάνονται, από αυτό το σημείο και μετά οι τιμές διαπερατότητας υπερέρχουν από τις τιμές ανάκλασης (Εικόνα 3.15).



**Εικόνα 3.16: Απορρόφηση για την κάτω επιφάνεια της μαύρης περιοχής στα 250-800 nm.**

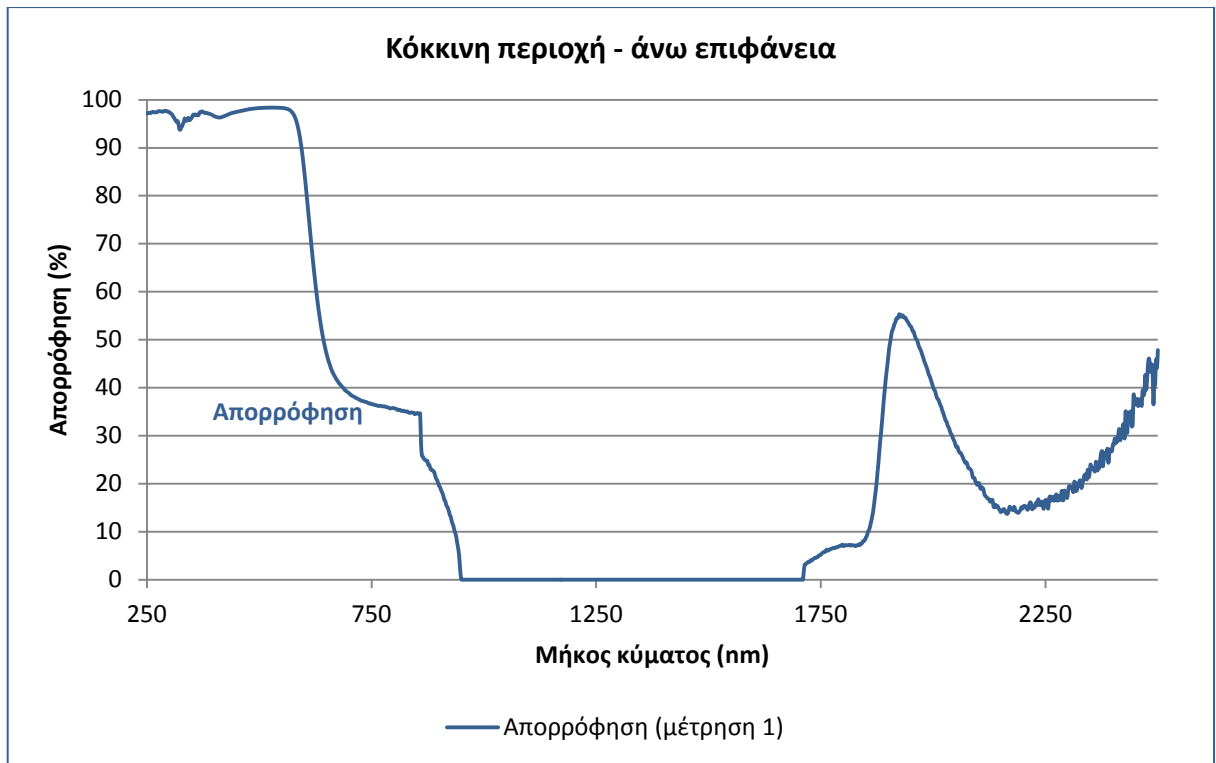
Η απορρόφηση στο υπεριώδες και το ορατό (Εικόνα 3.16) είναι πολύ υψηλή και σχεδόν σταθερή (92-94,9%) και αρχίζει να φθίνει έντονα περίπου στα 620 nm. Η απορρόφηση εμφανίζει μια μικρή μείωση γύρω από την περιοχή των 400 nm (Εικόνα 3.16).

### 3.3.3 Κόκκινη περιοχή – άνω επιφάνεια



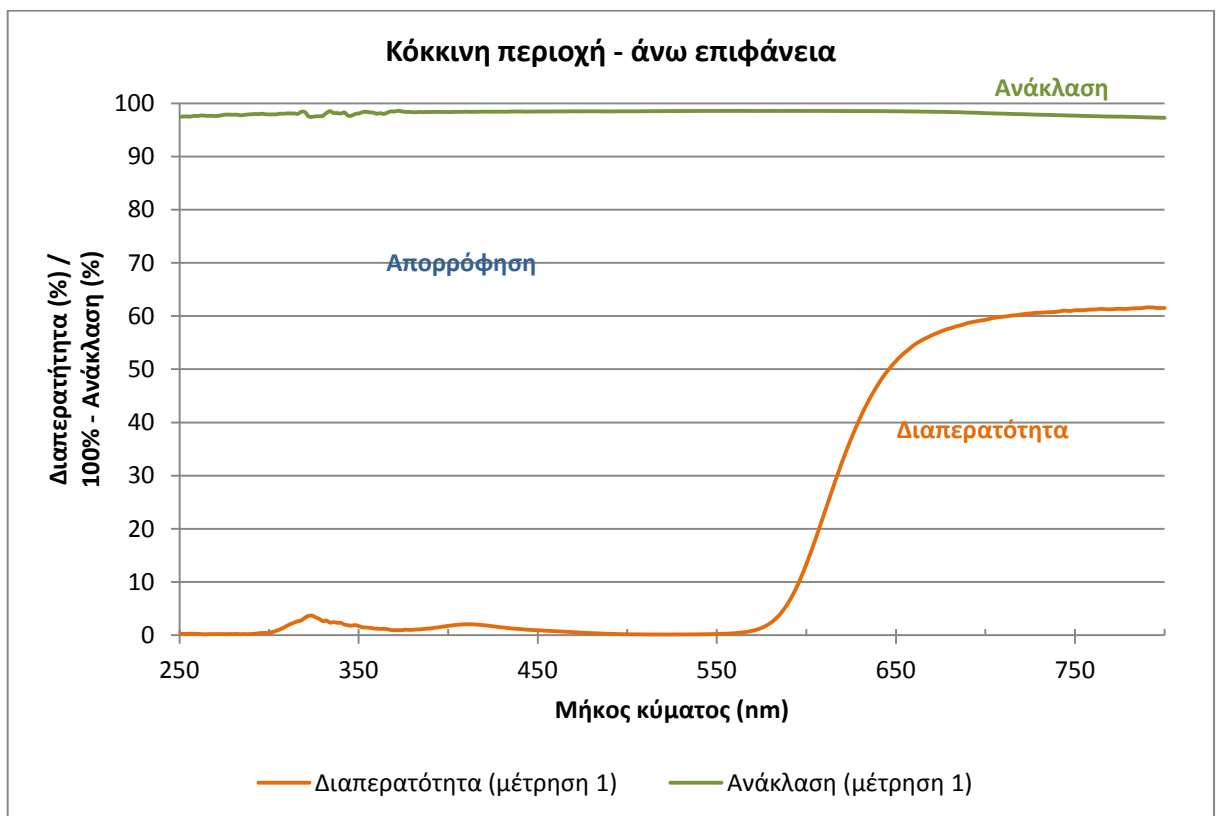
**Εικόνα 3.17:** Διαπερατότητα και ανάκλαση για την άνω επιφάνεια της κόκκινης περιοχής στα 250-2500 nm.

Κατά το τέλος της λήψης τη σειράς μετρήσεων ανάκλασης που φαίνεται στην εικόνα 3.17 το δείγμα είχε ξεκολλήσει από την ειδική εισδοχή και η δέσμη δεν διερχόταν από το υλικό (η μέτρηση έγινε από τα 2500 προς τα 250 nm). Επομένως η συγκεκριμένη σειρά μετρήσεων ανάκλασης από κάποιο σημείο και μετά είναι πλήρως αναληθής. Από τα δεδομένα της μέτρησης φαίνεται ότι το πρόβλημα προέκυψε κάπου στα 1710 nm. Αυτό φαίνεται και από τη γραφική παράσταση της καμπύλης ανάκλασης (Εικόνα 3.17). Μέχρι εκείνο το σημείο οι καμπύλες διαπερατότητας και ανάκλασης είναι παρόμοιες, με τις τιμές της διαπερατότητας να είναι μεγαλύτερες. Από την καμπύλη της διαπερατότητας εικάζεται ότι η καμπύλη απορρόφησης θα αναμενόταν να εμφάνιζε δύο μέγιστα στο υπέρυθρο και κάποια έντονη και σταθερή απορρόφηση σε ένα μέρος του ορατού και στο υπεριώδες (Εικόνα 3.17).



Εικόνα 3.18: Απορρόφηση για την άνω επιφάνεια της κόκκινης περιοχής στα 250-2500 nm.

Η μέτρηση της εικόνας 3.18 κρίνεται αξιόπιστη μόνο για τη ζώνη 1710-2500 nm, στην οποία περιλαμβάνεται ένα μέγιστο απορρόφησης.





**Εικόνα 3.19: Διαπερατότητα και ανάκλαση για την άνω επιφάνεια της κόκκινης περιοχής στα 250-800 nm.**

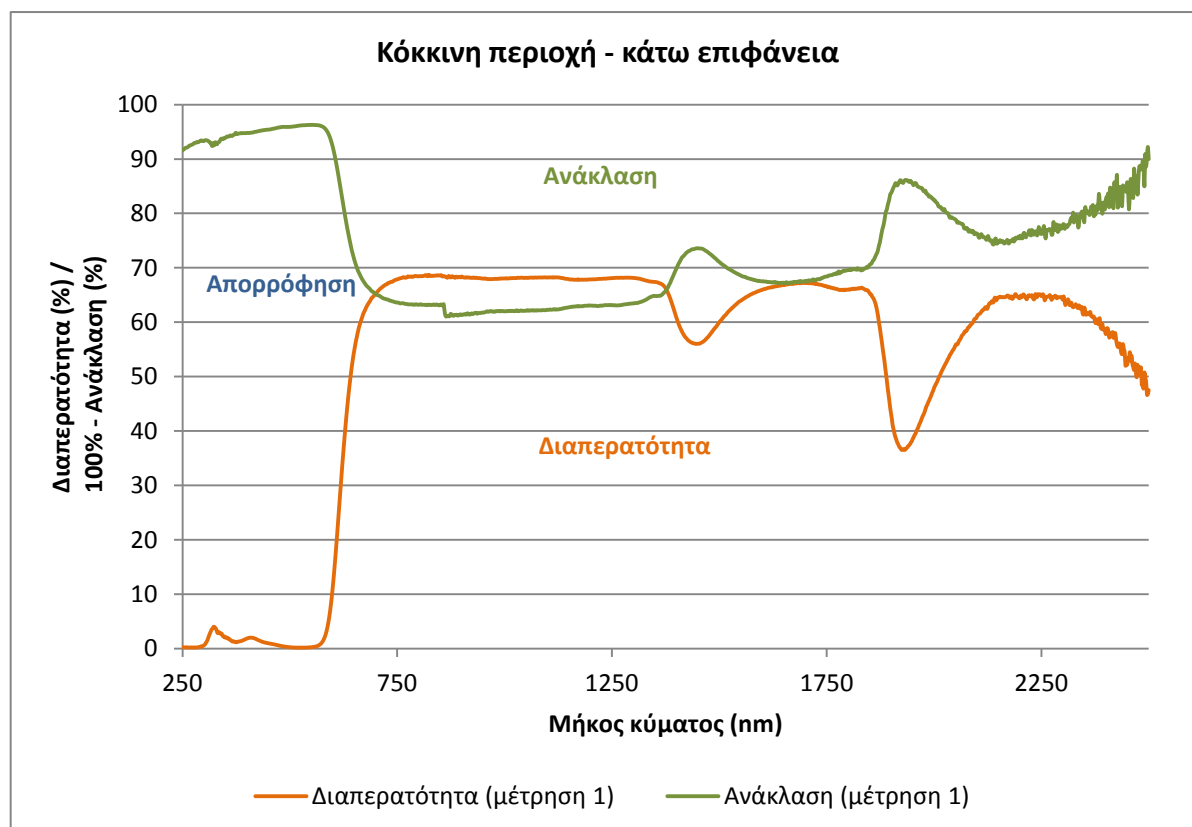
Οι μετρήσεις ανάκλασης (Εικόνα 3.19) είναι εντελώς αναληθείς. Στην περιοχή 250-800 nm η διαπερατότητα εμφανίζεται σχεδόν μηδενική μέχρι λίγο μετά τα μισά του ορατού φάσματος, όπου και αυξάνεται με μεγάλο τάχος (Εικόνα 3.19).



**Εικόνα 3.20: Απορρόφηση για την άνω επιφάνεια της κόκκινης περιοχής στα 250-800 nm.**

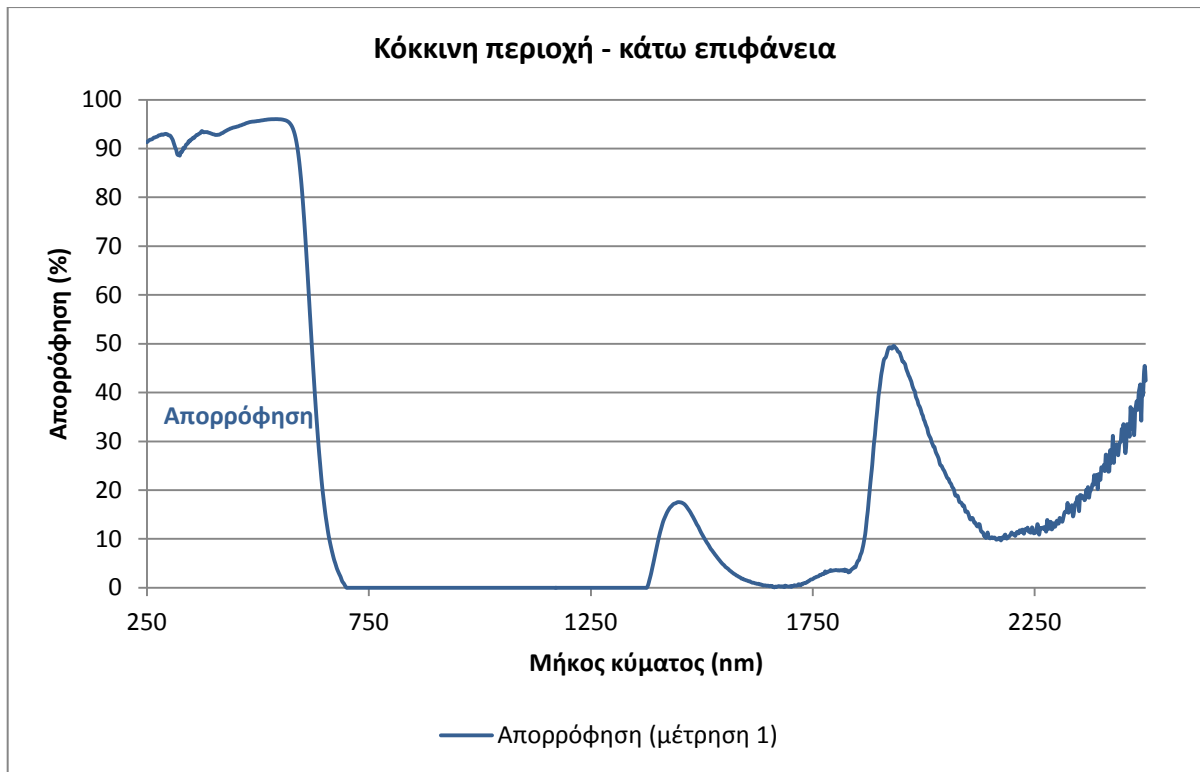
Οι τιμές της απορρόφησης της εικόνας 3.20 είναι εν μέρει αληθείς. Αφού οι αναληθείς τιμές απορρόφησης είναι σταθερές και σχεδόν μηδενικές (Εικόνα 3.19), στην πράξη η απορρόφηση (Εικόνα 3.20) ισοδυναμεί με τη σχέση 100-διαπερατότητα. Δεδομένου ότι σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν οι καμπύλες διαπερατότητας και ανάκλασης έχουν παρόμοια μορφή, εικάζεται ότι η πραγματική καμπύλη απορρόφησης της εικόνας 3.20 θα έχει ίδια γενική μορφή με την εικονιζόμενη της εικόνας 3.20, αλλά διαφορετικές τιμές απορρόφησης. Η απορρόφηση φαίνεται υψηλή και σχεδόν σταθερή έως τα 570 nm, από τα οποία και έπειτα ακολουθεί έντονη μείωση (Εικόνα 3.20).

### 3.3.4 Κόκκινη περιοχή – κάτω επιφάνεια



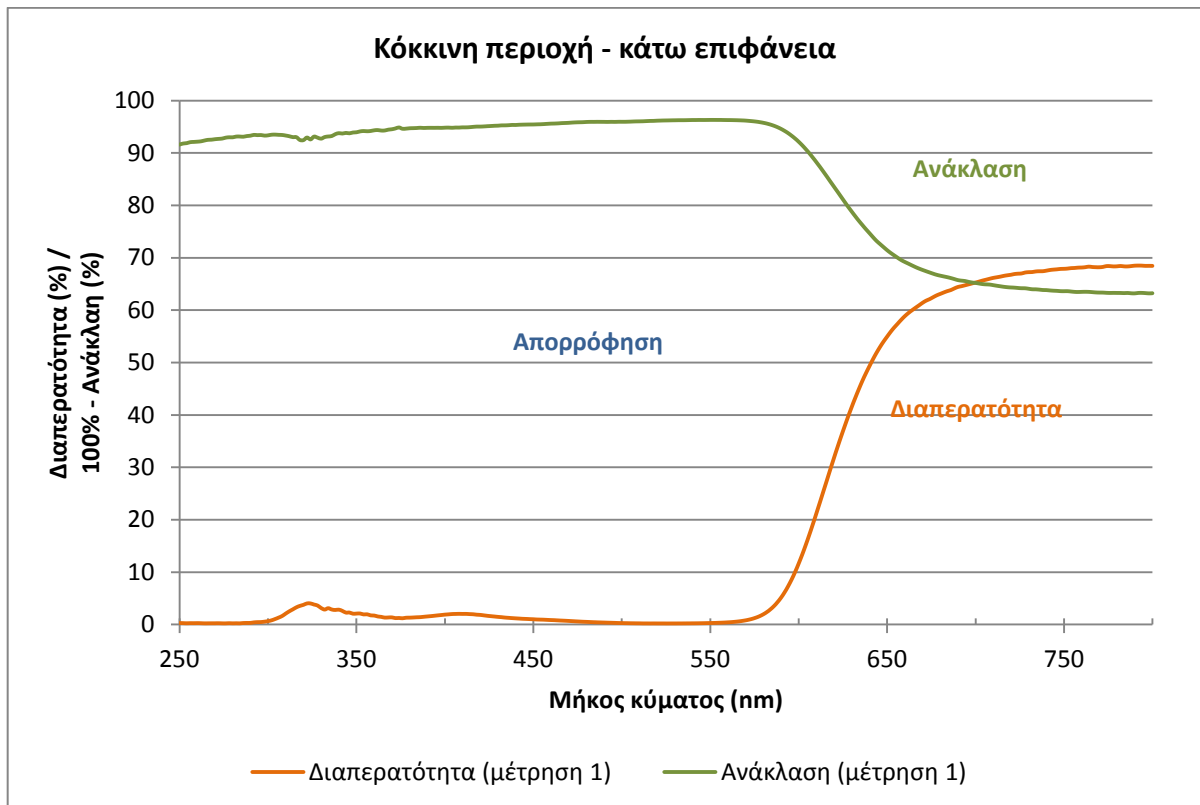
**Εικόνα 3.21:** Διαπερατότητα και ανάκλαση για την κάτω επιφάνεια της κόκκινης περιοχής στα 250-2500 nm.

Οι καμπύλες διαπερατότητας και ανάκλασης (Εικόνα 3.21) εμφανίζουν παρόμοια μορφή αλλά η καμπύλη της διαπερατότητας εμφανίζει σαφώς μεγαλύτερες τιμές και σαφώς εντονότερες διακυμάνσεις. Στη ζώνη των 700-1380 nm παρατηρείται μία ευρεία διασταύρωση στις καμπύλες (Εικόνα 3.21). Ωστόσο επειδή δεν υπήρχαν άλλες μετρήσεις, και επιπλέον επειδή η διασταύρωση ήταν μεγέθους λιγότερου από 7%, δεν απορρίφθηκαν οι μετρήσεις διαπερατότητας και ανάκλασης. Στο σημείο της διασταύρωσης (700-1380 nm) η απορρόφηση θεωρήθηκε ίση με 0 (Εικόνα 3.21).



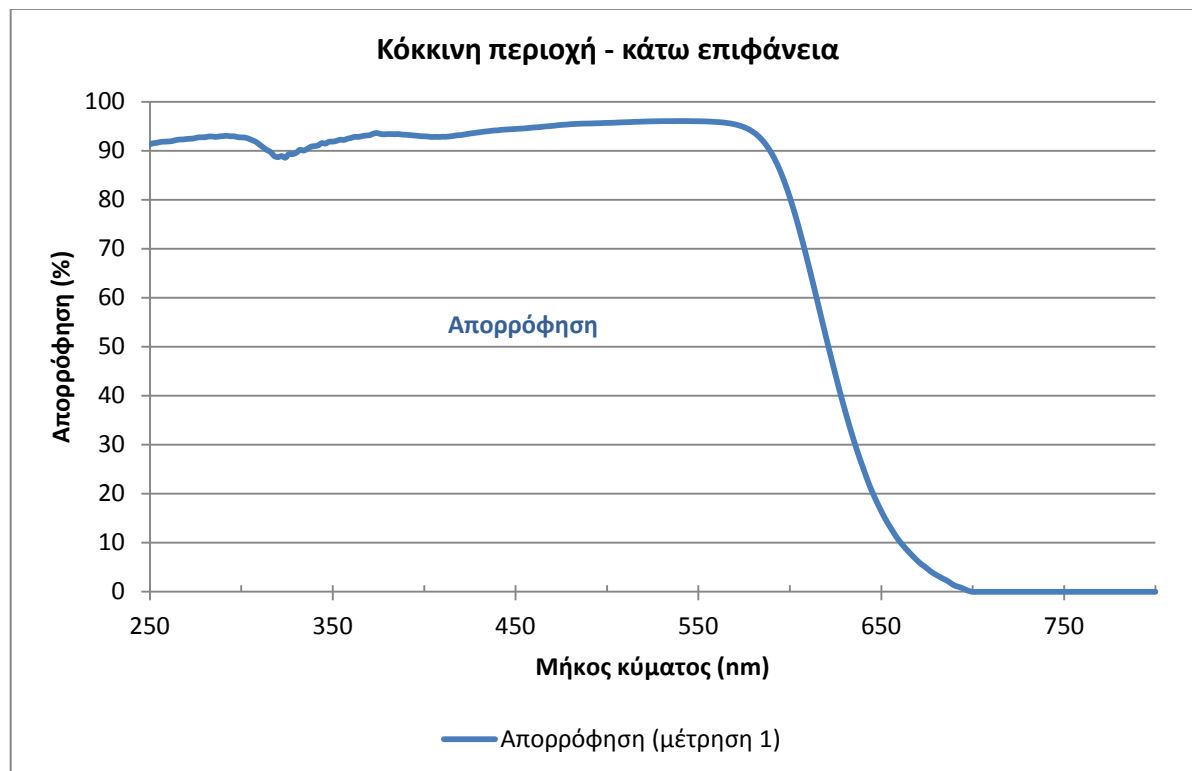
Εικόνα 3.22: Απορρόφηση για την κάτω επιφάνεια της κόκκινης περιοχής στα 250-2500 nm.

Από την καμπύλη απορρόφησης (Εικόνα 3.22) φαίνονται δύο μέγιστα στην υπέρυθρη περιοχή και πολύ υψηλή και σταθερή απορρόφηση στο υπεριώδες και ένα τμήμα του ορατού φάσματος.



**Εικόνα 3.23: Διαπερατότητα και ανάκλαση για την κάτω επιφάνεια της κόκκινης περιοχής στα 250-800 nm.**

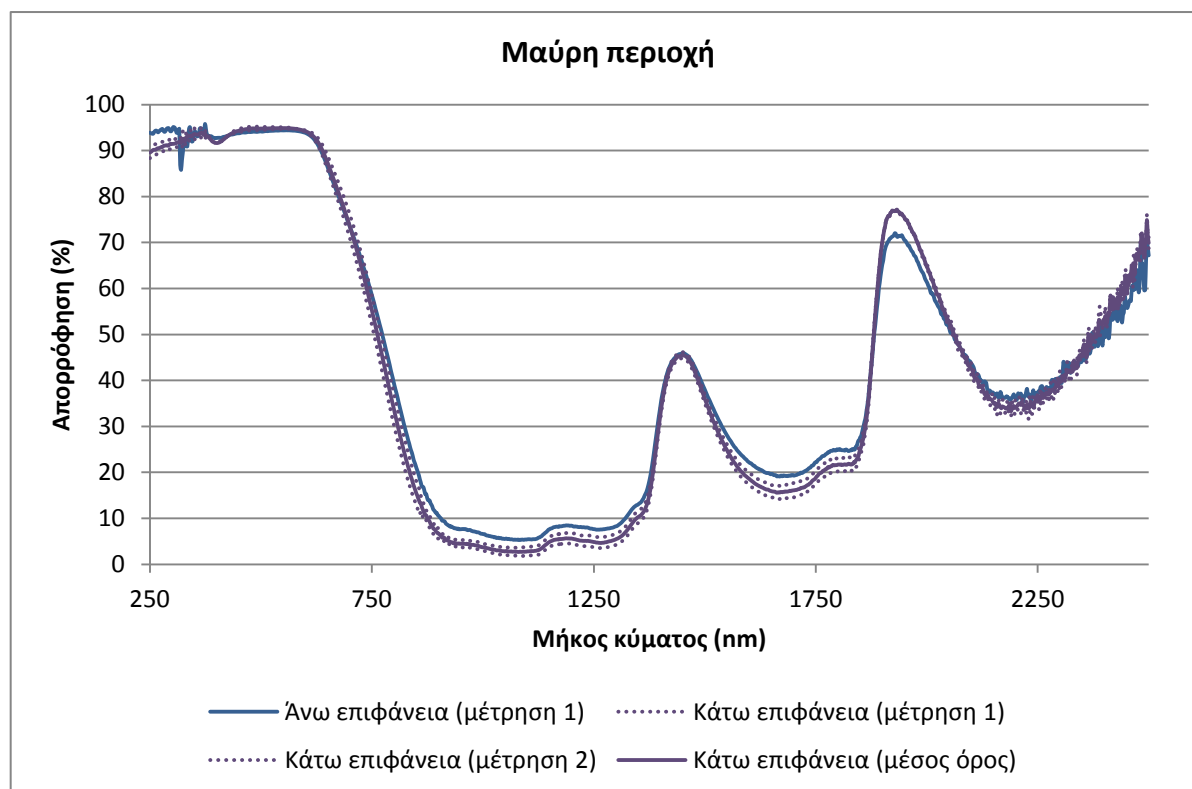
Οι καμπύλες διαπερατότητας και ανάκλασης (Εικόνα 3.23) έχουν παρόμοια μορφή. Στο υπεριώδες και σε ένα αρκετά μεγάλο μέρος του ορατού η διαπερατότητα και η ανάκλαση είναι πολύ χαμηλές, ενώ στη συνέχεια αυξάνονται έντονα (Εικόνα 3.23).



**Εικόνα 3.24: Διαπερατότητα και ανάκλαση για την άνω επιφάνεια της μαύρης περιοχής στα 250-2500 nm.**

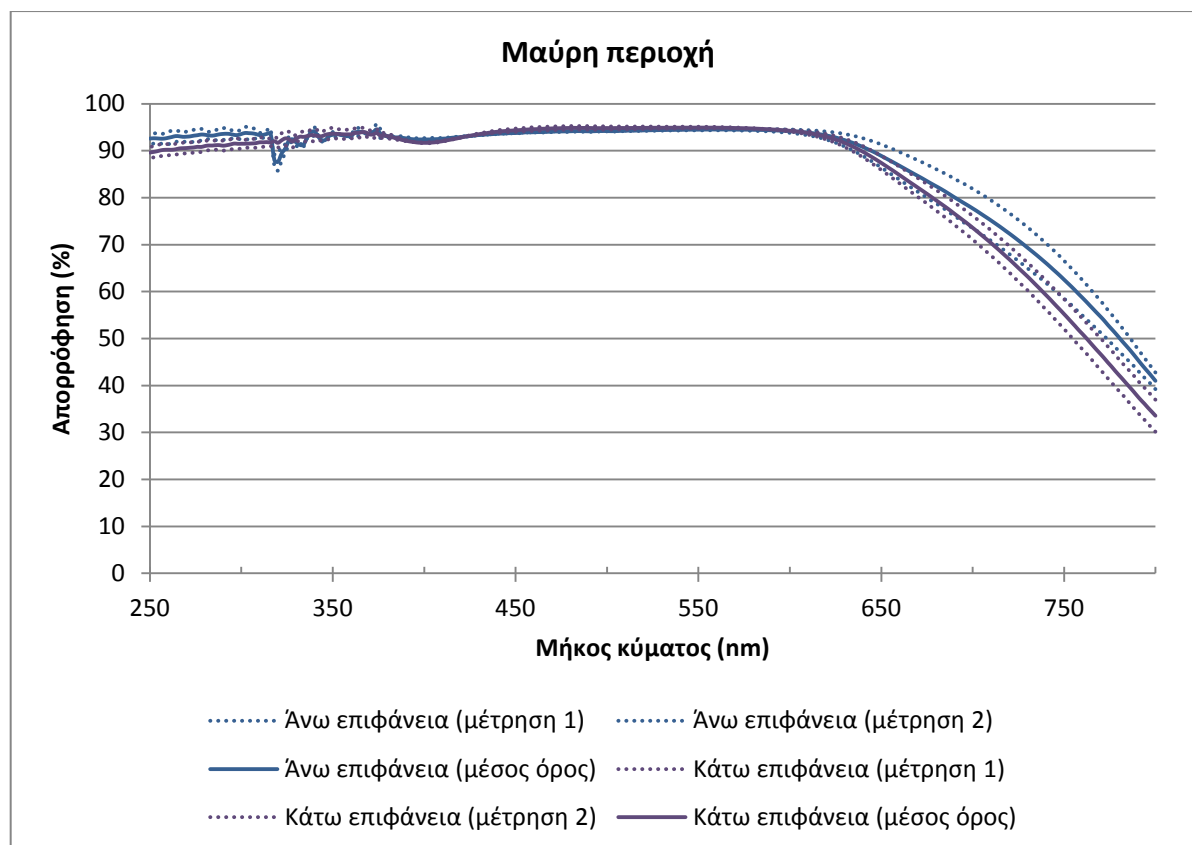
Η απορρόφηση που απεικονίζεται στην εικόνα 3.24 είναι αρκετά σταθερή και υψηλή (92-96%) έως περίπου τα 570 nm. Στη συνέχεια μειώνεται απότομα έως περίπου τα 700 nm όπου μηδενίζεται. Παρατηρείται μία μείωση της απορρόφησης στα 320 nm και ενδεχομένως μια αδιόρατη μείωση στα 410 nm (Εικόνα 3.24).

### 3.3.5 Μαύρη περιοχή – σύγκριση των δύο επιφανειών



**Εικόνα 3.25:** Σύγκριση της απορρόφησης για την άνω και την κάτω επιφάνεια της μαύρης περιοχής στα 250-2500 nm.

Με βάση την εικόνα 3.25, εμφανίζεται εξαιρετική ταύτιση για τις μετρήσεις από την άνω και από την κάτω επιφάνεια της μαύρης περιοχής του πετάλου.

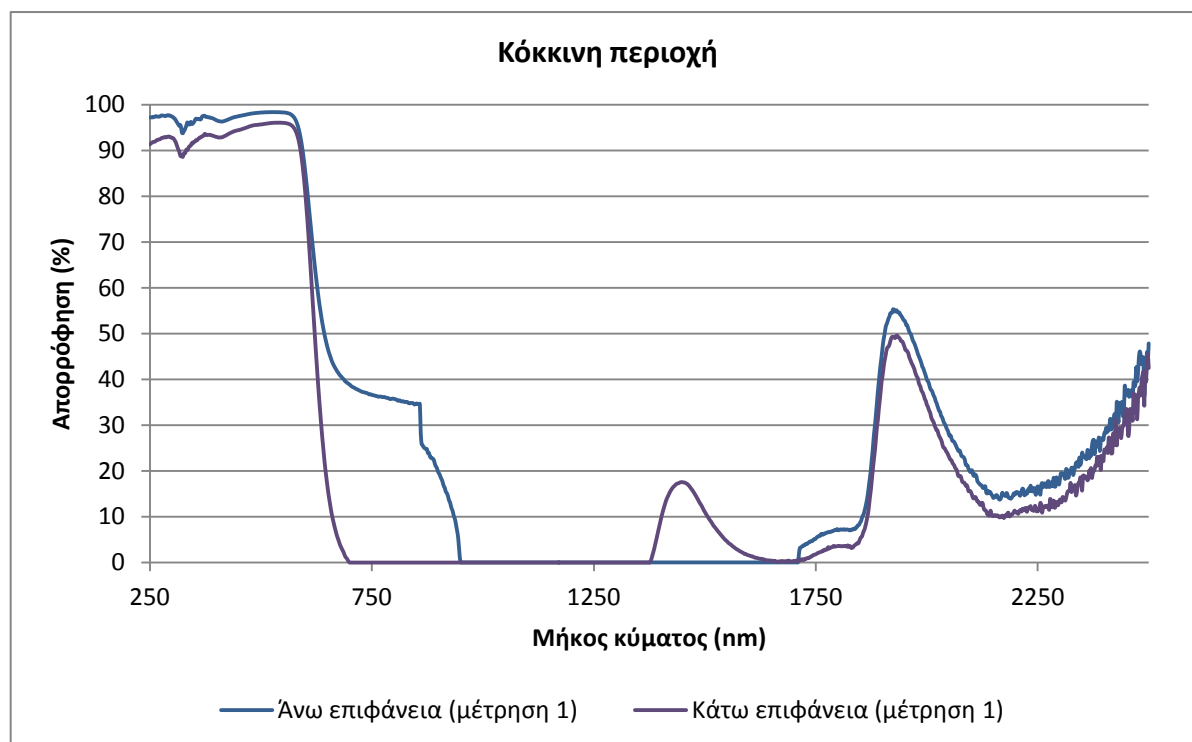


**Εικόνα 3.26:** Σύγκριση της απορρόφησης για την άνω και την κάτω επιφάνεια της μαύρης περιοχής στα 250-800 nm.

Στο εύρος 250-800 nm φαίνεται εξαιρετική εγγύτητα στα δύο φάσματα απορρόφησης (άνω και κάτω επιφάνεια της μαύρης περιοχής (Εικόνα 3.26). Στην περιοχή που η απορρόφηση είναι σταθερή (περίπου 250-630 nm) τα φάσματα από τις δύο επιφάνειες ταυτίζονται, ενώ στη συνέχεια η απορρόφηση από την κάτω επιφάνεια φέρει ελαφρά μεγαλύτερη πτωτική τάση (Εικόνα 3.26).

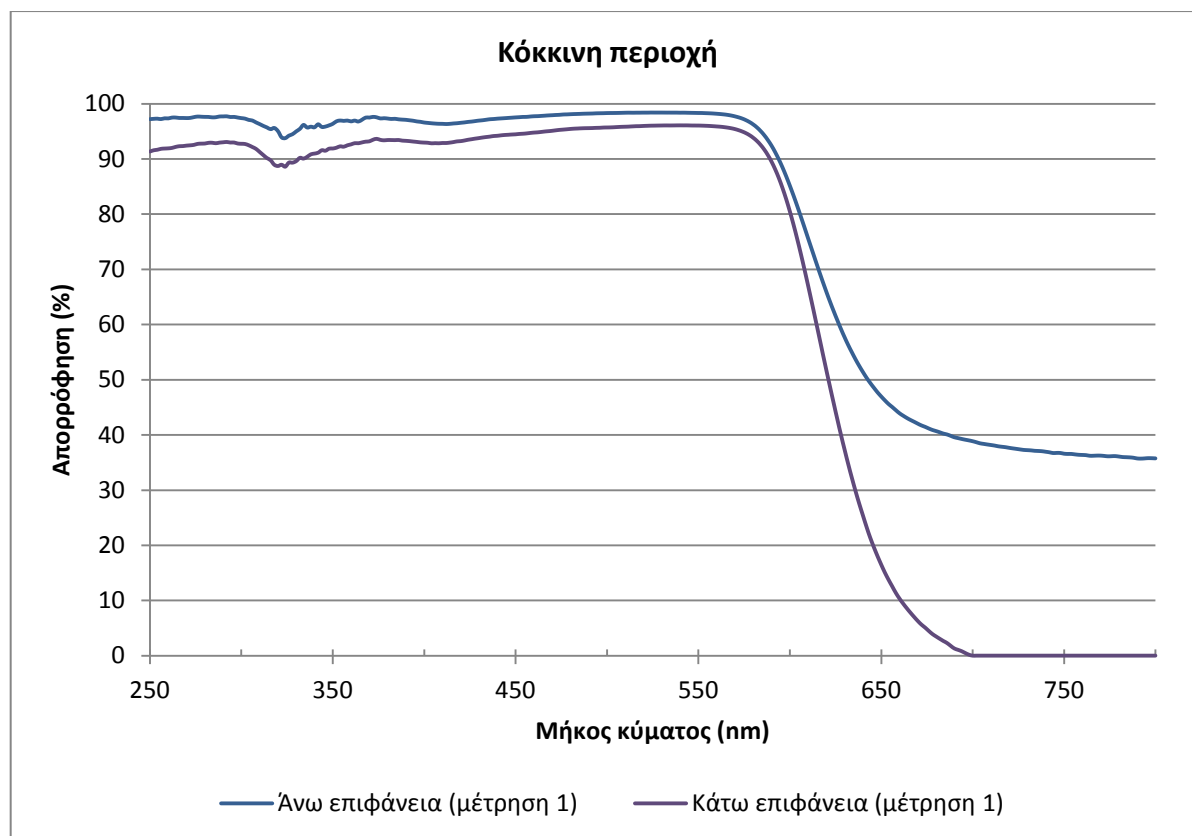


### 3.3.6 Κόκκινη περιοχή – σύγκριση των δύο επιφανειών



**Εικόνα 3.27:** Σύγκριση της απορρόφησης για την άνω και την κάτω επιφάνεια της κόκκινης περιοχής στα 250-2500 nm.

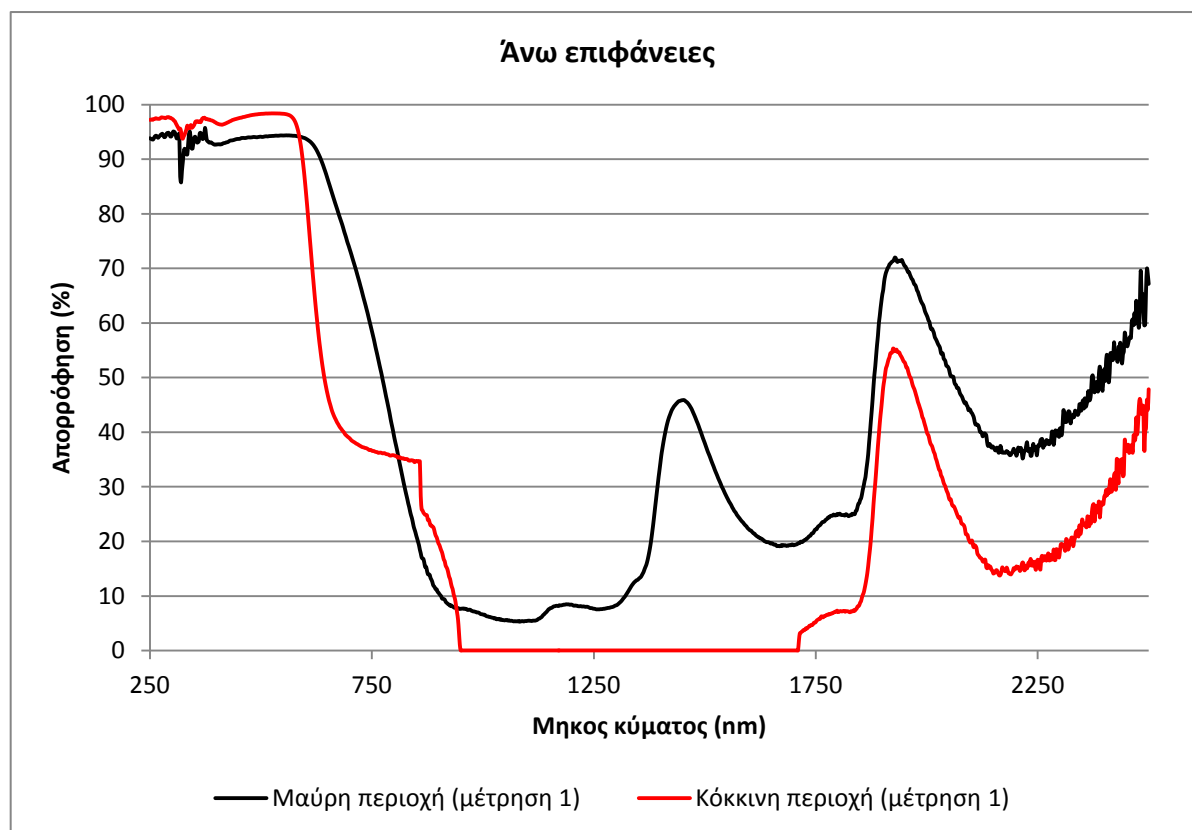
Η απορρόφηση για από την άνω επιφάνεια της κόκκινης περιοχής (Εικόνα 3.27) δεν μπορεί να ληφθεί ως αξιόπιστη μέτρηση στο εύρος 250-1710 nm. Στην περιοχή 1710-2500 nm εμφανίζεται εντονότατη ομοιότητα στις καμπύλες απορρόφησης για την άνω και την κάτω επιφάνεια της κόκκινης περιοχής (Εικόνα 3.27).



**Εικόνα 3.28:** Σύγκριση της απορρόφησης για την άνω και την κάτω επιφάνεια της κόκκινης περιοχής στα 250-800 nm.

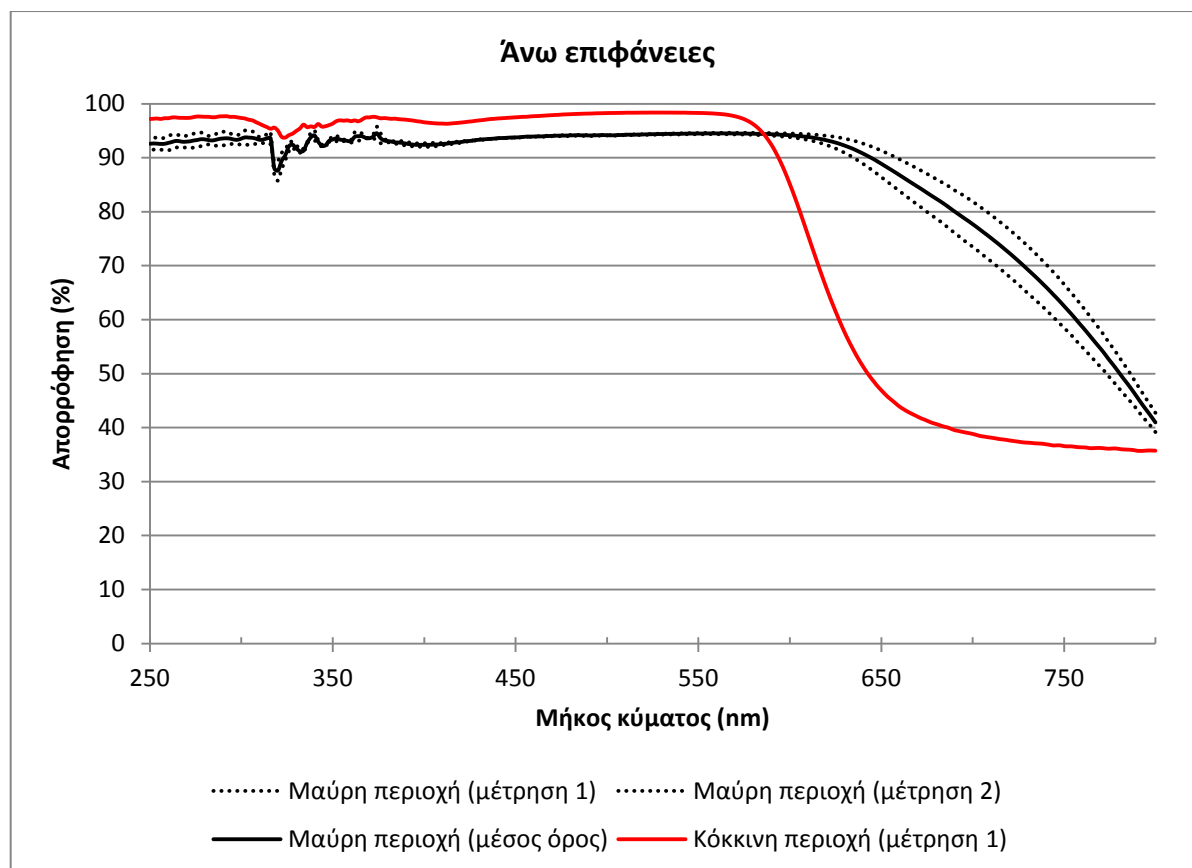
Η καμπύλη απορρόφησης για την άνω επιφάνεια της κόκκινης περιοχής (Εικόνα 3.28) μπορεί να θεωρηθεί ενδεικτική για τη γενική μορφή του φάσματος αλλά δεν συμβαίνει το ίδιο για τις τιμές απορρόφησης της καμπύλης, για λόγους που έχουν ήδη αναφερθεί. Η γενική μορφή για τις καμπύλες απορρόφησης της κάτω και της άνω επιφάνειας της κόκκινης περιοχής δύο φασμάτων είναι όμοια (Εικόνα 3.28).

### 3.3.7 Άνω επιφάνειες – σύγκριση των δύο περιοχών



**Εικόνα 3.29:** Σύγκριση της απορρόφησης της άνω επιφάνειας για την κόκκινη και τη μαύρη περιοχή στα 250-2500 nm.

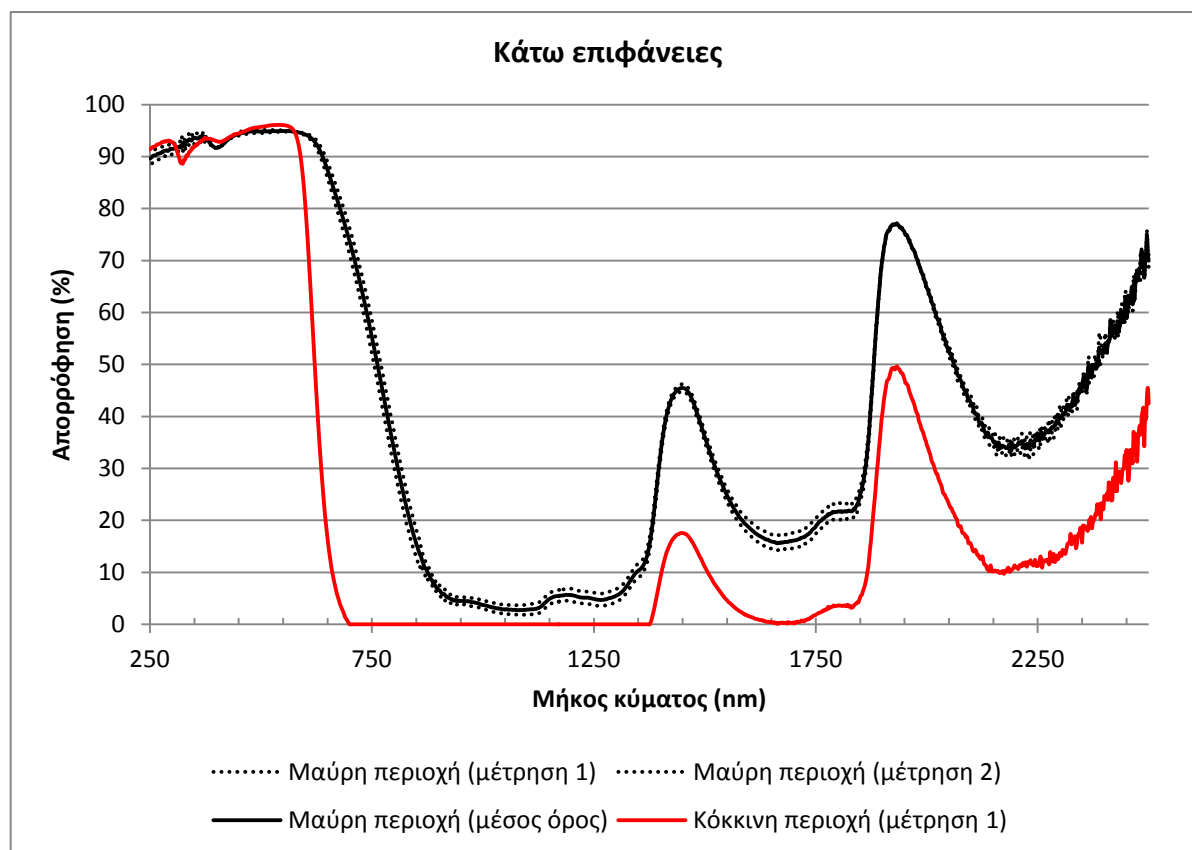
Η απορρόφηση από την άνω επιφάνεια της κόκκινης περιοχής (Εικόνα 3.29) δεν μπορεί να ληφθεί ως αξιόπιστη μέτρηση στο εύρος 250-1710 nm. Στην περιοχή 1710-2500 nm εμφανίζεται έντονη ομοιότητα στη γενική μορφή των φασμάτων (Εικόνα 3.29). Ωστόσο η κόκκινη περιοχή εμφανίζει μικρότερες τιμές απορρόφησης και ελαφρά μετατοπισμένο το υπέρυθρο μέγιστο προς μικρότερο μήκος κύματος (Εικόνα 3.29).



**Εικόνα 3.30:** Σύγκριση της απορρόφησης της άνω επιφάνειας για την κόκκινη και τη μαύρη περιοχή στα 250-800 nm.

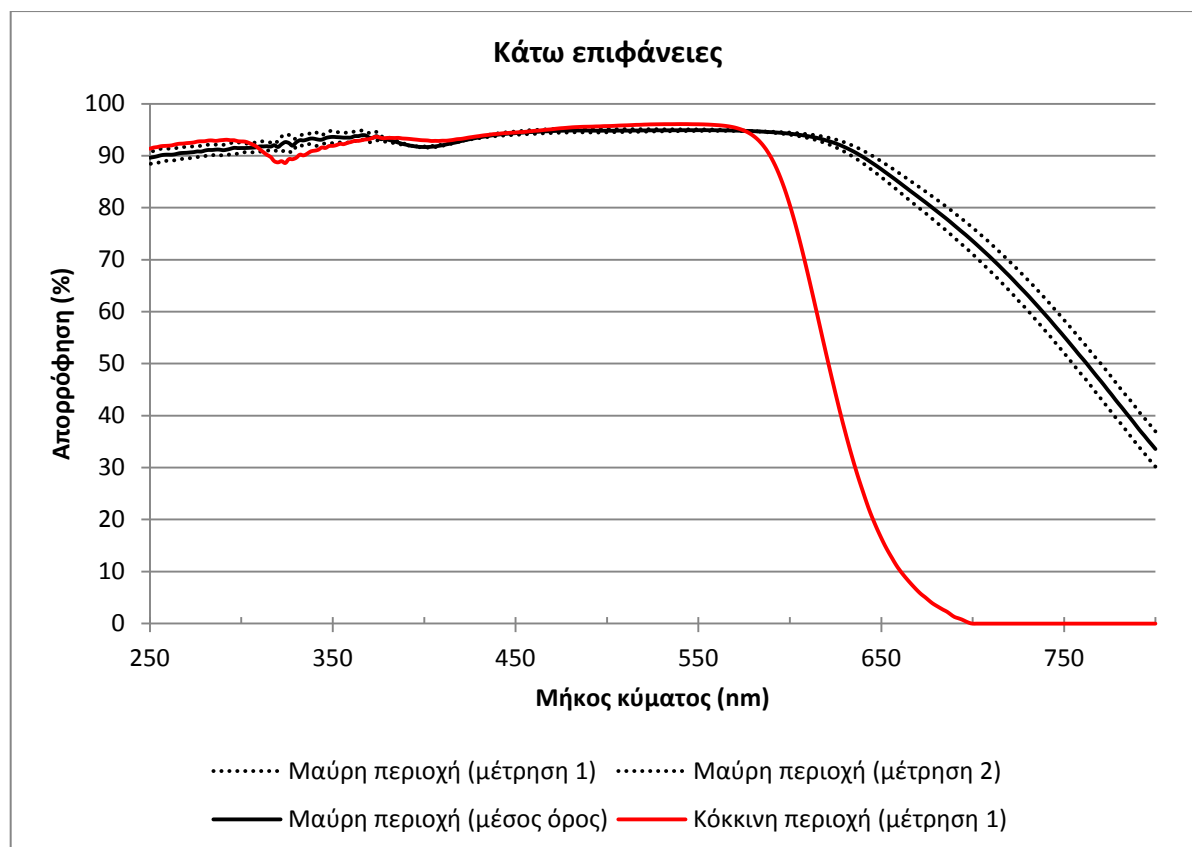
Η καμπύλη απορρόφησης για την άνω επιφάνεια της κόκκινης περιοχής (Εικόνα 3.30) μπορεί να θεωρηθεί ενδεικτική ως προς τη γενική μορφή αλλά όχι ως προς τις τιμές απορρόφησης, για λόγους που έχουν ήδη αναφερθεί. Ως προς τη μορφή της καμπύλης απορρόφησης εμφανίζεται διαφοροποίηση μεταξύ κόκκινης και μαύρης περιοχής καθώς η καμπύλη της κόκκινης περιοχής φθίνει από μικρότερο μήκος κύματος (σχεδόν στη μέση του ορατού φάσματος) και πολύ πιο απότομα συγκριτικά με την καμπύλη της μαύρης περιοχής (Εικόνα 3.30).

### 3.3.8 Κάτω επιφάνειες – σύγκριση των δύο περιοχών



**Εικόνα 3.31:** Σύγκριση της απορρόφησης της κάτω επιφάνειας για την κόκκινη και τη μαύρη περιοχή στα 250-2500 nm.

Οι καμπύλες απορρόφησης από την κόκκινη και τη μαύρη περιοχή (Εικόνα 3.31) είναι παρόμοιας μορφής αν και η καμπύλη από την κόκκινη περιοχή είναι μικρότερης έντασης από την καμπύλη του μαύρου στην υπέρυθρη περιοχή (Εικόνα 3.31). Επίσης τα μέγιστα της υπέρυθρης περιοχής φαίνονται να είναι ελαφρά μετατοπισμένα προς μικρότερα μήκη κύματος για την κόκκινη περιοχή (Εικόνα 3.31).



**Εικόνα 3.32:** Σύγκριση της απορρόφησης της κάτω επιφάνειας για την κόκκινη και τη μαύρη περιοχή στα 250-800 nm.

Οι καμπύλες απορρόφησης (Εικόνα 3.32) από τις κάτω επιφάνειες από την κόκκινη και τη μαύρη περιοχή εμφανίζουν σαφή διαφοροποίηση. Για την περιοχή της υψηλής και σταθερής απορρόφησης είναι σχεδόν ταυτόσημες, αλλά η απορρόφηση κόκκινης περιοχής ξεκινά να μειώνεται έντονα σε μικρότερο μήκος κύματος (σχεδόν στη μέση του ορατού φάσματος) και έως πολύ πιο χαμηλή τιμή (ενδεχομένως και μηδενική) σε σχέση με την καμπύλη από τη μαύρη περιοχή (Εικόνα 3.32).

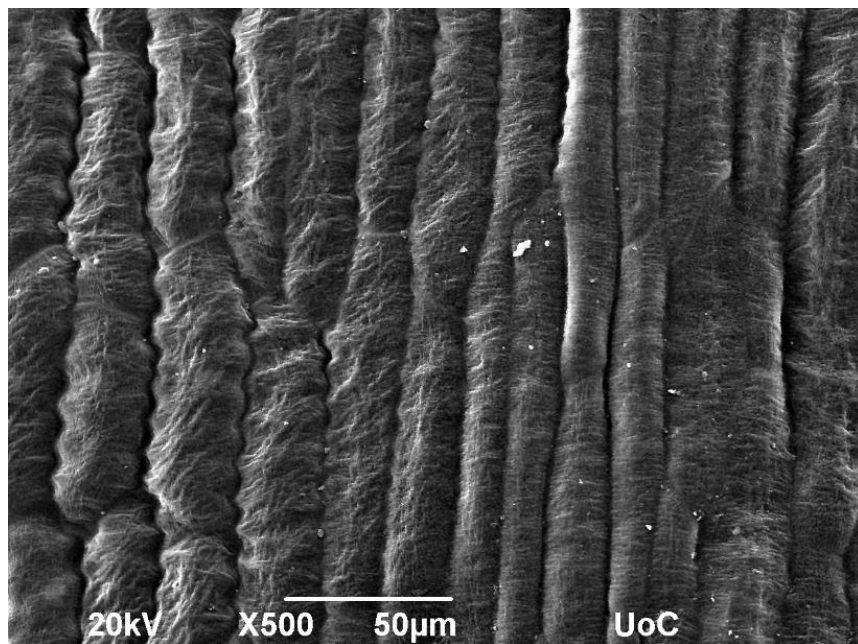


### 3.4 Ηλεκτρονιογραφίες SEM

Οι ηλεκτρονιογραφίες σάρωσης λήφθηκαν με SEM (JEOL JSM-6390LV Scanning Electron Microscope) από δείγματα της άνω και της κάτω επιφάνειας από την κόκκινη και τη μαύρη περιοχή του πετάλου. Τα δείγματα είχαν υποστεί στερέωση με γλουταρική αλδεΐδη, μεταστερέωση με  $\text{OsO}_4$ , αφυδάτωση με ακετόνη, ξήρανση κρίσιμου σημείου και επικάλυψη με Au ολικού πάχους 10 ή 20 nm.

Η κάλυψη έγινε για τη μελέτη του ανάγλυφου των κυττάρων και των εφυμενδιακών ποικίσεων. Παρατηρήθηκαν περιοχές με πολύ έντονες ποικίσεις, αλλά σε πολλά σημεία μελέτης οι ποικίσεις φαίνονταν κατεστραμμένες, όπως μαρτυρούσαν και απομονωμένα σωματίδια κηρών που εντοπίστηκαν. Επομένως σε αρκετά σημεία πιθανώς γίνεται υποεκτίμηση της ανάπτυξης του αναγλύφου. Δεν είναι γνωστό αν η μερική καταστροφή της εφυμενίδας έγινε κατά τον γενικό χειρισμό του υλικού ή κατά τη διαδικασία της στερέωσης και αφυδάτωσης. Επιπλέον σε κάποια σημεία τα κύτταρα φαίνονταν να έχουν μειωθεί σε κυτταρικό όγκο, γεγονός που δείχνει τοπική δυσλειτουργία της διαδικασίας της αφυδάτωσης. Στόματα εντοπίστηκαν και στις τέσσερις περιοχές μελέτης, αν και δεν έχουν επιλεγεί όλες οι αντίστοιχες ηλεκτρονιογραφίες για να παρουσιαστούν. Ακολουθούν επιλεγμένες ηλεκτρονιογραφίες.

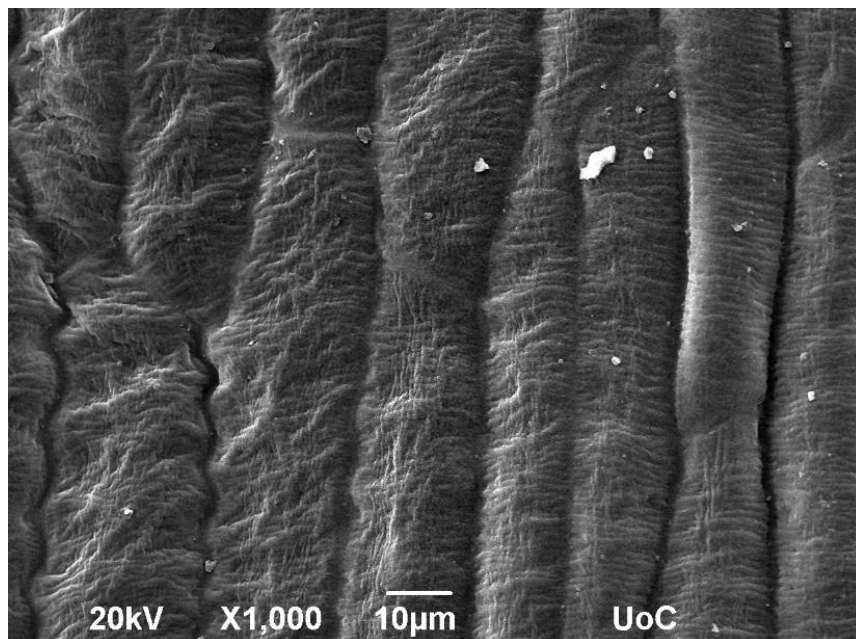
#### Μαύρη περιοχή – άνω επιφάνεια



*Εικόνα 3.33: Ηλεκτρονιογραφία SEM της άνω επιφάνειας από τη μαύρη περιοχή. Ο δείκτης μεγέθυνσης είναι 50  $\mu\text{m}$ .*

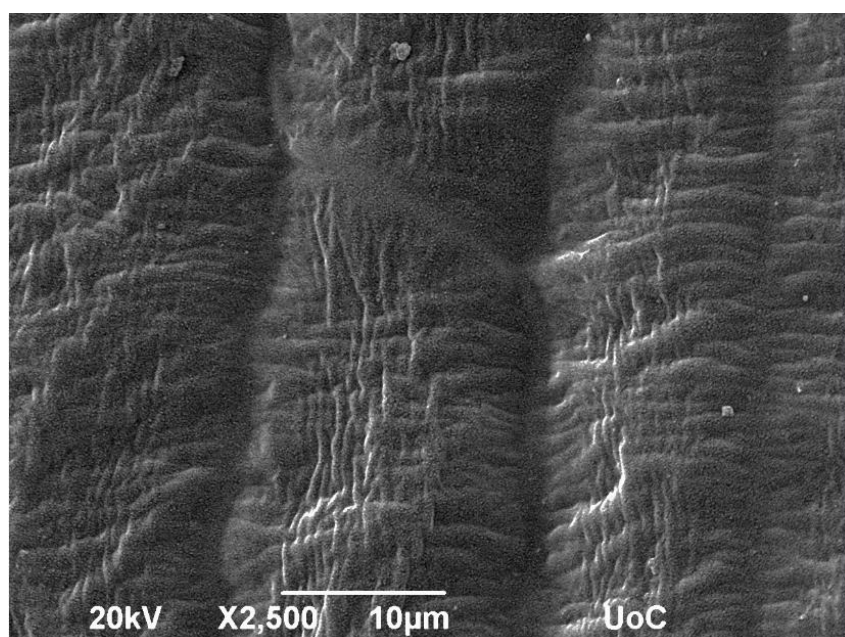
Στην εικόνα 3.33 διακρίνεται το επίμηκες σχήμα των κυττάρων και στα κύτταρα αριστερά φαίνεται έντονα το οδοντωτό πλευρικό κράσπεδο των κυττάρων. Στα συγκεκριμένα κύτταρα φαίνεται ανεπτυγμένο επιφανειακό ανάγλυφο. Τα κύτταρα στο μέσο φαίνονται πιο μακρόστενα, χωρίς οδοντωτό κράσπεδο και με πιο υποπλασμένο ανάγλυφο.

Ενδεχομένως αντιστοιχούν σε επιδερμικά κύτταρα που βρίσκονται πάνω από το κεντρικό νεύρο του πετάλου (Εικόνα 3.33).



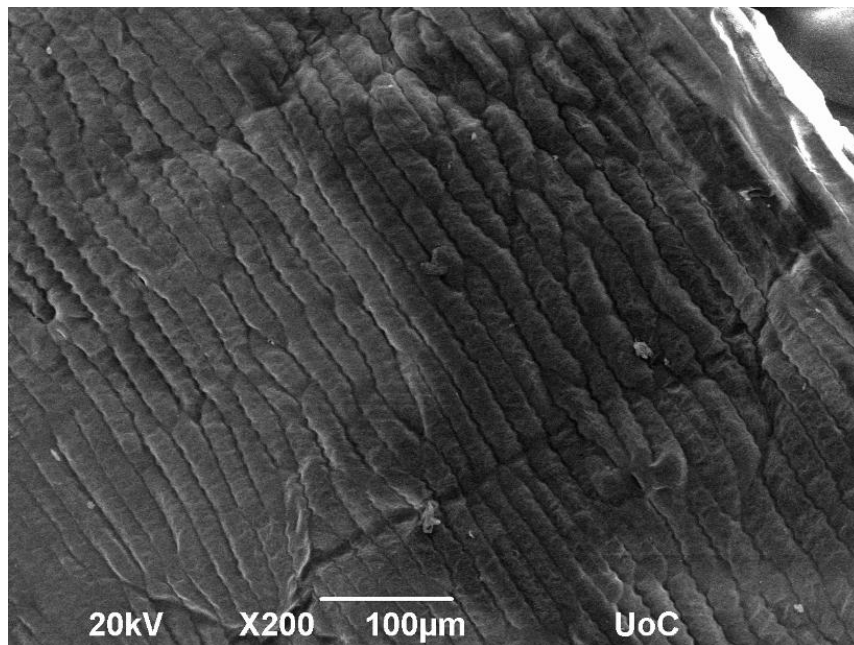
**Εικόνα 3.34:** Ηλεκτρονιογραφία SEM της άνω επιφάνειας από τη μαύρη περιοχή. Ο δείκτης μεγέθυνσης είναι 10 μm.

Η εικόνα 3.34 αποτελεί λεπτομέρεια της εικόνας 3.33 που εστιάζει στη «μεταβατική» ζώνη. Στην εικόνα 3.34 φαίνεται η σταδιακή μετάβαση από το οδοντωτό στο λείο περίγραμμα και η σταδιακή μείωση των κυτταρικών ποικίσεων από αριστερά προς τα δεξιά, όπως και η γενικότερη μεταβολή των διαστάσεων προς πιο επίμηκες σχήμα. Στα κύτταρα προς τα αριστερά το ανάγλυφο φαίνεται εντονότερο και ακανόνιστο και ειδικά προς το κέντρο των κυττάρων. Αντιθέτως, στα κύτταρα προς τα δεξιά το ανάγλυφο φαίνεται πιο ήπιο και κυριαρχούν ποικίσεις στην εγκάρσια διεύθυνση του κυττάρου (Εικόνα 3.34).



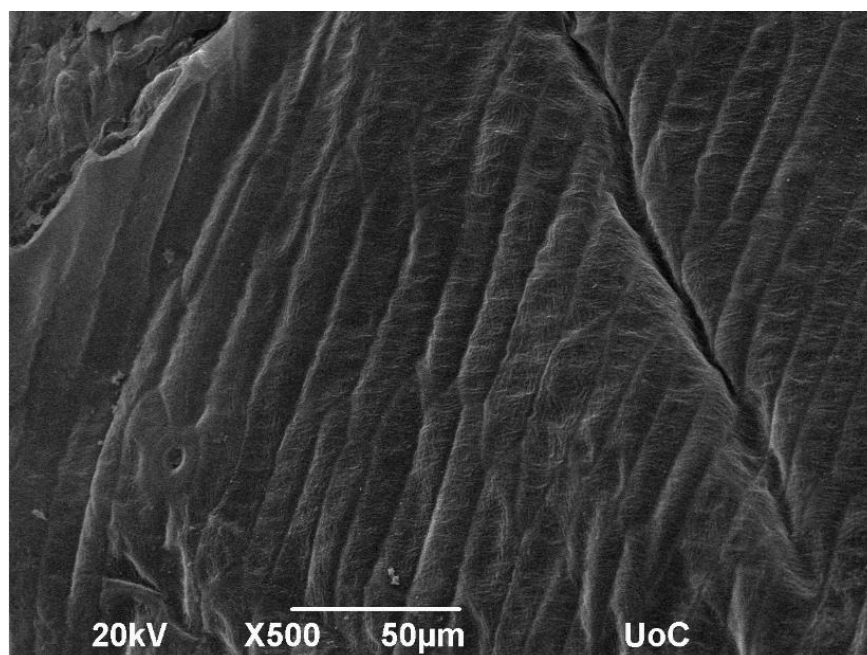
**Εικόνα 3.35:** Ηλεκτρονιογραφία SEM της άνω επιφάνειας από τη μαύρη περιοχή. Ο δείκτης μεγέθυνσης είναι 10  $\mu\text{m}$ .

Η εικόνα 3.35 αποτελεί λεπτομέρεια της εικόνας 3.35 που εστιάζει στην περιοχή με το έντονο ανάγλυφο των κυττάρων. Διακρίνονται οι αρμοί μεταξύ των κυττάρων (Εικόνα 3.35). Διακρίνεται το έντονο ανάγλυφο, το οποίο φαίνεται ακανόνιστο. Τα μικρά σωματίδια ενδεχομένως είναι σωματίδια κηρών που έχουν αποκολληθεί (Εικόνα 3.35).



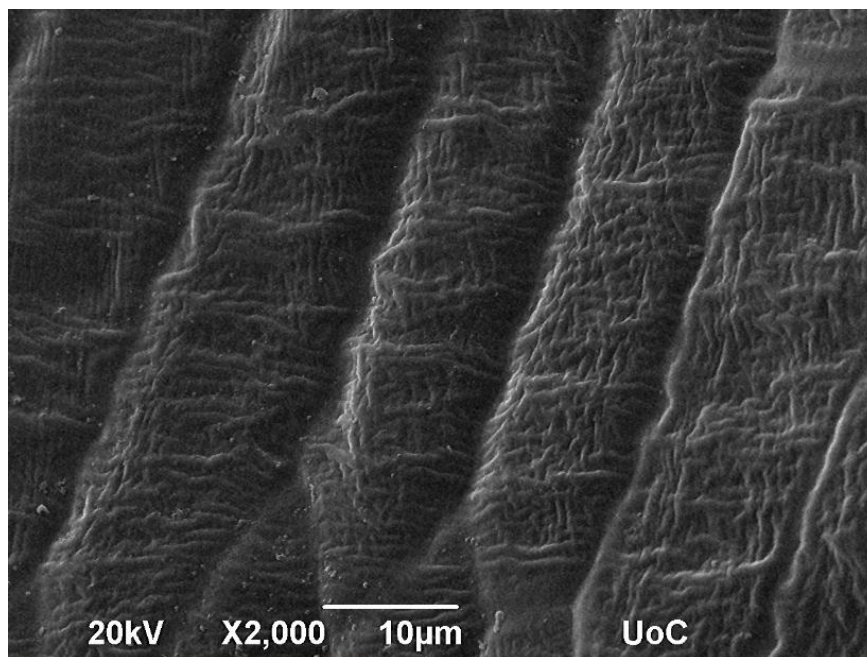
**Εικόνα 3.36:** Ηλεκτρονιογραφία SEM της άνω επιφάνειας από τη μαύρη περιοχή. Ο δείκτης μεγέθυνσης είναι 100  $\mu\text{m}$ .

Η εικόνα 3.36 Γενική άποψη της άνω επιφάνειας της μαύρης περιοχής, όπου επικρατούν τα κύτταρα με οδοντωτό κράσπεδο.



**Εικόνα 3.37:** Ηλεκτρονιογραφία SEM της άνω επιφάνειας από τη μαύρη περιοχή. Ο δείκτης μεγέθυνσης είναι 50  $\mu\text{m}$ .

Στην περιοχή που εικονίζεται στην εικόνα 3.37 διακρίνεται ανάγλυφο, αλλά όχι ιδιαίτερα έντονο. Τα κύτταρα δεν φαίνεται να έχουν οδοντωτό περιθώριο. Ο όγκος των κυττάρων έχει ελαττωθεί ή μεταβληθεί κατά τη διαδικασία αφυδάτωσης και το κυτταρικό τοίχωμα εμφανίζεται κάπως κοίλο. Κάτω αριστερά (Εικόνα 3.37) διακρίνεται ένα ανοιχτό στόμα με χαρακτηριστικά καταφρακτικά κύτταρα.

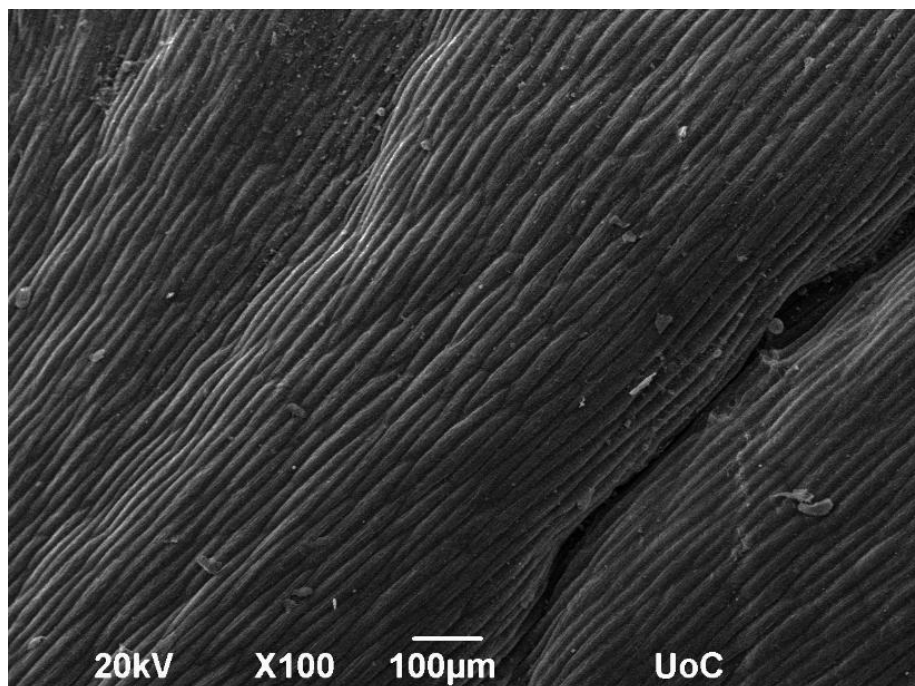


**Εικόνα 3.38:** Ηλεκτρονιογραφία SEM της άνω επιφάνειας από τη μαύρη περιοχή. Ο δείκτης μεγέθυνσης είναι 10  $\mu\text{m}$ .

Η εικόνα 3.38 αποτελεί λεπτομέρεια της εικόνας 3.37. Τα κύτταρα (Εικόνα 3.38) δεν εμφανίζουν οδοντωτό περιθώριο και ορισμένα εμφανίζονται ελαφρώς κοίλα, ίσως λόγω προβλήματος κατά τη διαδικασία αφυδάτωσης. Διακρίνεται με μεγαλύτερη λεπτομέρεια το μικρο-ανάγλυφο. Σε πολλά κύτταρα παρατηρούνται εντονότερες ποικίλσεις στον εγκάρσιο άξονα. Αυτές προεξέχουν, βρίσκονται πάνω από τις υπόλοιπες ακανόνιστες ποικίλσεις και φαίνεται να επαναλαμβάνονται ανά περίπου 8-10  $\mu\text{m}$  (Εικόνα 3.38).

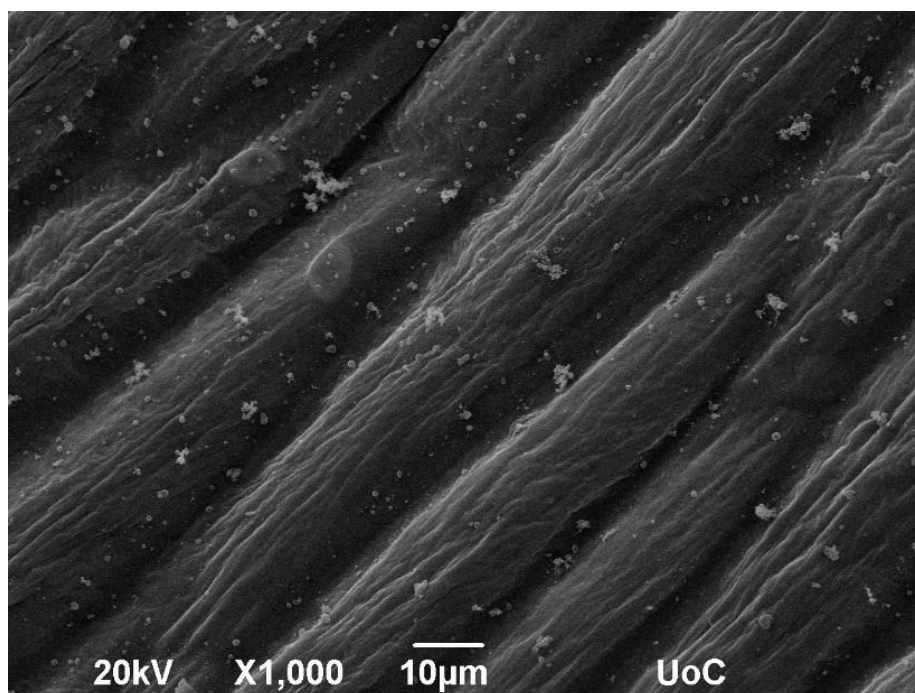
Μαύρη περιοχή – κάτω επιφάνεια





*Εικόνα 3.39: Ηλεκτρονιογραφία SEM της κάτω επιφάνειας από τη μαύρη περιοχή. Ο δείκτης μεγέθυνσης είναι 100  $\mu\text{m}$ .*

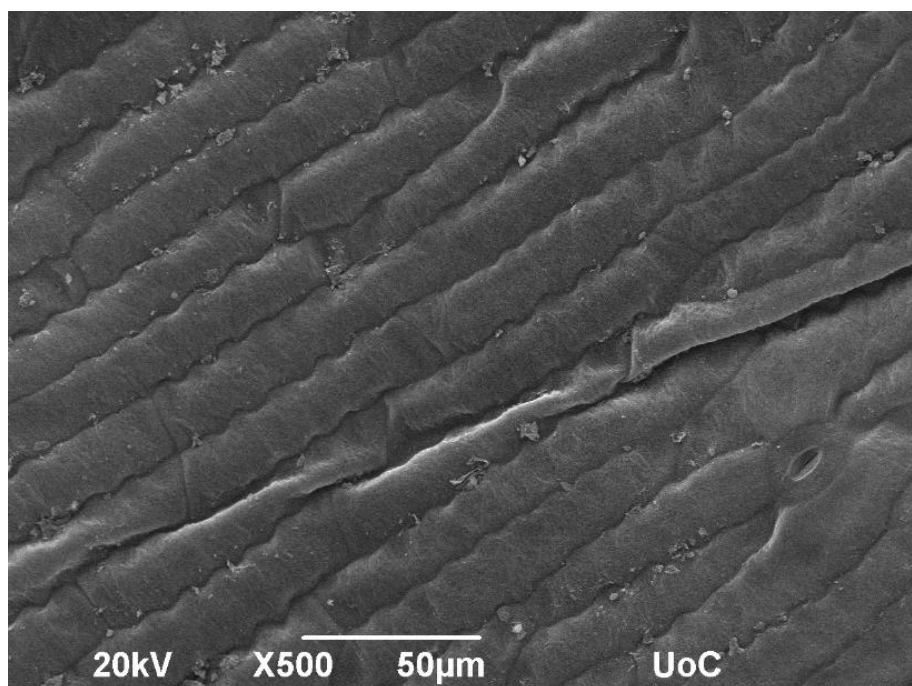
Η εικόνα 3.39 αποτελεί γενική άποψη της κάτω επιφάνειας της μαύρης περιοχής στην οποία εικονίζονται επιμήκη ατρακτοειδή κύτταρα.



*Εικόνα 3.40: Ηλεκτρονιογραφία SEM της κάτω επιφάνειας από τη μαύρη περιοχή. Ο δείκτης μεγέθυνσης είναι 10  $\mu\text{m}$ .*

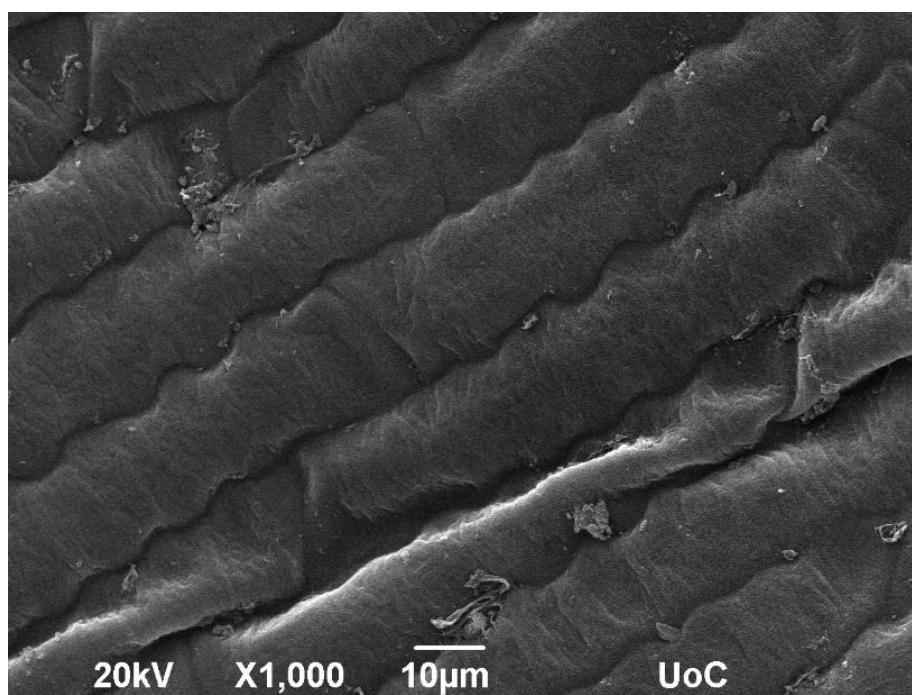
Η εικόνα 3.40 αποτελεί λεπτομέρεια της εικόνας 3.39. Στην εικόνα 3.40 τα κύτταρα εικονίζονται συρρικνωμένα και οι ποικίλλσεις έχουν καταστραφεί. Αυτό υποδηλώνεται και

από τα πολλά μικρά σωματίδια αποκολλημένων κηρών (Εικόνα 3.40). Ωστόσο σε δύο κύτταρα εντοπίζονται δύο παράξενες κυκλικές δομές ελαφρά πιο αραιές ηλεκτρονικά, οι οποίες εντοπίζονται στο άκρο του κυττάρου (Εικόνα 3.40).



*Εικόνα 3.41: Ηλεκτρονιογραφία SEM της κάτω επιφάνειας από τη μαύρη περιοχή. Ο δείκτης μεγέθυνσης είναι 50 µm.*

Στην εικόνα 3.41 εικονίζεται περιοχή με κύτταρα με οδοντωτό κράσπεδο. Οι ποικίλσεις έχουν αλλοιωθεί σε σημαντικό βαθμό, όπως υποδηλώνεται από τα μικρά σωματίδια αποκολλημένων κηρών. Κάτω δεξιά (Εικόνα 3.41) φαίνεται ένα ανοιχτό στόμα με χαρακτηριστικά καταφρακτικά κύτταρα.

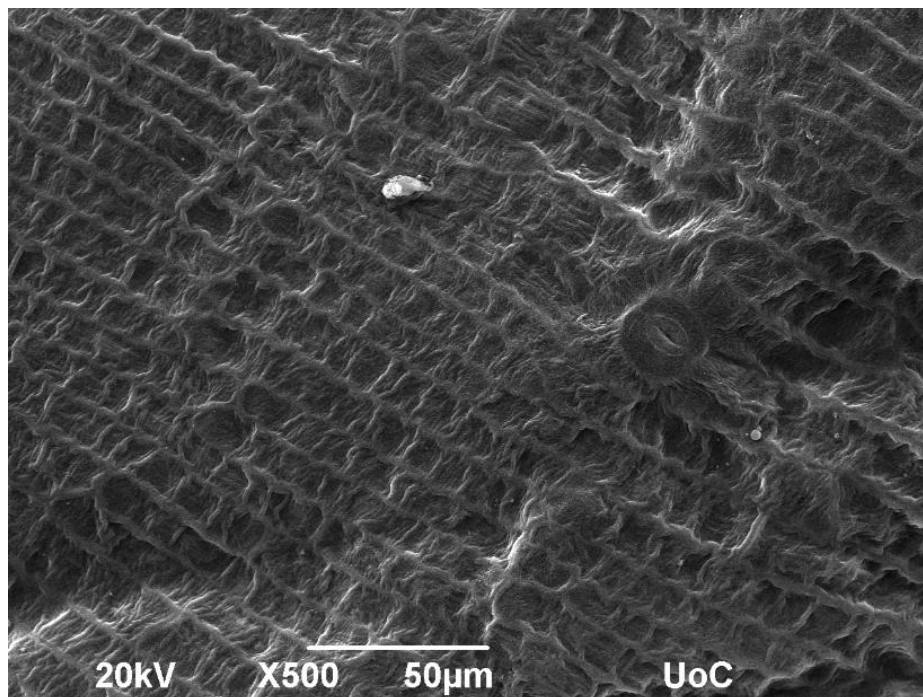




**Εικόνα 3.42:** Ηλεκτρονιογραφία SEM της κάτω επιφάνειας από τη μαύρη περιοχή. Ο δείκτης μεγέθυνσης είναι 10  $\mu\text{m}$ .

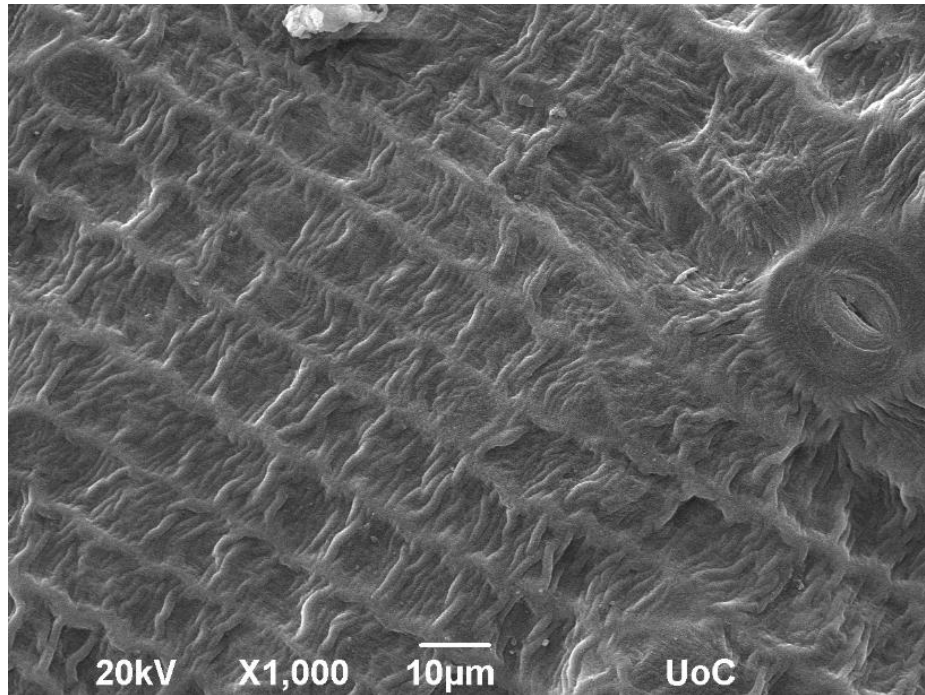
Η εικόνα 3.42 αποτελεί λεπτομέρεια της εικόνας 3.41. Στην εικόνα 3.42 οι ποικίλλσεις δεν είναι ορατές και ο κυτταρικός όγκος έχει παραμείνει αναλλοίωτος.

Κόκκινη περιοχή – άνω επιφάνεια



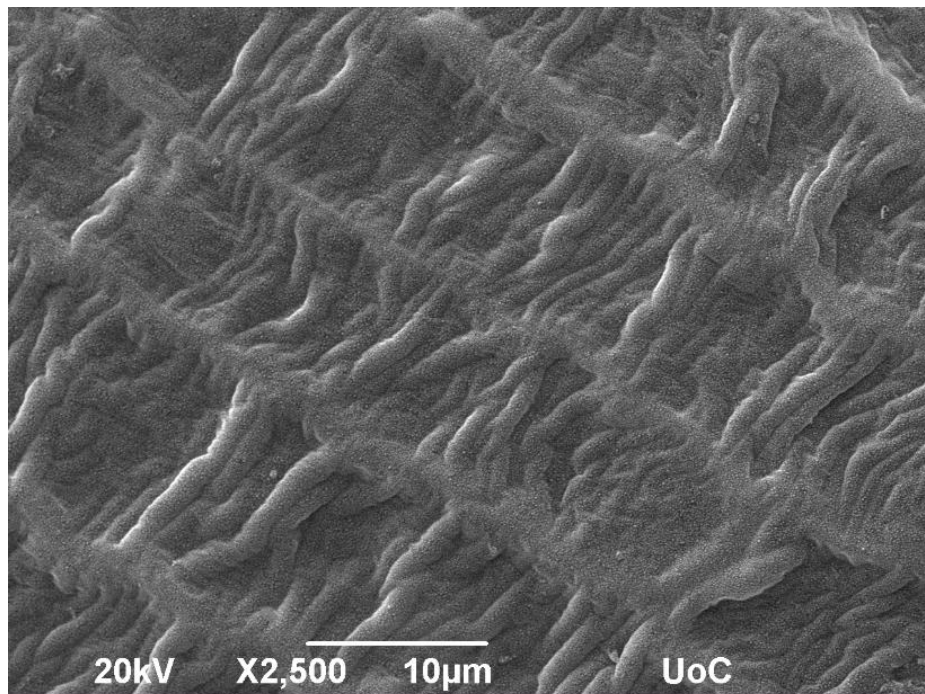
**3.43:** Ηλεκτρονιογραφία SEM της άνω επιφάνειας από την κόκκινη περιοχή. Ο δείκτης μεγέθυνσης είναι 50  $\mu\text{m}$ .

Στην εικόνα 3.43 φαίνεται μια γενική άποψη της άνω επιφάνειας της κόκκινης περιοχής. Είναι εμφανές ότι έχει υπάρξει πολύ αναποτελεσματική η διαδικασία της αφυδάτωσης και τα κύτταρα φαίνονται πολύ έντονα κοίλα, με το εξωτερικό κυτταρικό τοίχωμα να έχει βυθιστεί προς τα μέσα (Εικόνα 3.43). Ωστόσο η συγκεκριμένη περιοχή (Εικόνα 3.43) επιλέχθηκε γιατί φαίνονται με καλή λεπτομέρεια οι εφυμενδιακές ποικίλλσεις. Φαίνεται ένα κλειστό στόμα με χαρακτηριστικά καταφρακτικά κύτταρα, και χαρακτηριστικές τοιχωματικές παχύνσεις στην περιοχή του πόρου.



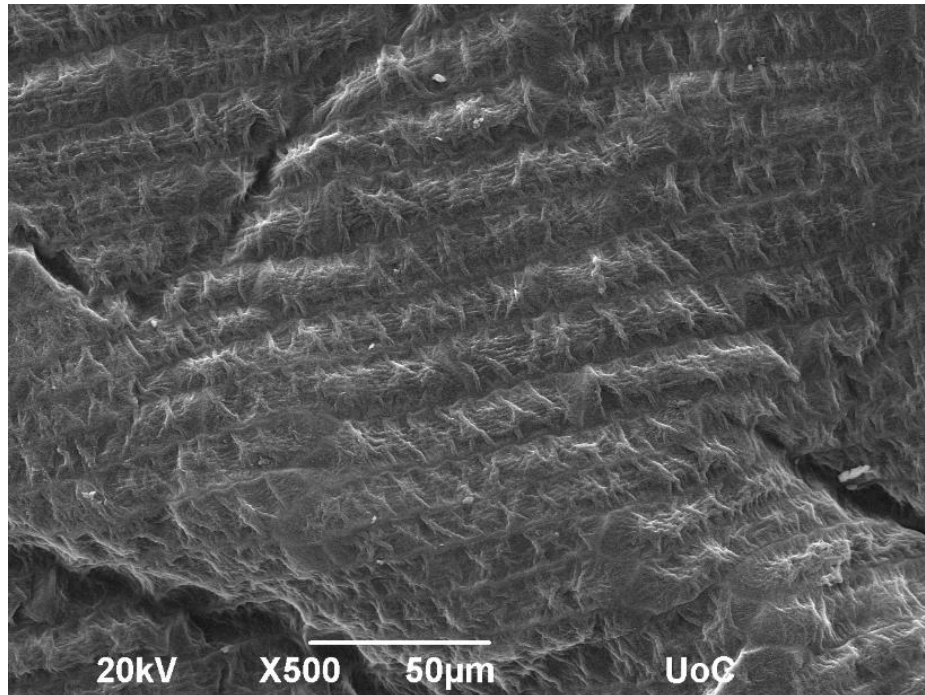
**3.44:** Ηλεκτρονιογραφία SEM της άνω επιφάνειας από την κόκκινη περιοχή. Ο δείκτης μεγέθυνσης είναι 10 µm.

Η εικόνα 3.44 αποτελεί λεπτομέρεια της εικόνας 3.43. Η κυτταρική συρρίκνωση είναι εμφανής (Εικόνα 3.44). Φαίνεται και πάλι το στόμα. Οι ποικίλλσεις της εφυμενίδας είναι έντονες και κυριαρχούν στην εγκάρσια διεύθυνση (Εικόνα 3.44).



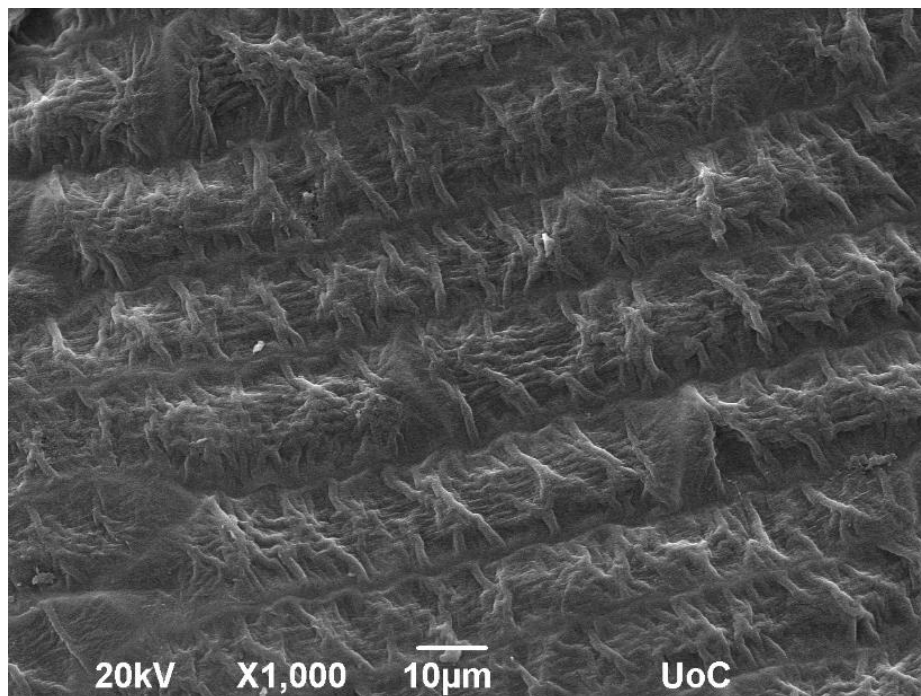
**Εικόνα 3.45:** Ηλεκτρονιογραφία SEM της άνω επιφάνειας από την κόκκινη περιοχή. Ο δείκτης μεγέθυνσης είναι 10 µm.

Η εικόνα 3.45 αποτελεί λεπτομέρεια της εικόνας 3.44. Στην εικόνα 3.45 φαίνεται εξαιρετικά η μορφή των ποικίσεων οι οποίες φαίνονται παράλληλες ως προς τον εγκάρσιο άξονα των κυττάρων.



*Εικόνα 3.46: Ηλεκτρονιογραφία SEM της άνω επιφάνειας από την κόκκινη περιοχή. Ο δείκτης μεγέθυνσης είναι 50 µm.*

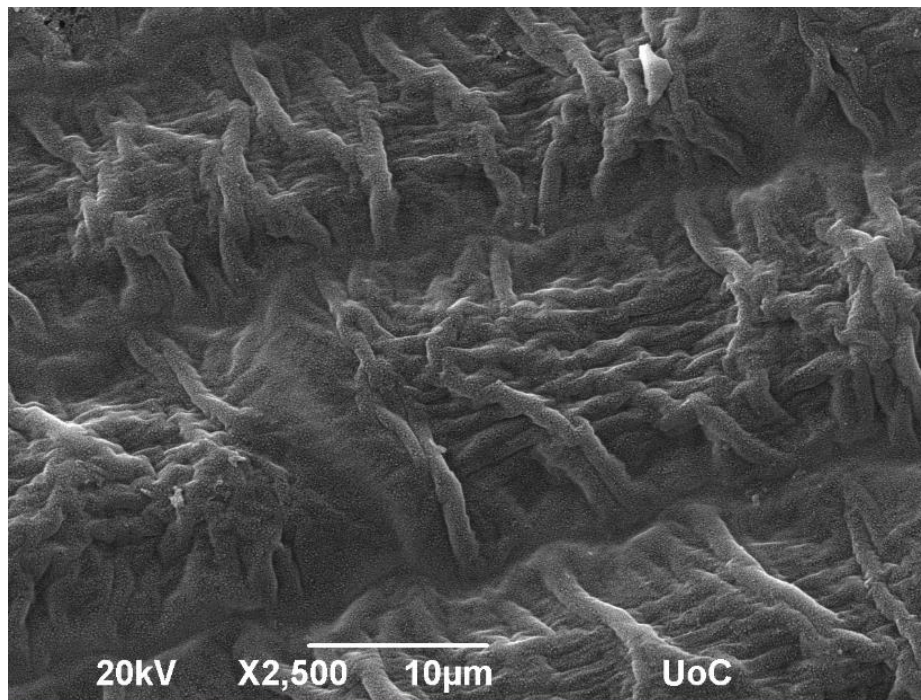
Η εικόνα 3.46 αποτελεί γενική άποψη της περιοχής στην οποία εντοπίστηκε το καλύτερα διατηρημένο ανάγλυφο. Φαίνεται η εντονότατη ανάπτυξη των ποικίσεων.





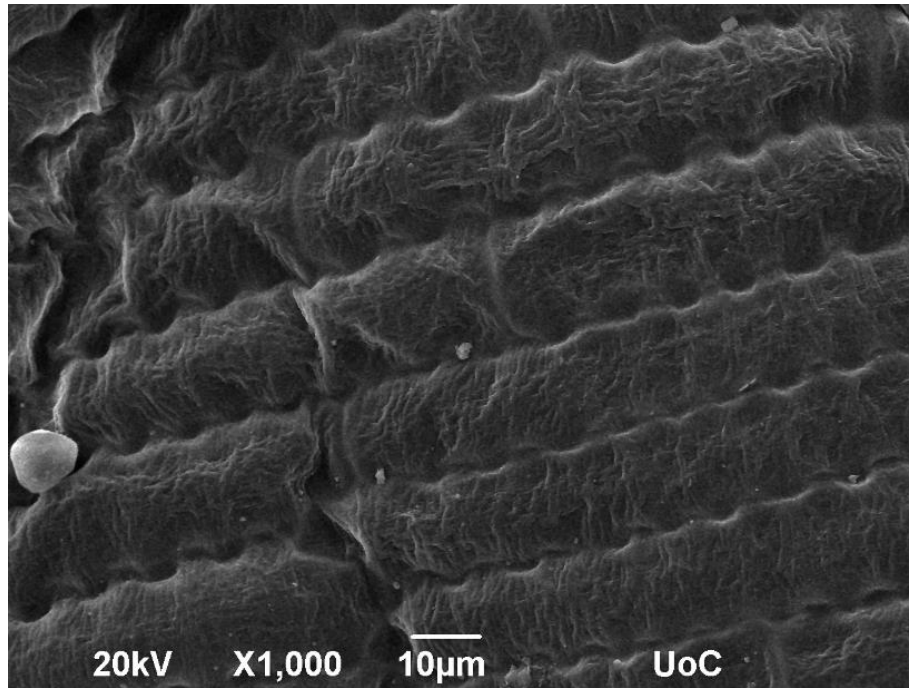
**Εικόνα 3.47:** Ηλεκτρονιογραφία SEM της άνω επιφάνειας από την κόκκινη περιοχή. Ο δείκτης μεγέθυνσης είναι 10  $\mu\text{m}$ .

Η εικόνα 3.47 αποτελεί λεπτομέρεια της εικόνας 3.46. Διακρίνεται το κυματοειδές περιθώριο των κυττάρων (Εικόνα 3.47). Επιπλέον, διακρίνεται με εξαιρετική λεπτομέρεια η μορφολογία των ποικίσεων (Εικόνα 3.47).



**Εικόνα 3.48:** Ηλεκτρονιογραφία SEM της άνω επιφάνειας από την κόκκινη περιοχή. Ο δείκτης μεγέθυνσης είναι 10  $\mu\text{m}$ .

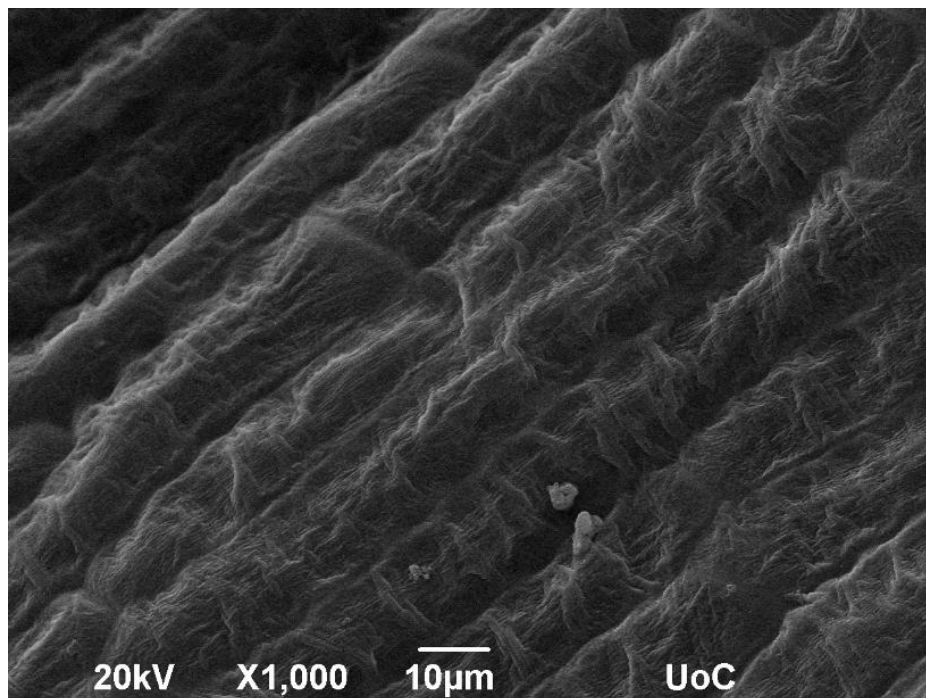
Η εικόνα 3.48 αποτελεί λεπτομέρεια της εικόνας 3.47. Είναι εμφανές ότι στην εικόνα 3.48 οι ποικίσεις αποτελούνται από δύο συνιστώσες. Αποτελούνται αφ' ενός από πυκνές διαμήκεις ποικίσεις που βρίσκονται πιο εσωτερικά, δηλαδή πιο κοντά στο κυτταρικό τοίχωμα. Αφ' ετέρου, αυτές υπερκαλύπτονται από πιο αραιές και μεμονωμένες εγκάρσιες ποικίσεις, οι οποίες βρίσκονται εξωτερικά που φτάνουν από το ένα άκρο του κυττάρου ως το άλλο. Και τα δύο είδη ποικίσεων αποτελούνται από νηματοειδή στοιχεία, τα οποία έχουν παρόμοια διάμετρο και στις δύο κατηγορίες ποικίσεων. Οι εγκάρσιες ποικίσεις εμφανίζουν μια χαλαρή περιοδικότητα εμφάνισης, η οποία κυμαίνεται περίπου ανά 6-10  $\mu\text{m}$  (Εικόνα 3.48).



**Εικόνα 3.49:** Ηλεκτρονιογραφία SEM της άνω επιφάνειας από την κόκκινη περιοχή. Ο δείκτης μεγέθυνσης είναι 10 µm.

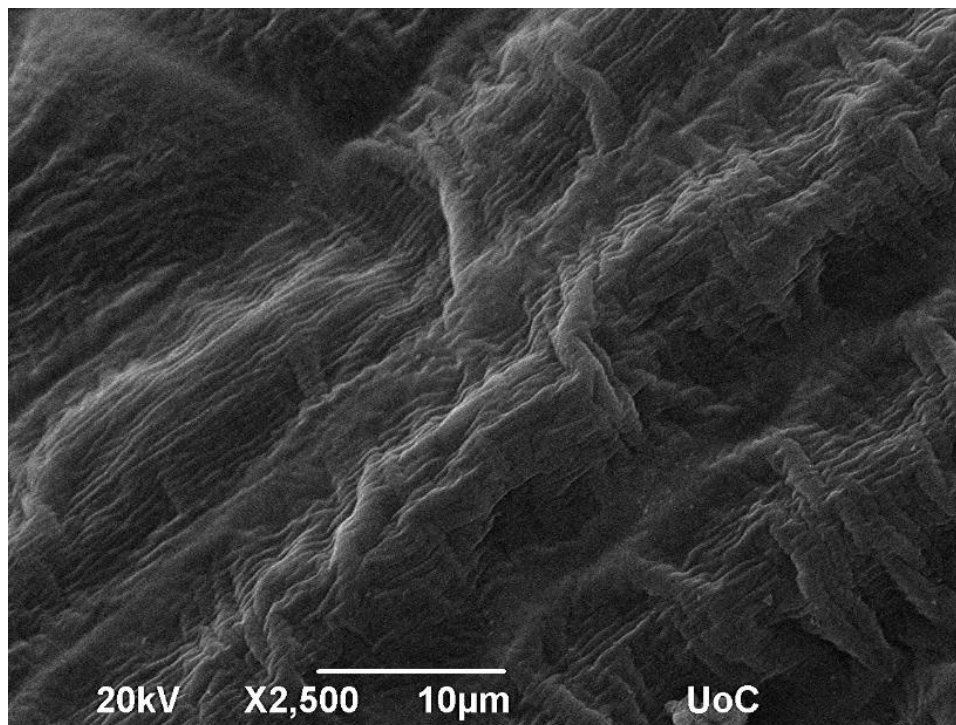
Στην εικόνα 3.49 διακρίνεται το κυματοειδές περιθώριο των κυττάρων, αν και το ανάγλυφο δεν φαίνεται πολύ καλά διατηρημένο. Ακόμα και έτσι διακρίνεται κάποια περιοδικότητα των εγκάρσιων ποικίσεων η οποία σε αρκετές περιπτώσεις ταυτίζεται με την περιοδικότητα των «κυμάτων» του πλευρικού κρασπέδου (Εικόνα 3.49).

Κόκκινη περιοχή – κάτω επιφάνεια



**Εικόνα 3.50:** Ηλεκτρονιογραφία SEM της κάτω επιφάνειας από την κόκκινη περιοχή. Ο δείκτης μεγέθυνσης είναι 10  $\mu\text{m}$ .

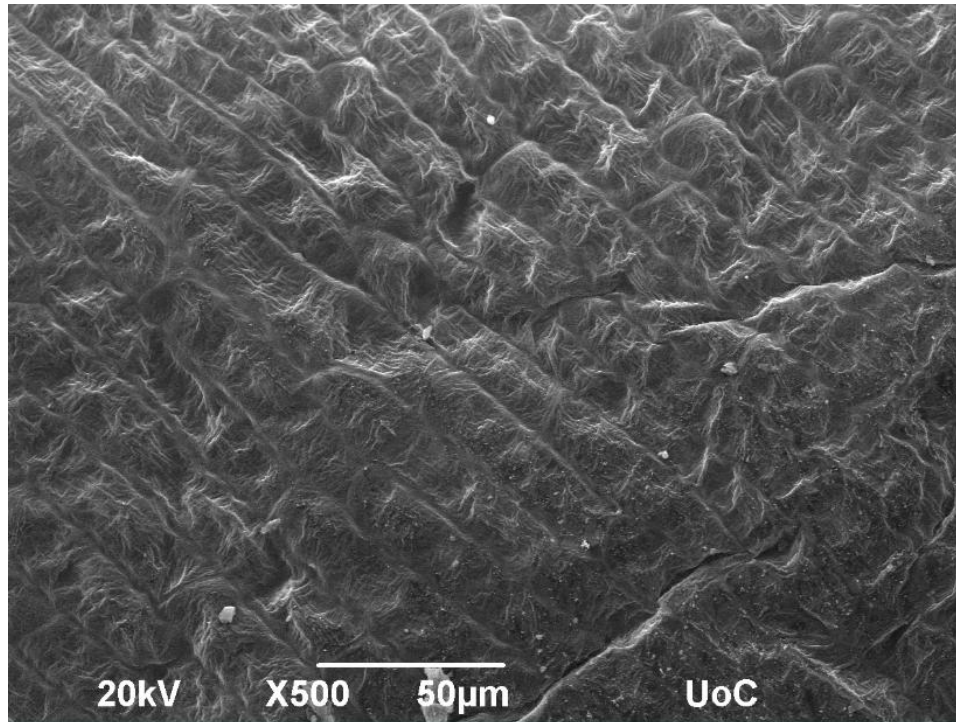
Στην εικόνα 3.50 διακρίνονται οι έντονες ποικίλσεις της περιοχής. Οι εγκάρσιες ποικίλσεις που προεξέχουν εμφανίζονται με κάποια χαλαρή περιοδικότητα. Οι υποκείμενες διαμήκεις ποικίλσεις φαίνεται να είναι περισσότερο συγκεντρωμένες προς το κέντρο κάθε κυττάρου (Εικόνα 3.50).



**Εικόνα 3.51:** Ηλεκτρονιογραφία SEM της κάτω επιφάνειας από την κόκκινη περιοχή. Ο δείκτης μεγέθυνσης είναι 10  $\mu\text{m}$ .

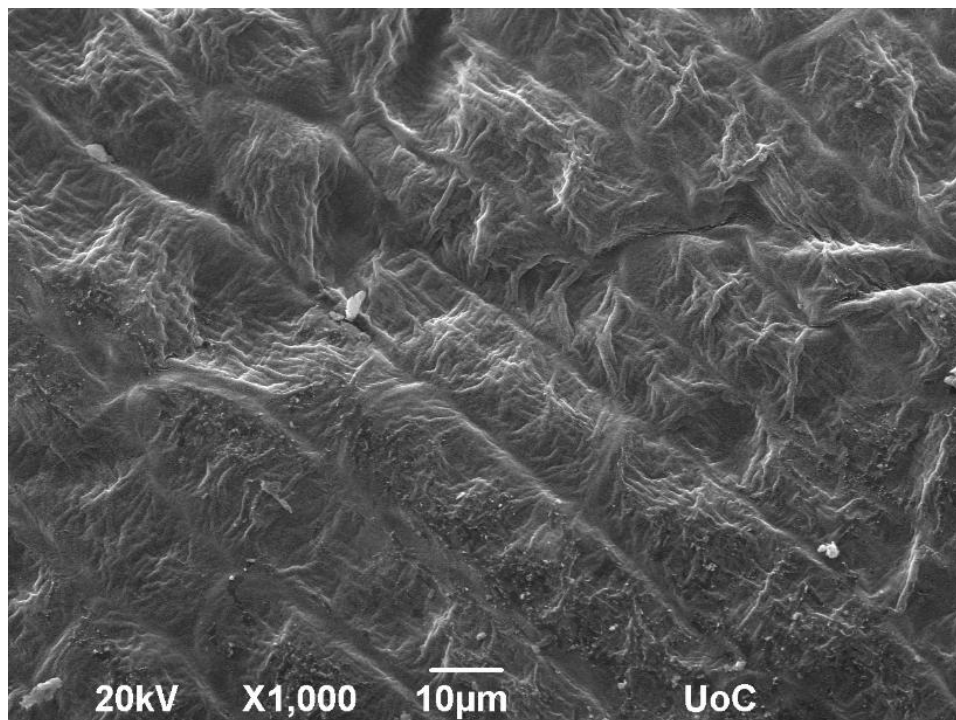
Η εικόνα 3.51 αποτελεί λεπτομέρεια της εικόνας 3.50. Στην εικόνα 3.51 διακρίνονται εγκάρσιες και διαμήκεις ποικίλσεις καθώς και κάποιες με πιο ακανόνιστη διεύθυνση. Επιπλέον διακρίνεται κάτι πολύ ενδιαφέρον που δεν έχει φανεί στις άλλες ηλεκτρονιογραφίες. Διακρίνονται εξαιρετικά λεπτοφυείς διαμήκεις ποικίλσεις (Εικόνα 3.51) οι οποίες βρίσκονται πάνω από τις μεγάλες διαμήκεις, ενδεχομένως και από τις μεγάλες εγκάρσιες ποικίλσεις. Εμφανίζουν περιοδική ή ημι-περιοδική δομή της τάξης των nm. Το ενδιαφέρον προκύπτει γιατί οι διαστάσεις και οι περιοδικότητα αυτών των ποικίσεων ανήκουν σε εύρος του φάσματος (σε μήκη κύματος) του ορατού φωτός, ή έστω είναι συγκρίσιμης τάξης μεγέθους με αυτό.





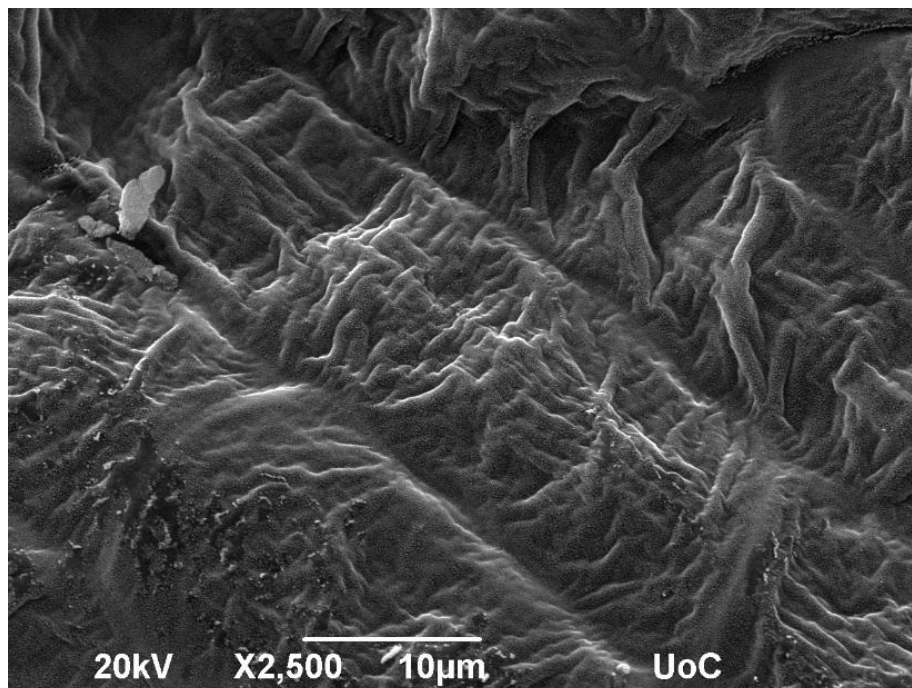
**Εικόνα 3.52:** Ηλεκτρονιογραφία SEM της κάτω επιφάνειας από την κόκκινη περιοχή. Ο δείκτης μεγέθυνσης είναι 50 µm.

Στην εικόνα 3.52 φαίνεται περιοχή με έντονο ανάγλυφο ποικίσεων. Κάποια κύτταρα (προς τα δεξιά) φαίνονται ελαφρώς κοίλα λόγω προβλημάτων κατά την αφυδάτωση του ιστού (Εικόνα 3.52).



**Εικόνα 3.53:** Ηλεκτρονιογραφία SEM της κάτω επιφάνειας από την κόκκινη περιοχή. Ο δείκτης μεγέθυνσης είναι 10 µm.

Η εικόνα 3.53 αποτελεί λεπτομέρεια της εικόνας 3.52. Στην εικόνα 3.53 ιακρίνεται το έντονο ανάγλυφο.



**Εικόνα 3.54:** Ηλεκτρονιογραφία SEM της κάτω επιφάνειας από την κόκκινη περιοχή. Ο δείκτης μεγέθυνσης είναι 10 µm.

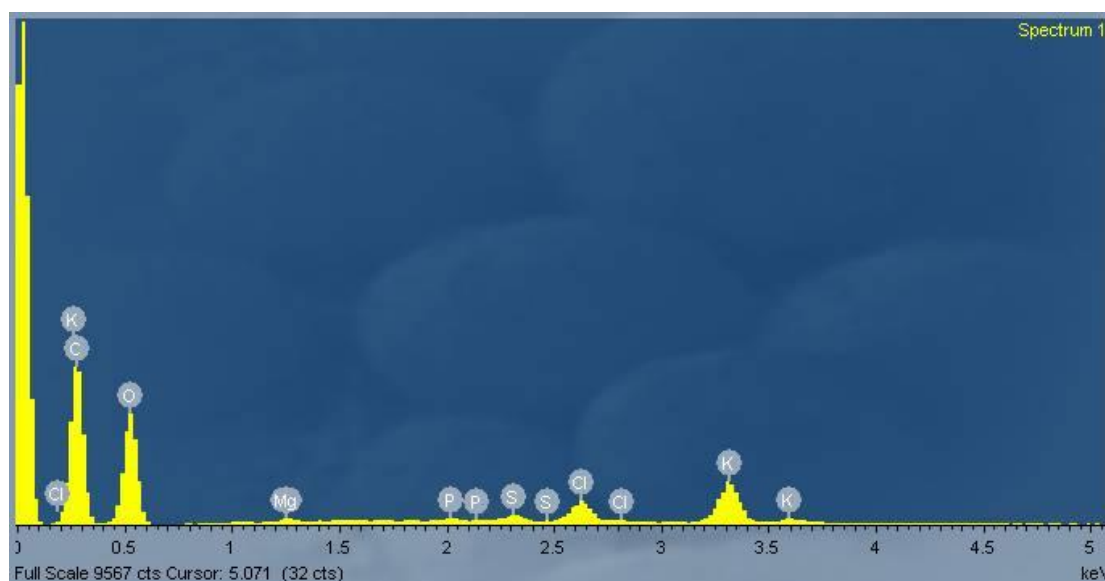
Η εικόνα 3.54 αποτελεί λεπτομέρεια της εικόνας 3.53. Το ανάγλυφο (Εικόνα 3.54) φαίνεται να αποτελείται από μια σειρά από υποκείμενες διαμήκεις ποικίλλσεις στο κέντρο του κυττάρου, και από υπερκείμενες εγκάρσιες ποικίλλσεις κατά διαστήματα. Το αποτέλεσμα είναι να δημιουργούνται περισσότερο συσσωματώματα από ποικίλλσεις οδηγώντας σε τοπικά ανομοιογενή τοπογραφία της κυτταρικής επιφάνειας. Όλο αυτό οδηγεί σε μια εικόνα με σχετικά ακανόνιστη διάταξη των ποικίλλσεων (Εικόνα 3.54).

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα έχουν δείξει τη γενική ύπαρξη ενός έντονου ανάγλυφου με ποικίλλσεις. Αυτό μπορεί να έχει περισσότερο κανονική ή περισσότερο ακανόνιστη όψη, και φαίνεται να προκύπτει από τη συνύπαρξη πυκνών –κυρίως προς το κέντρο του κυττάρου – υποκείμενων ποικίλλσεων στον επιμήκη άξονα, και πιο αραιών υπερκείμενων ποικίλλσεων στον εγκάρσιο άξονα σε κάποια περιοδικότητα. Κάποιες εικόνες έδειξαν στοιχεία για ύπαρξη εξαιρετικά λεπτοφυών ποικίλλσεων με κανονική ή ημι-κανονική όψη στον επιμήκη άξονα (Εικόνα 3.51), ύπαρξη περιέργων κυκλικών δομών στα άκρα κάποιων κυττάρων (Εικόνα 3,40), και έντονη διαφοροποίηση μεταξύ διπλανών κυττάρων στη μορφολογία και τις ποικίλλσεις (Εικόνα 3.34), ίσως πιθανή ένδειξη για υποκείμενο νεύρο. Δύο παράγοντες που δυσκόλεψαν την παρατήρηση ήταν η αλλοίωση των κηρών και η συρρίκνωση των κυττάρων που συνέβησαν κατά περιοχές. Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις δεν εξάγεται κάποια σαφής διαφορά ανάμεσα στην άνω και την κάτω επιφάνεια του πετάλου. Σχετικά με τη σύγκριση των δύο περιοχών, η κόκκινη περιοχή φαίνεται να έχει πιο έντονες ή/και καλοσηματισμένες ποικίλλσεις σε σύγκριση με τη μαύρη.

### 3.5 Στοιχειακή ανάλυση με SEM-EDX

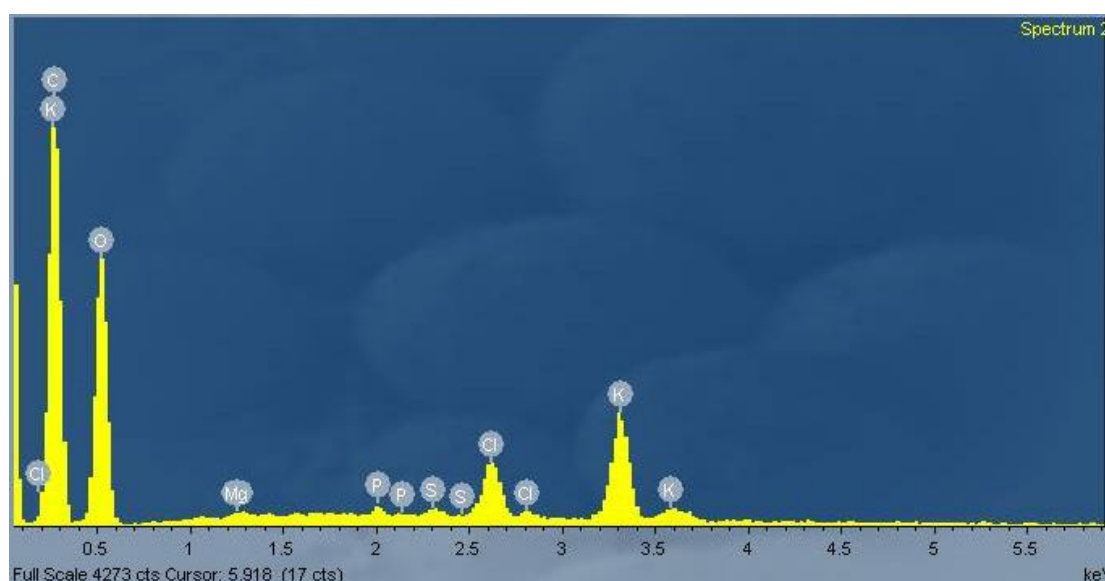
Τα δείγματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο EDX σε SEM στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας «Βασίλης Γαλανόπουλος» του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, όπως παρουσιάζεται στο σχετικό τμήμα της εργασίας. Λήφθηκαν τρεις μετρήσεις για την κόκκινη περιοχή (Εικόνες 3.55 έως 3.57) και τέσσερις για την μαύρη περιοχή (Εικόνες 3.58 έως 3.61). Ακολουθούν τα φάσματα ακτίνων Χ για τις μετρήσεις. Στον οριζόντιο άξονα παριστάνεται η ενέργεια των φωτονίων και στον κατακόρυφο η ένταση του σήματος. Σημειώνεται ότι η κλίμακα του οριζόντιου και του κατακόρυφου άξονα δεν είναι η ίδια σε όλες τις μετρήσεις.

Κόκκινη περιοχή (1<sup>η</sup> μέτρηση):



**Εικόνα 3.55:** Φάσμα ακτίνων Χ για την κόκκινη περιοχή του πετάλου. Εντοπίζονται τα στοιχεία άνθρακας (C), οξυγόνο (O), φώσφορος (P), θείο (S), κάλιο (K), χλώριο (Cl) και μαγνήσιο (Mg).

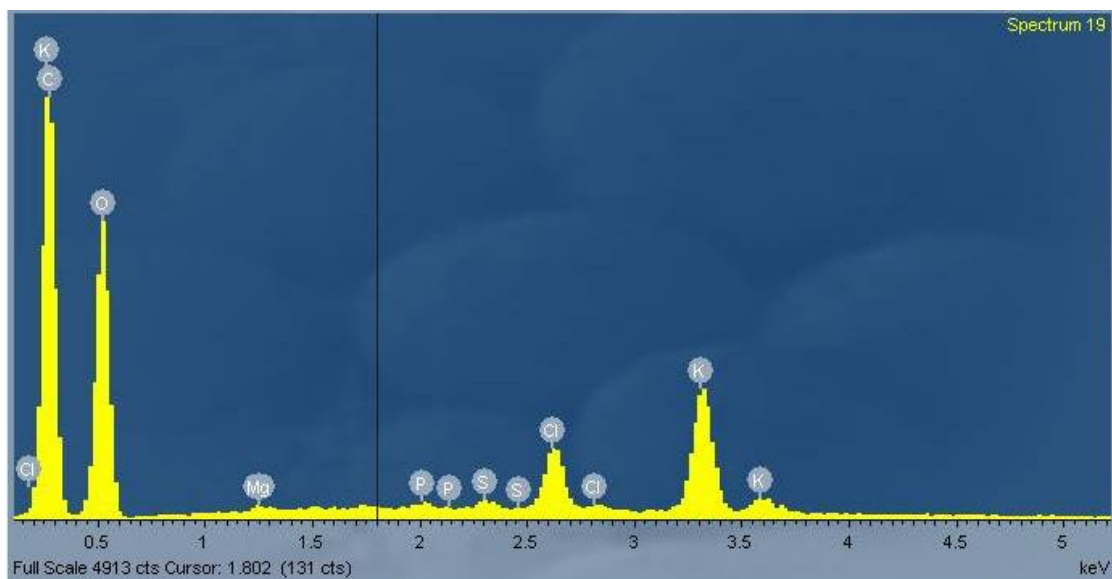
Κόκκινη περιοχή (2<sup>η</sup> μέτρηση):





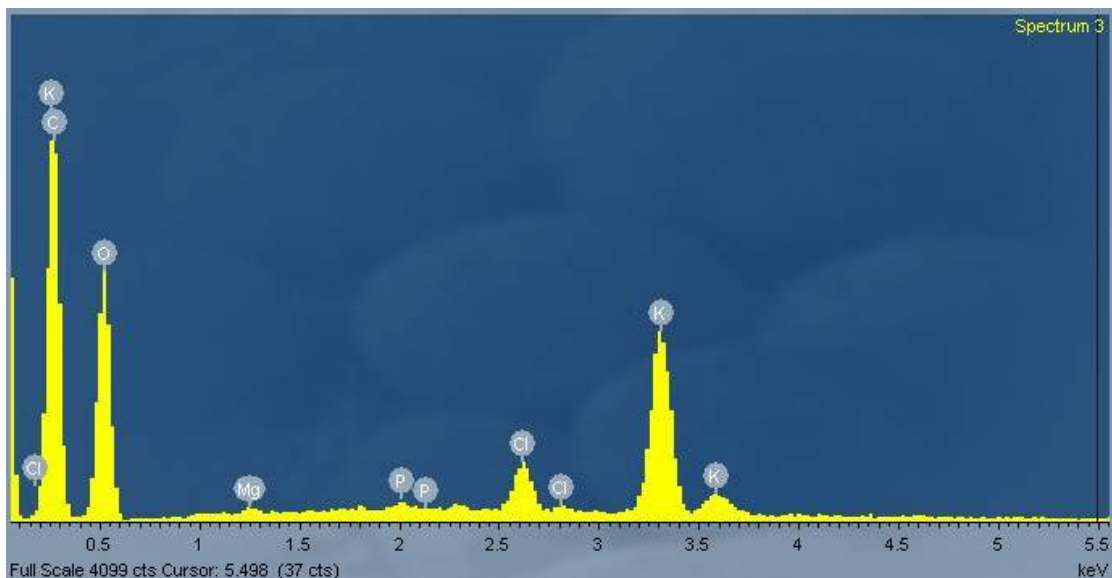
**Εικόνα 3.56: Φάσμα ακτίνων X για την κόκκινη περιοχή του πετάλου.** Εντοπίζονται τα στοιχεία άνθρακας (C), οξυγόνο (O), φώσφορος (P), θείο (S), κάλιο (K), χλώριο (Cl) και μαγνήσιο (Mg).

Κόκκινη περιοχή (3<sup>η</sup> μέτρηση):



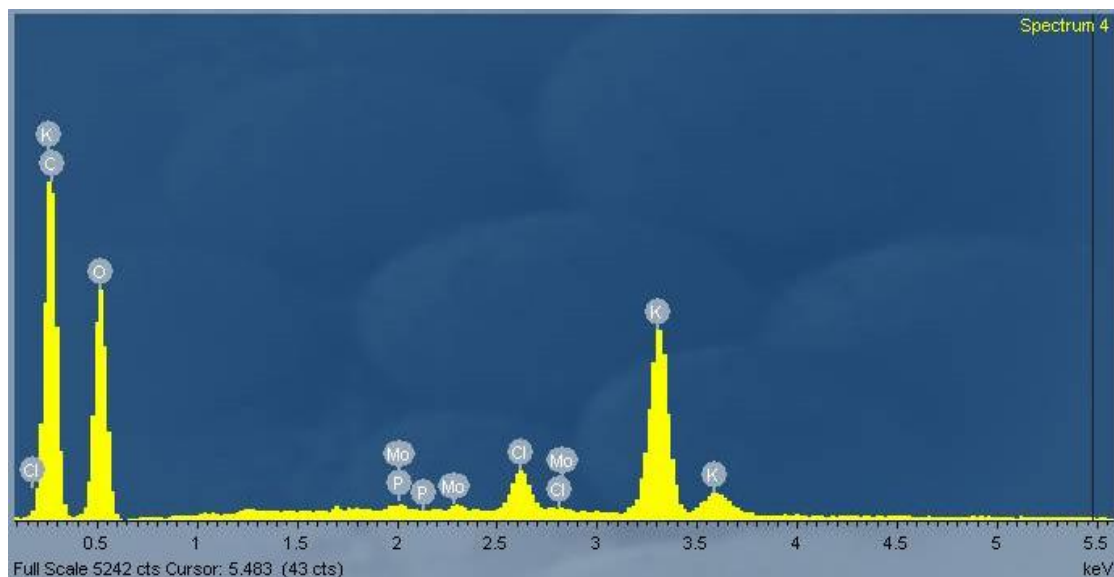
**Εικόνα 3.57: Φάσμα ακτίνων X για την κόκκινη περιοχή του πετάλου.** Εντοπίζονται τα στοιχεία άνθρακας (C), οξυγόνο (O), φώσφορος (P), θείο (S), κάλιο (K), χλώριο (Cl) και μαγνήσιο (Mg).

Μαύρη περιοχή (1<sup>η</sup> μέτρηση):



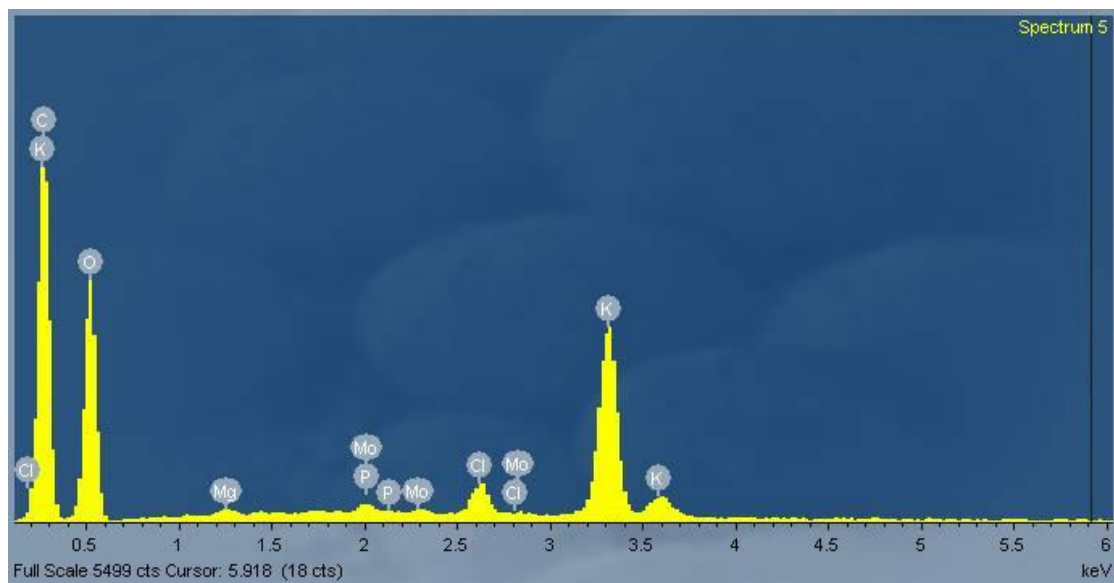
**Εικόνα 3.58: Φάσμα ακτίνων X για τη μαύρη περιοχή του πετάλου.** Εντοπίζονται τα στοιχεία άνθρακας (C), οξυγόνο (O), φώσφορος (P), κάλιο (K), χλώριο (Cl) και μαγνήσιο (Mg).

Μαύρη περιοχή (2<sup>η</sup> μέτρηση):



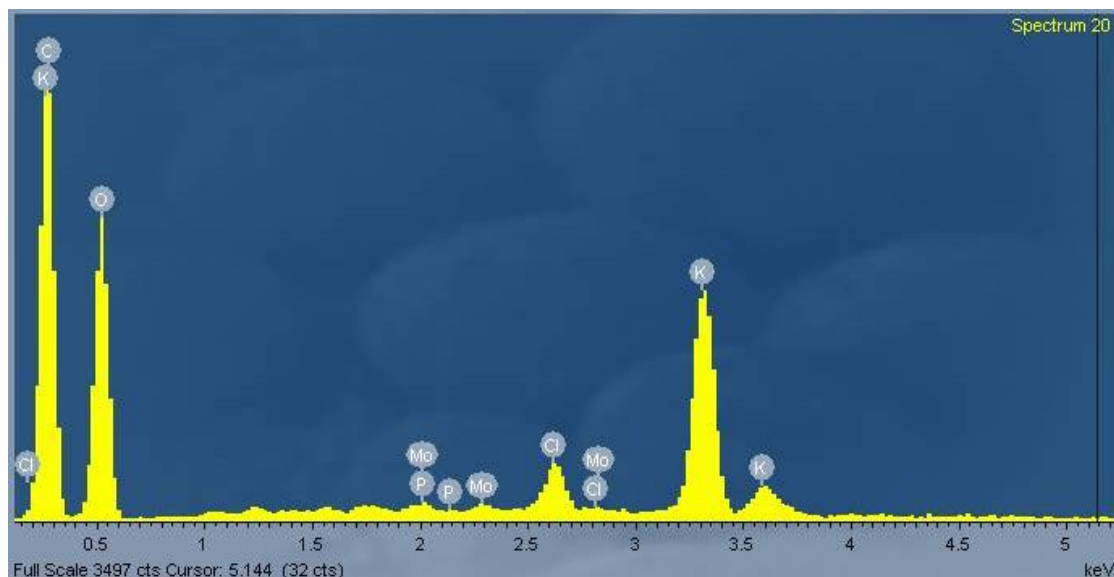
**Εικόνα 3.59:** Φάσμα ακτίνων X για τη μαύρη περιοχή του πετάλου. Εντοπίζονται τα στοιχεία άνθρακας (C), οξυγόνο (O), φώσφορος (P), κάλιο (K), χλώριο (Cl) και μολυβδαίνιο (Mo).

Μαύρη περιοχή (3<sup>η</sup> μέτρηση):



**Εικόνα 3.60:** Φάσμα ακτίνων X για τη μαύρη περιοχή του πετάλου. Εντοπίζονται τα στοιχεία άνθρακας (C), οξυγόνο (O), φώσφορος (P), κάλιο (K), χλώριο (Cl), μαγνήσιο (Mg) και μολυβδαίνιο (Mo).

Μαύρη περιοχή (4<sup>η</sup> μέτρηση):



Εικόνα 3.61: Φάσμα ακτίνων Χ για τη μαύρη περιοχή του πετάλου. Εντοπίζονται τα στοιχεία άνθρακας (C), οξυγόνο (O), φώσφορος (P), κάλιο (K), χλώριο (Cl) και μολυβδαίνιο (Mo).

Οι εκατοστιαίες (%) ατομικές αναλογίες κάθε στοιχείου παρουσιάζονται στους πίνακες 3.2 και 3.3:

**Πίνακας 3.2: Εκατοστιαία (%) ατομική αναλογία**

Ατομικό Στοιχείο	Κόκκινη περιοχή			Μαύρη περιοχή			
	1 <sup>η</sup> μέτρηση	2 <sup>η</sup> μέτρηση	3 <sup>η</sup> μέτρηση	1 <sup>η</sup> μέτρηση	2 <sup>η</sup> μέτρηση	3 <sup>η</sup> μέτρηση	4 <sup>η</sup> μέτρηση
C	56,75	56,80	56,35	55,56	56,28	55,50	55,89
O	40,92	40,69	40,97	40,91	40,12	40,92	40,59
Mg	0,15	0,12	0,09	0,13	-	0,12	-
P	0,08	0,11	0,08	0,09	0,10	0,12	0,09
S	0,19	0,10	0,11	-	-	-	-
Cl	0,60	0,73	0,77	0,68	0,57	0,44	0,52
K	1,31	1,45	1,63	2,63	2,86	2,83	2,83
Mo	-	-	-	-	0,08	0,06	0,08

**Πίνακας 3.3: Μέση εκατοστιαία (%) ατομική αναλογία**

Ατομικό στοιχείο	Κόκκινη περιοχή	Μαύρη περιοχή
	$\bar{x} \pm 1,96 * SE$	$\bar{x} \pm 1,96 * SE$
C	56,63 ± 0,28	55,78 ± 0,43
O	40,86 ± 0,17	40,64 ± 0,37
Mg	0,12 ± 0,03	0,13 ± 0,01
P	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,01
S	0,13 ± 0,06	-
Cl	0,70 ± 0,10	0,55 ± 0,10
K	1,46 ± 0,18	2,79 ± 0,10
Mo	-	0,07 ± 0,01



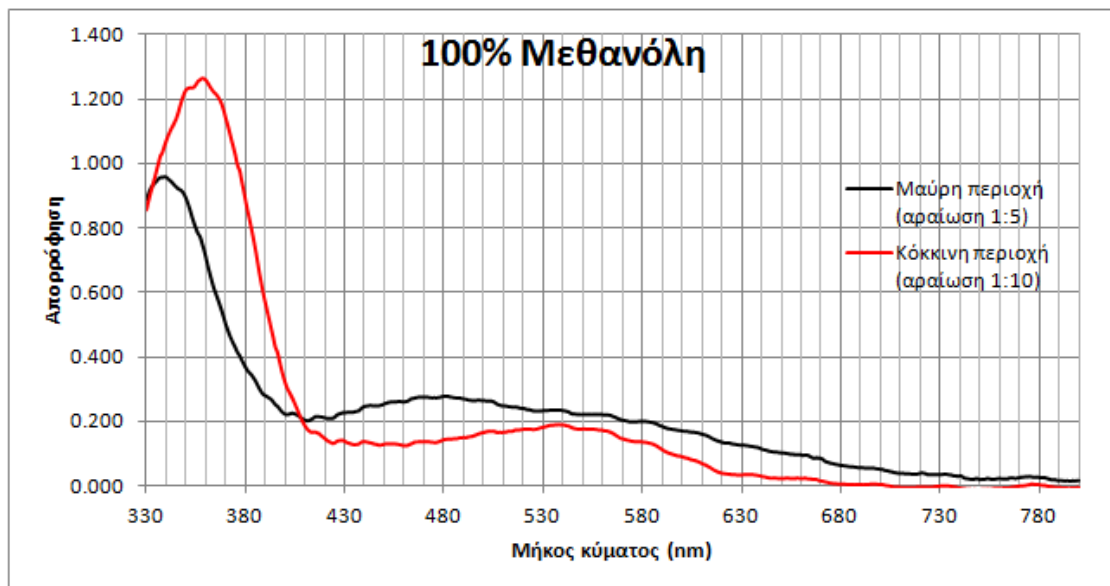
Όπως αναφέρεται και στη Μεθοδολογία η τεχνική αυτή υπόκειται σε κάποιους περιορισμούς. Σημειώνεται ότι δεν μπορούν να ανιχνευτούν στοιχεία με ατομικό αριθμό μικρότερο από 5 (Βόριο). Αυτά είναι τα στοιχεία υδρογόνο, ήλιο, λίθιο και βηρύλλιο. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίον το υδρογόνο δεν συμπεριλαμβάνεται στα αποτελέσματα. Επιπλέον ως προς την ποσότητα που ανιχνεύεται, η ελάχιστη στοιχειακή συγκέντρωση που ανιχνεύεται είναι της τάξης μεγέθους των 100 ppm, δηλαδή σε εκατοστιαία στοιχειακή αναλογία της τάξης των 0,01%. Σε αυτήν την τάξη μεγέθους ή και σε μία μεγαλύτερη (0,1%) αντιστοιχεί η θεωρητικά ελάχιστη ανιχνεύσιμη ποσότητα (τάξη των  $10^{-18}$  g) για τα ελαφρύτερα ανιχνεύσιμα στοιχεία.

Ως προς τα αποτελέσματα εντύπωση προκαλεί η αδυναμία ανίχνευσης του αζώτου (N) στα δείγματα παρά το γεγονός ότι στα βιολογικά υλικά έχει ευρύτατη παρουσία του σε πρωτεΐνες, αμινοξέα, νουκλεϊκά οξέα, νουκλεοτίδια, συνένζυμα, πορφυρίνες, και πολλές άλλες κατηγορίες ενώσεων. Πιθανά η μάζα του αζώτου (με ατομική μάζα 14 u) δεν ήταν αρκετή ώστε να συμπεριληφθεί στη διακριτική ικανότητα της μεθόδου. Ενδεικτικά το λίγο βαρύτερο θείο (S – με ατομική μάζα 32 u) μπορεί να ανιχνευθεί μόνο στην κόκκινη περιοχή και όχι στη μαύρη (Πίνακας 3.2) , παρά την παρουσία στις πρωτεΐνες. Ο άνθρακας, το οξυγόνο, το μαγνήσιο (όπου ανιχνεύεται) και ο φώσφορος εμφανίζονται σε παρόμοιες αναλογίες στις δύο περιοχές. Το θείο εντοπίζεται μόνο στην κόκκινη περιοχή και το μολυβδαίνιο μόνο στη μαύρη. Το χλώριο εμφανίζει λίγο μεγαλύτερη αναλογία στην κόκκινη περιοχή και το κάλιο σαφώς μεγαλύτερη συγκέντρωση στη μαύρη περιοχή (Πίνακας 3.2).

Στοιχεία που ενδεχομένως έχουν κάποια σημασία για το χρώμα είναι το μαγνήσιο και το μολυβδαίνιο. Το μαγνήσιο μπορεί να υποδηλώνει την παρουσία χλωροφύλλης, να εμπλέκεται σε κάποιο σύμπλοκο με ανθοκυανίνες ή να σταθεροποιεί το χρώμα των ανθοκυανινών ειδικά σε υψηλές θερμοκρασίες. Ενδεχομένως βέβαια η παρουσία του να μην σχετίζεται και με το χρώμα. Το μολυβδαίνιο εμφανίζεται ενίοτε μόνο στη μαύρη περιοχή και η παρουσία του ίσως υποδηλώνει την εμφάνιση κάποιου συμπλόκου με ανθοκυανίνες ή άλλα φλαβονοειδή. Σημειώνεται ότι αν και δεν έχει βρεθεί τέτοιο σύμπλοκο με μολυβδαίνιο, το μολυβδαίνιο σχηματίζει εν γένει σύμπλοκα και εμφανίζεται με πολλούς αριθμούς οξειδωσης μεταξύ των οποίων +2 και +3. Ωστόσο η παρουσία του είναι αμφίβολη καθώς δύο από τις τρεις κορυφές του συμπίπτουν στο φάσμα με τις κορυφές του χλωρίου και του φωσφόρου (Εικόνες 3.59 έως 3.61) και η τρίτη έχει χαμηλότερη ένταση σε σχέση με την αναμενόμενη.

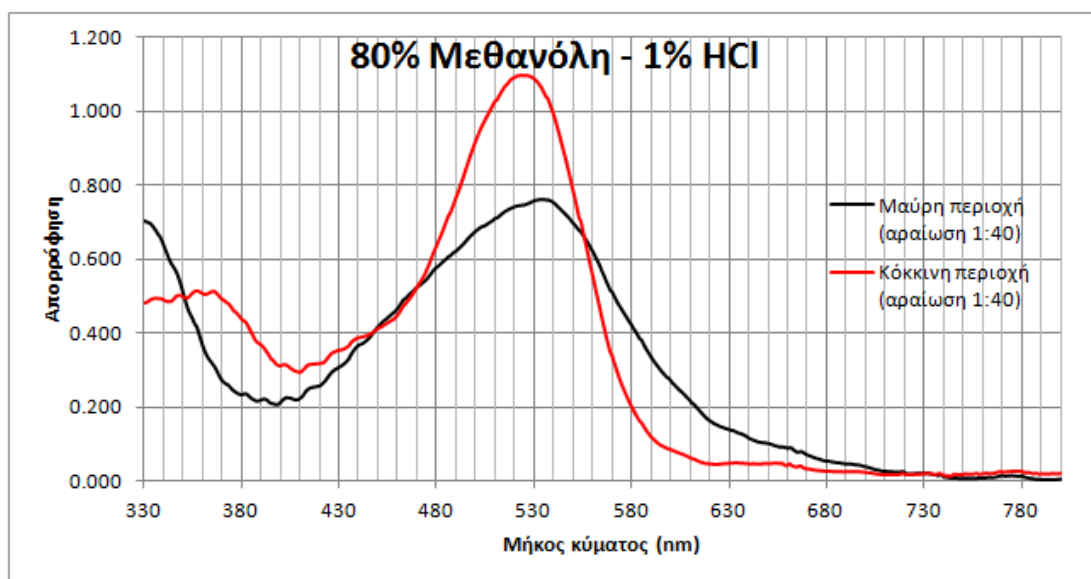
### 3.6 Ανάλυση φασμάτων απορρόφησης από εκχυλίσματα πετάλων

Τα φάσματα απορρόφησης λήφθηκαν μετά από εκχύλιση 0,1 g ξηρού υλικού (από την κόκκινη και τη μαύρη περιοχή) σε 10 mL διαλύτη και ακολούθησε η κατάλληλη αραίωση. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι 100% μεθανόλη, 80% μεθανόλη – 1% HCl και 100% αιθανόλη. Η απορρόφηση μετρήθηκε για το εύρος 330-800 nm (ανά 1 nm). Ακολουθεί η γραφική απεικόνιση των φασμάτων σε συνδυασμούς ανά διαλύτη και ανά υλικό μελέτης:



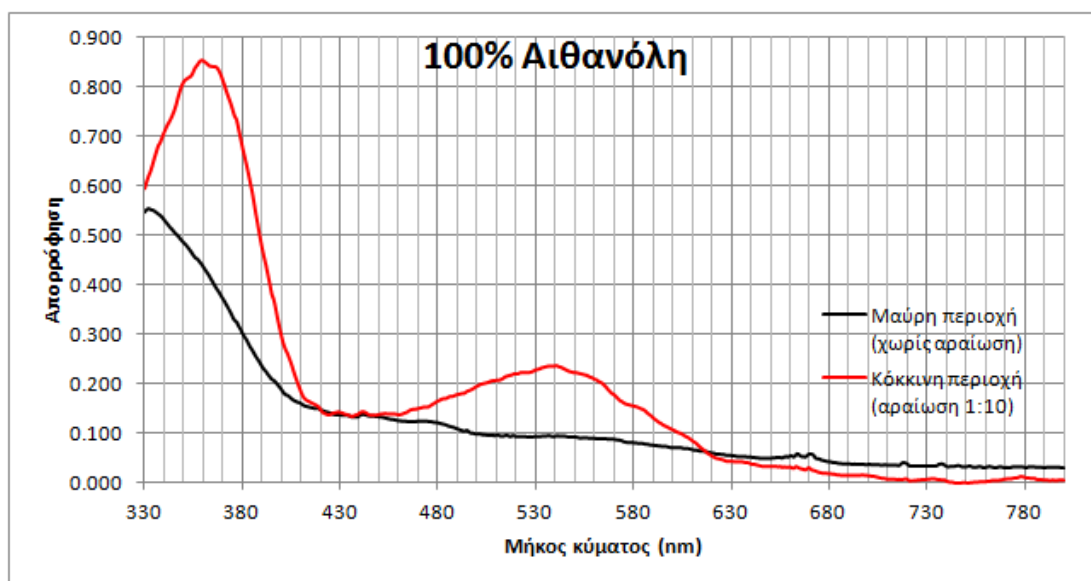
**Εικόνα 3.62:** Φάσματα απορρόφησης εκχυλισμάτων σε 100% μεθανόλη από την κόκκινη και τη μαύρη περιοχή *P. rhoeas*.

Τα φάσματα απορρόφησης εκχυλισμάτων σε μεθανόλη 100% (Εικόνα 3.62) τόσο για την κόκκινη όσο και για τη μαύρη περιοχή των πετάλων της παπαρούνας παρουσιάζουν μέγιστα στο εγγύς υπεριώδες –και μια γενικότερη απορρόφηση στην υπεριώδη περιοχή - και μία πιο γενικευμένη αλλά μικρότερη απορρόφηση στην περιοχή του ορατού. Στο υπεριώδες το φάσμα από την κόκκινη περιοχή εμφανίζει μέγιστο στα 358 nm. Με προσεκτική παρατήρηση της υπεριώδους περιοχής διακρίνονται δύο μικρά «πλατώ» - plateau (ουσιαστικά ελάττωση της κλίσης) εκατέρωθεν της κορυφής, περίπου στα 351 και 365 nm (Εικόνα 3.62). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι αυτά εμφανίζονται και στο αιθανολικό εκχύλισμα. Το εκχύλισμα της μαύρης περιοχής (Εικόνα 3.62) εμφανίζει μέγιστο στα 339 nm ίσως με κάποιο αντίστοιχο «πλατώ» (plateau) στα 347 nm. Στην ορατή περιοχή η κόκκινη περιοχή παρουσιάζει μικρή απορρόφηση στο εύρος από 430 έως 620 nm. Αυτή η απορρόφηση φαίνεται να προκύπτει από τη σύνθεση πολλών επιμέρους μεγίστων απορρόφησης. Στην ορατή περιοχή η μαύρη περιοχή παρουσιάζει επίσης μικρή απορρόφηση αλλά μεγαλύτερου εύρους, δηλαδή στο εύρος από 410 έως 700 nm. Αυτή η απορρόφηση φαίνεται να προκύπτει από τη σύνθεση πολλών επιμέρους μεγίστων απορρόφησης, καθώς φέρει πολλά επιμέρους διαδοχικά «πλατώ» (plateaux) (Εικόνα 3.62).



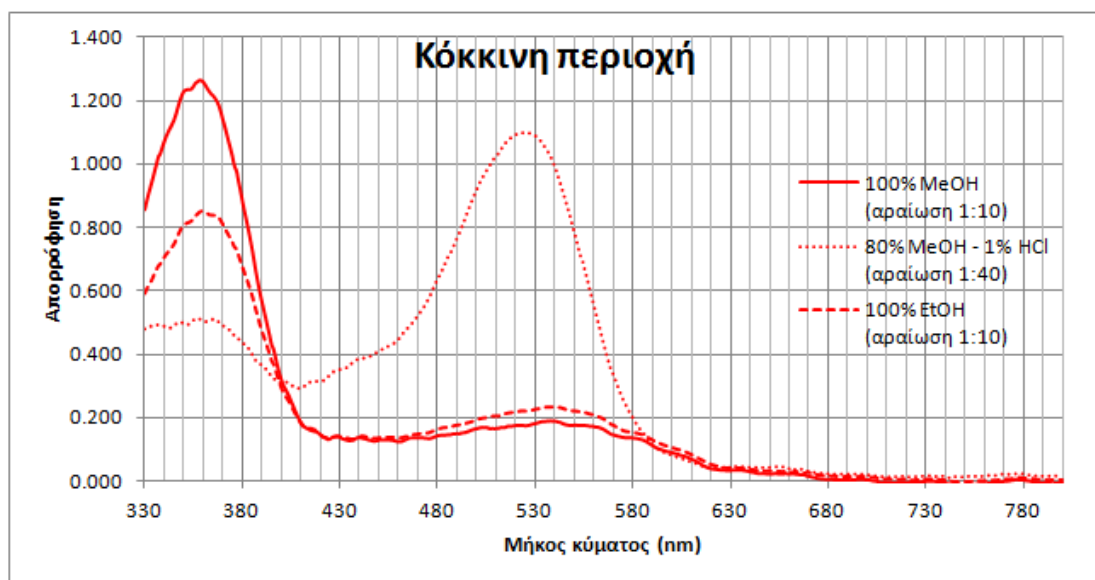
**Εικόνα 3.63:** Φάσματα απορρόφησης εκχυλισμάτων σε 80% μεθανόλη – 1% HCl από την κόκκινη και τη μαύρη περιοχή *P. rhoeas*.

Τα φάσματα απορρόφησης εκχυλισμάτων σε μεθανόλη 80% - HCl 1% τόσο για την κόκκινη όσο και για τη μαύρη περιοχή (Εικόνα 3.63) παρουσιάζουν μία εμφανή περιοχή μεγίστου στην ορατή περιοχή και επίσης απορρόφηση στο υπεριώδες. Η κόκκινη περιοχή εμφανίζει στο υπεριώδες μέγιστη απορρόφηση στα 330-373 nm και στο ορατό μεγαλύτερη απορρόφηση με μέγιστο στα 524 nm. Η απορρόφηση της κόκκινης περιοχής (Εικόνα 3.63) στο υπεριώδες φαίνεται να προέρχεται από αρκετά επιμέρους μέγιστα, αλλά μικρού ύψους. Η μαύρη περιοχή εμφανίζει δύο μέγιστα στα 330 nm (υπεριώδες) και στα 534 nm (ορατό). Η απορρόφηση στο ορατό για το μαύρο χρώμα είναι πιο ευρεία (μικρότερη κλίση της καμπύλης) σε σχέση με την κόκκινη. Το φάσμα της μαύρης περιοχής (Εικόνα 3.63) στο ορατό φαίνεται να αποτελείται από σύνθεση επιμέρους φασμάτων, γιατί εκτός από την κύρια κορυφή, εμφανίζονται αρκετά μικρά «πλατώ» (plateaux), ενδεικτικά στα 442, 487, 504, 511 και 525 nm.



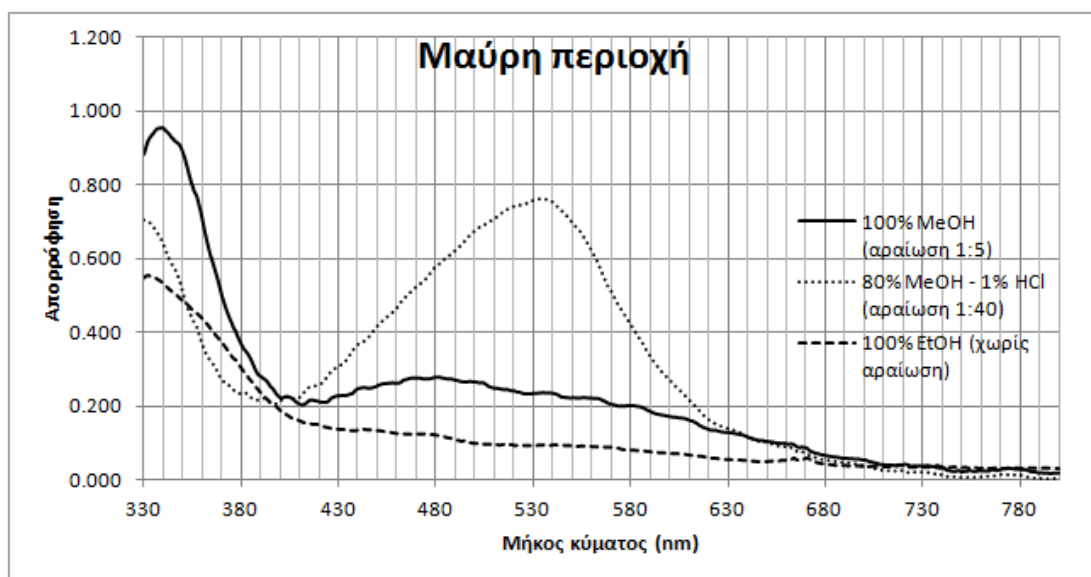
**Εικόνα 3.64: Φάσματα απορρόφησης εκχυλισμάτων σε 100% αιθανόλη από την κόκκινη και τη μαύρη περιοχή *P. rhoeas*.**

Τα φάσματα απορρόφησης εκχυλισμάτων σε αιθανόλη 100% (Εικόνα 3.64) διαφέρουν για τις δύο περιοχές αν και εμφανίζεται κοινή απορρόφηση στην υπεριώδη περιοχή. Η κόκκινη περιοχή εμφανίζει ένα μέγιστο στα 359 nm (υπεριώδης περιοχή) και μια ευρύτερη αλλά μικρότερη κορυφή στα 540 nm (ορατή περιοχή). Το μέγιστο της υπεριώδους περιοχής περιβάλλεται από δύο μικρά «πλατώ» (plateaux) (Εικόνα 3.64) – τα οποία επανεμφανίζονται στο μεθανολικό εκχύλισμα – στα 350 και 366 nm. Η απορρόφηση της κόκκινης περιοχής, εκτός από ευρεία, φαίνεται να παρουσιάζει και επί μέρους «πλατώ» (plateaux), όπως στα 534 και 555 nm. Η μαύρη περιοχή εμφανίζει μέγιστο στην υπεριώδη περιοχή στα 332 nm η οποία μειώνεται διαρκώς – με ένα «πλατώ» (plateau) στα 466-479 nm – ώστε στην ορατή περιοχή η απορρόφηση πλέον είναι πολύ μικρή και διαρκώς μειούμενη χωρίς να εμφανίζεται κάποιο τοπικό μέγιστο (Εικόνα 3.64).



**Εικόνα 3.65: Φάσματα απορρόφησης εκχυλισμάτων από την κόκκινη περιοχή σε 100% μεθανόλη, 80% μεθανόλη – 1% HCl και 100% αιθανόλη.**

Από τη σύγκριση των τριών φασμάτων της κόκκινης περιοχής (Εικόνα 3.65) προκύπτει ότι τα φάσματα από 100% μεθανόλη και 100% αιθανόλη είναι αρκετά παρόμοια, ενώ το φάσμα σε 80% μεθανόλη - 1% HCl είναι διαφορετικό φανερώνοντας απορρόφηση στην ορατή περιοχή και μην εμφανίζοντας συγκριτικά την απορρόφηση στην υπεριώδη περιοχή. Η ομοιότητα των φασμάτων 100% μεθανόλης και 100% αιθανόλης φαίνεται από την γενικότερη μορφή τους όσο και από τη θέση του μεγίστου του υπεριώδους (Εικόνα 3.65).



Εικόνα 3.66: Φάσματα απορρόφησης εκχυλισμάτων από τη μαύρη περιοχή σε 100% μεθανόλη, 80% μεθανόλη – 1% HCl και 100% αιθανόλη.

Από τη σύγκριση των τριών φασμάτων της μαύρης περιοχής (Εικόνα 3.66) προκύπτει ότι τα φάσματα διαφέρουν μεταξύ τους. Οι τρεις καμπύλες απορρόφησης εμφανίζουν μέγιστο στο υπεριώδες αν και η απορρόφηση στο διάλυμα 100% αιθανόλη στο υπεριώδες είναι πιο διευρυμένη. Η θέση του μεγίστου στο υπεριώδες συμπίπτει για το εκχύλισμα σε 80% μεθανόλη - 1% HCl και το εκχύλισμα 100% σε αιθανόλη, ενώ είναι κατά 7-9 nm μετατοπισμένο σε μεγαλύτερο μήκος κύματος στο εκχύλισμα σε 100% μεθανόλη. Εμφανές μέγιστο στο ορατό εμφανίζεται μόνο στο εκχύλισμα σε 80% μεθανόλη - 1% HCl, ενώ στο εκχύλισμα σε 100% μεθανόλη φαίνεται διάχυτη απορρόφηση και στο εκχύλισμα σε 100% αιθανόλη διαρκώς ελαττούμενη απορρόφηση (Εικόνα 3.66).

Τα φάσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για έναν πρώτο προσανατολισμό ως προς τις ομάδες χρωστικών που υπάρχουν στο υλικό μελέτης και ενδεχομένως ακόμα και με πιο συγκεκριμένες υποθέσεις. Αυτό γίνεται με σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα. Εξετάστηκαν οι τρεις βασικές ομάδες των φυτικών χρωστικών, δηλαδή φλαβονοειδή, καρτενοειδή και χλωροφύλλες. Στον πίνακα 3.4 φαίνονται βιβλιογραφικά δεδομένα για τις κυριότερες κατηγορίες των φλαβονοειδών, και κάποιων ακόμα φαινολικών ενώσεων.

Πίνακας 3.4: Περιοχές απορρόφησης φλαβονοειδών και άλλων φαινολικών ενώσεων		
Κατηγορία ενώσεων	Περιοχές μέγιστης απορρόφησης (nm)	
	Swain (1976)	Harborne (1984)
-	-	266-295
Κοινά φαινολικά οξέα (σε EtOH)	-	235-309
Υδροξυκινναμικά οξέα (σε EtOH)	-	227-245 310-332
Φλαβόνες (σε MeOH)	255-285	250-270
	315-350	330-350
Φλαβονόλες (σε MeOH)	255-275	250-270
	350-385	350-390

		περίπου 300 (χαμηλή ένταση)
<b>Φλαβανόνες (σε MeOH)</b>	275-295	περίπου 225 275-250 310-330 (χαμηλή ένταση)
<b>Ισοφλαβόνες (σε MeOH)</b>	250-270	255-265 310-330 (χαμηλή ένταση)
<b>Χαλκόνες (σε MeOH)</b>	370-395	240-270 (χαμηλή ένταση) 365-390
<b>Αουρόνες (σε MeOH)</b>	385-415	240-260 (χαμηλή ένταση) 390-430
<b>Ανθοκυανίνες (σε MeOH-HCl)</b>	475-545	περίπου 275 (χαμηλή ένταση) 475-560

Οι περιοχές απορρόφησης στο ορατό των φασμάτων που αντιστοιχούν στην οξιμισμένη μεθανόλη (Εικόνα 3.63) καταδεικνύουν εμφανώς κυρίαρχη παρουσία ανθοκυανινών. Τα μέγιστα απορρόφησης των έξι κοινότερων ανθοκυανιδινών παρουσιάζονται στον πίνακα 3.5. Πιο συγκεκριμένα το μέγιστο της κόκκινης περιοχής (524 nm) βρίσκεται κοντά στο μέγιστο της πελαργονιδίνης (520 nm), καθώς και σε κοινούς γλυκοζίτες κυανιδίνης (523, 524 nm) και παιονιδίνης (523 nm) (Swain 1974). Το μέγιστο της μαύρης περιοχής (534 nm) βρίσκεται κοντά στην κυανιδίνη (535 nm) και στην παιονιδίνη (532 nm) και σε κοινούς γλυκοζίτες δελφινιδίνης, πετουινιδίνης και μαλβιδίνης (534 nm) (Swain 1974).

<b>Πίνακας 3.5: Μέγιστα απορρόφησης των κοινότερων ανθοκυανιδικών</b>	
<b>Ανθοκυανιδίνη</b>	<b>Μέγιστο απορρόφησης (nm) κατά Swain (1976) και Harborne (1984)</b>
<b>Πελαργονιδίνη</b>	520
<b>Κυανιδίνη</b>	535
<b>Παιονιδίνη</b>	532
<b>Δελφινιδίνη</b>	546
<b>Πετουινιδίνη</b>	543
<b>Μαλβιδίνη</b>	542

Σε ό,τι αφορά το υπεριώδες φάσμα σε μεθανολικό (Εικόνα 3.62) – αλλά και αιθανολικό (Εικόνα 3.64) – εκχύλισμα, φαίνεται ότι η απορρόφηση για τη μαύρη περιοχή συμβαίνει σε μικρότερα μήκη κύματος σε σύγκριση με την κόκκινη. Αυτό οδηγεί τα μέγιστα της κόκκινης περιοχής να εμπίπτουν στην περιοχή των φλαβονολών, ενώ τα μέγιστα της μαύρης στην περιοχή των φλαβονών.

Το μέγιστο της κόκκινης περιοχής σε μεθανολικό εκχύλισμα (Εικόνα 3.62) στο υπεριώδες (358 nm) και τα κοντινά «πλατώ» (plateaux) (351 και 365 nm) βρίσκονται κοντά με τα μέγιστα κοινών γλυκοζιτών φλαβονολών, όπως γλυκοζίτες καμπφερόλης (kaempferol) (350, 368 nm), μυρισετίνης (myricetin) (365 nm) και κερκετίνης (quercetin) (359, 360, 364 nm) (Swain 1974). Το μέγιστο της μαύρης περιοχής σε μεθανολικό εκχύλισμα (Εικόνα 3.62) στο υπεριώδες (339 nm) βρίσκεται κοντά με τα μέγιστα κοινών γλυκοζιτών της φλαβόνης απιγενίνης (apigenin) (336 nm) (Swain 1974).



Σχετικά με τις χλωροφύλλες είναι γνωστό ότι απορροφούν έντονα στην ερυθρή και την κυανή περιοχή. Στην κυανή περιοχή η χλωροφύλλη α εμφανίζει μέγιστο στα 666 nm σε καθαρή μεθανόλη και στα 665 nm σε 96% αιθανόλη. Η χλωροφύλλη β εμφανίζει μέγιστο στα 666 nm σε καθαρή μεθανόλη και στα 649 nm σε 96% αιθανόλη (Lichtenhaler and Wellburn 1983). Στην εργασία αυτή, δεν παρατηρήθηκε κάποιο μέγιστο στα φάσματα σε αυτές τις περιοχές (Εικόνες 3.62 και 3.64).

Τα καροτενοειδή εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση στην ευρύτερη περιοχή 400-500 nm σε αιθανόλη και μεθανόλη (Davies 1974). Στα σχετικά φάσματα (Εικόνες 3.62 και 3.64) δεν φαίνονται κάποια εμφανή σημεία μεγίστων, παρά μόνο λίγες τοπικές διακυμάνσεις της απορρόφησης χαμηλής έντασης, στα μεθανολικά φάσματα της κόκκινης και της μαύρης περιοχής και στο αιθανολικό φάσμα της κόκκινης περιοχής.

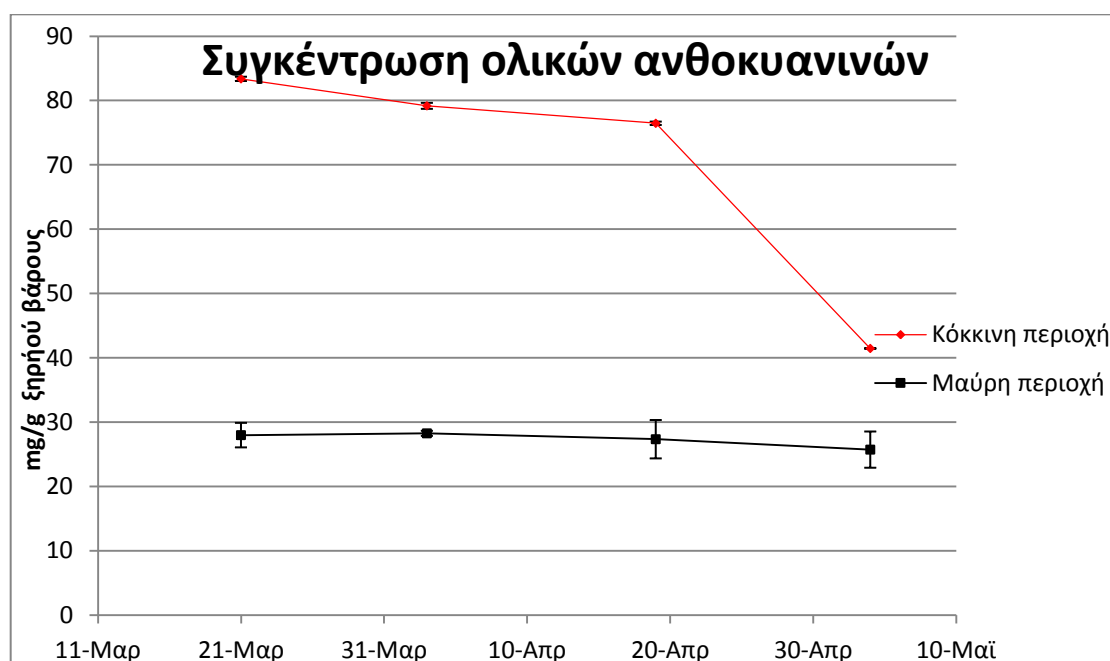
### 3.7 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών ανθοκυανινών

Η συγκέντρωση ολικών ανθοκυανινών υπολογίστηκε με τη μέθοδο του διαφορικού pH και υπολογίστηκε ανά g ξηρού και νωπού βάρους. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 3.6 και 3.7:

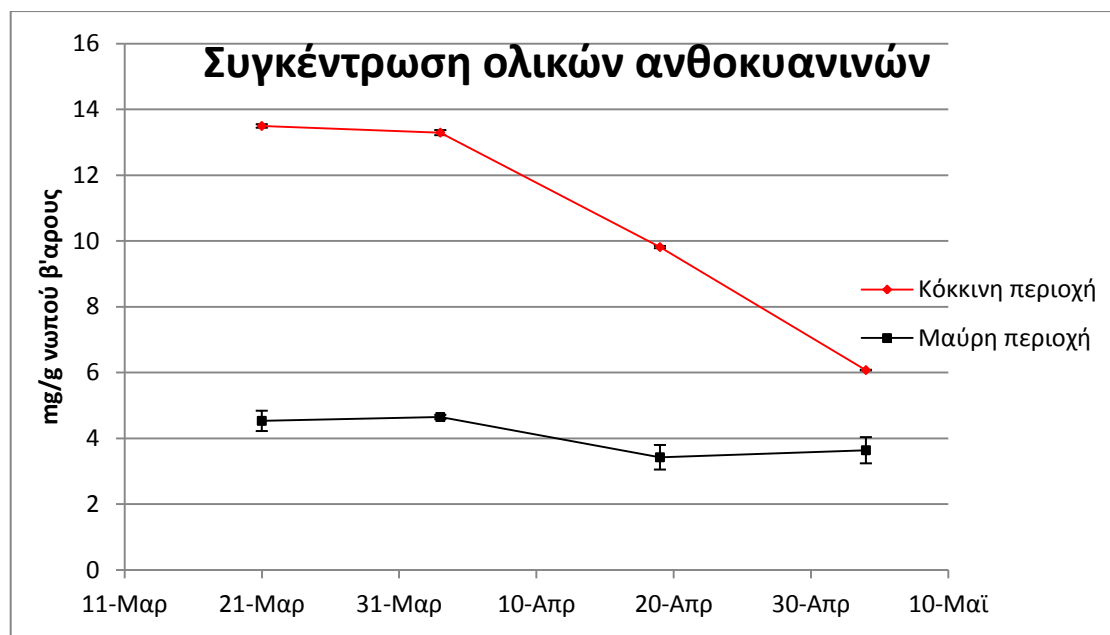
Πίνακας 3.6: Συγκέντρωση ολικών ανθοκυανινών (mg/g ξηρού βάρους)				
Ημερομηνία	21/3	3/4	19/4	4/5
Κόκκινη περιοχή	83,38 ± 0,33	79,18 ± 0,47	76,47 ± 0,26	41,46 ± 0,07
Μαύρη περιοχή	27,98 ± 1,91	28,26 ± 0,40	27,35 ± 2,98	25,73 ± 2,82

Πίνακας 3.7: Συγκέντρωση ολικών ανθοκυανινών (mg/g νωπού βάρους)				
Ημερομηνία	21/3	3/4	19/4	4/5
Κόκκινη περιοχή	13,50 ± 0,05	13,29 ± 0,08	9,81 ± 0,03	6,08 ± 0,01
Μαύρη περιοχή	4,53 ± 0,31	4,65 ± 0,07	3,43 ± 0,37	3,64 ± 0,40

Τα όρια γύρω από τις τιμές στους πίνακες 3.6 και 3.7 αφορούν στις ακραίες τιμές των μετρήσεων που λήφθησαν.



Εικόνα 3.67: Εποχική διακύμανση της συγκέντρωσης ολικών ανθοκυανινών ανά ξηρό βάρος στην κόκκινη και τη μαύρη περιοχή των πετάλων του *P. rhoeas*.



**Εικόνα 3.68:** Εποχική διακύμανση της συγκέντρωσης ολικών ανθοκυανινών ανά νωπό βάρος στην κόκκινη και τη μαύρη περιοχή των πετάλων του *P. rhoeas*.

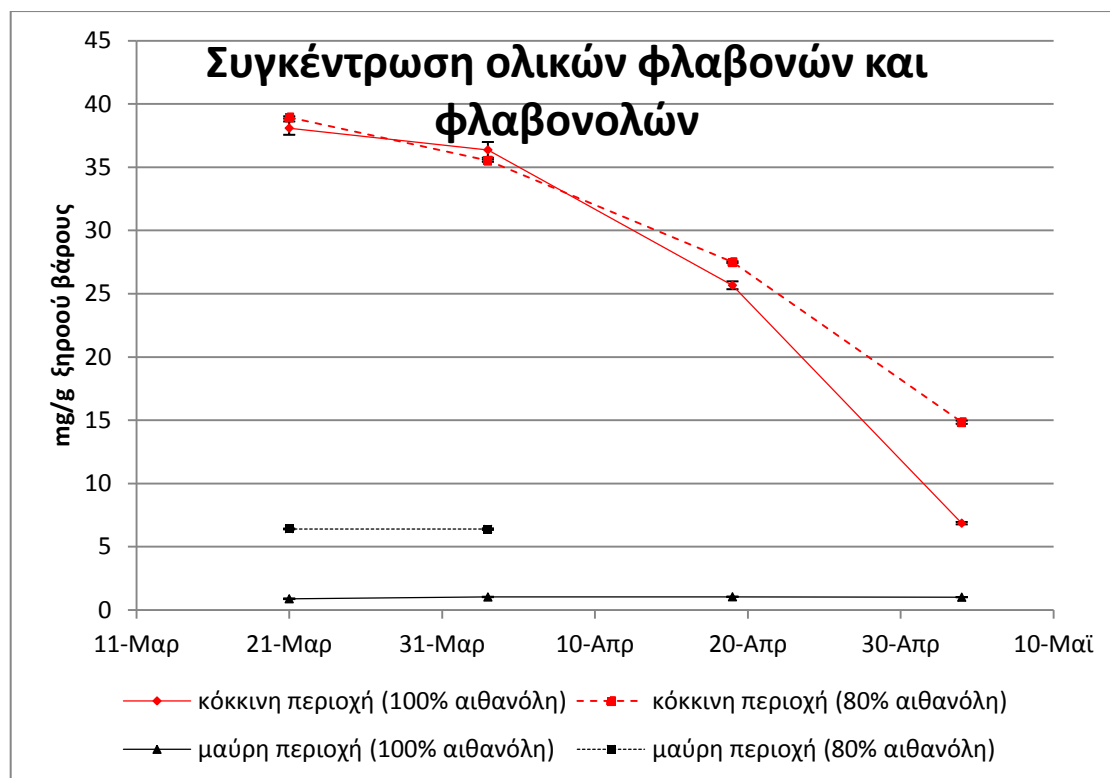
Σύμφωνα με τους πίνακες 3.6 και 3.7 και τις εικόνες 3.67 και 3.68, η συγκέντρωση των ολικών ανθοκυανινών είναι υψηλότερη για την κόκκινη περιοχή συγκριτικά με τη μαύρη για όλες τις ημερομηνίες συλλογής. Η ανθοκυανίνες στη μαύρη περιοχή εμφανίζουν σταθερή συγκέντρωση για όλη την περίοδο ανθοφορίας σύμφωνα με τη συγκέντρωση ανά ξηρό βάρος (Εικόνα 3.67), και ίσως μία ελαφρά διακύμανση με πτωτική τάση ανά νωπό βάρος (Εικόνα 3.68). Οι ανθοκυανίνες στην κόκκινη περιοχή εμφανίζουν μία έντονα πτωτική τάση προς το τέλος της ανθοφορίας. Η πτώση αυτή φαίνεται πολύ έντονα στη συλλογή 4/5 για τη συγκέντρωση ανά ξηρό βάρος (Εικόνα 3.67), ενώ για τη συγκέντρωση ανά νωπό βάρος είναι ήδη εμφανέστατη από τη συλλογή της 19/4 (Εικόνα 3.68).

### 3.8 Ποσοτικός προσδιορισμός «ολικών φλαβονοειδών»

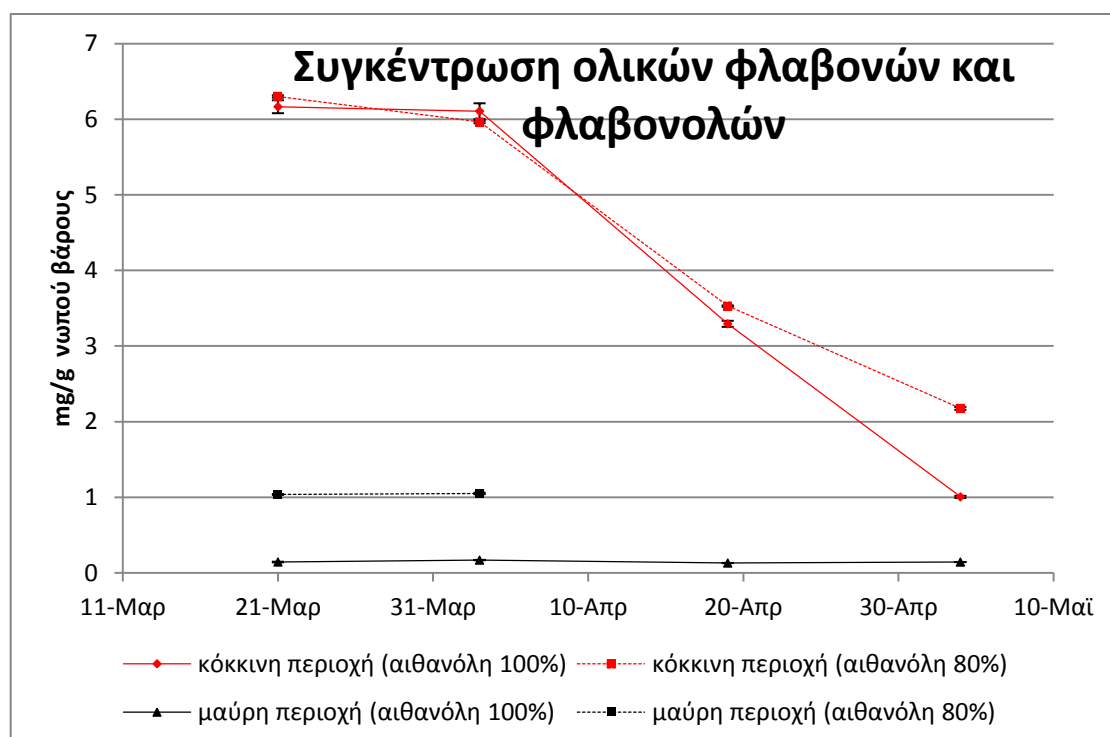
Οι συγκεντρώσεις των «ολικών φλαβονοειδών», που ωστόσο περιορίζονται κυρίως σε φλαβόνες και φλαβονόλες υπολογίστηκαν μέσω της συμπλοκοποίησης με  $AlCl_3$  ανά g ξηρής και νωπής μάζας. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 3.8 και 3.9:

<b>Πίνακας 3.8: Συγκέντρωση ολικών φλαβονών &amp; φλαβονολών (mg/g ξηρού βάρους)</b>					
Ημερομηνίες		<b>21/3</b>	<b>3/4</b>	<b>19/4</b>	<b>4/5</b>
<b>Κόκκινη περιοχή</b>	100% EtOH	38,09 ± 0,53	36,37 ± 0,62	25,67 ± 0,31	6,87 ± 0,09
	80% EtOH	38,93 ± 0,09	35,52 ± 0,09	27,49 ± 0,07	14,84 ± 0,13
<b>Μαύρη περιοχή</b>	100% EtOH	0,895 ± 0,027	1,036 ± 0,016	1,052 ± 0,008	1,021 ± 0,008
	80% EtOH	6,41 ± 0,04	6,39 ± 0,06	-	-
<b>Πίνακας 3.9: Συγκέντρωση ολικών φλαβονών &amp; φλαβονολών (mg/g νωπού βάρους)</b>					
Ημερομηνίες		<b>21/3</b>	<b>3/4</b>	<b>19/4</b>	<b>4/5</b>
<b>Κόκκινη περιοχή</b>	100% EtOH	6,165 ± 0,085	6,106 ± 0,104	3,294 ± 0,040	1,006 ± 0,014
	80% EtOH	6,301 ± 0,015	5,963 ± 0,016	3,529 ± 0,009	2,176 ± 0,019
<b>Μαύρη περιοχή</b>	100% EtOH	0,145 ± 0,004	0,170 ± 0,003	0,132 ± 0,001	0,144 ± 0,001
	80% EtOH	1,038 ± 0,006	1,052 ± 0,010	-	-

Τα περιθώρια σφάλματος που χρησιμοποιούνται στους πίνακες 3.8 και 3.9 είναι τα διαστήματα 95% εμπιστοσύνης κανονικής κατανομής γύρω από τη μέση τιμή, δηλαδή  $\bar{x} \pm 1,96 * SE$ , όπως προέκυψαν από τις τιμές μέτρησης.



Εικόνα 3.69: Εποχική διακύμανση της συγκέντρωσης ολικών φλαβονών και φλαβονολών ανά ξηρό βάρος στην κόκκινη και τη μαύρη περιοχή των πετάλων του *P. rhoeas*.



Εικόνα 3.70: Εποχική διακύμανση της συγκέντρωσης ολικών φλαβονών και φλαβονολών ανά νωπό βάρος στην κόκκινη και τη μαύρη περιοχή των πετάλων του *P. rhoeas*.

Σύμφωνα με τους πίνακες 3.8 και 3.9 και τις εικόνες 3.69 και 3.70, η συγκέντρωση ολικών φλαβονών και φλαβονολών είναι μεγαλύτερη για την κόκκινη περιοχή συγκριτικά με τη

μαύρη για όλες τις ημερομηνίες συλλογής, ειδικά για τη μαύρη περιοχή είναι εξαιρετικά μικρή. Ως διαλύτης εκχύλισης φαίνεται σαφώς πιο αποτελεσματική η αιθανόλη 80%, τόσο για τη μαύρη περιοχή σε όλες τις ημερομηνίες, όσο και για την κόκκινη περιοχή κατά το τέλος της ανθοφορίας (Εικόνες 3.69 και 3.70). Η συγκέντρωση των φλαβονών και φλαβονολών στη μαύρη περιοχή πιθανώς διατηρείται σταθερή κατά τη διάρκεια της ανθοφορίας. Αντιθέτως στην κόκκινη περιοχή εμφανίζεται σαφέστατη πτωτική τάση (και ανά ξηρό και ανά νωπό βάρος) από τη συλλογή της 19/4 και έπειτα, και για τους δύο διαλύτες εκχύλισης (Εικόνες 3.69 και 3.70).



### 3.9 Ποσοτικός προσδιορισμός χλωροφυλλών και ολικών καροτενοειδών

Οι συγκεντρώσεις χλωροφύλλης α, χλωροφύλλης β και ολικών καροτενοειδών υπολογίστηκαν μέσω συγκεκριμένου πακέτου εξισώσεων ανά g ξηρού και νωπού βάρους. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 3.10 και 3.11:

**Πίνακας 3.10: Συγκέντρωση χλωροφυλλών και ολικών καροτενοειδών ανά ξηρό βάρος**

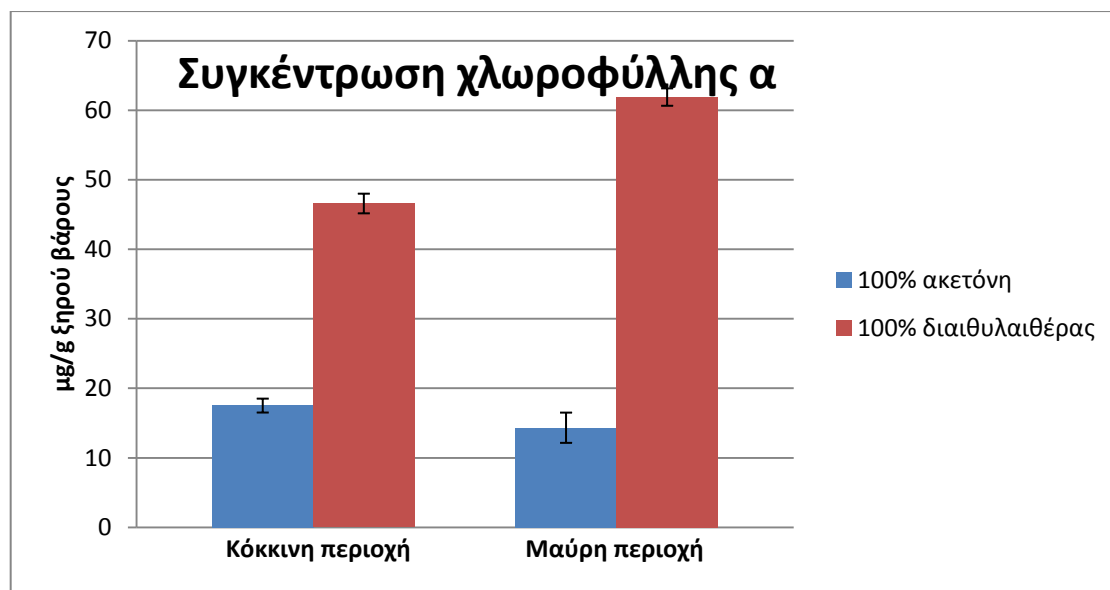
Χρωστικές (μg/g ξηρού βάρους)	Κόκκινη περιοχή			Μαύρη περιοχή		
	Ακετόνη	Διαιβ/έρας	Μέσος όρος	Ακετόνη	Διαιβ/έρας	Μέσος όρος
<b>Χλωροφύλλη α</b>	17,51 ± 1,53	46,58 ± 0,85	32,05 ± 0,88	14,33 ± 0,48	61,89 ± 2,04	38,11 ± 1,05
<b>Χλωροφύλλη β</b>	57,53 ± 1,46	85,49 ± 2,64	71,51 ± 1,51	7,69 ± 3,47	44,58 ± 1,58	26,14 ± 1,90
<b>Ολική χλωροφύλλη</b>	75,05 ± 2,11	132,08 ± 2,77	103,56 ± 1,74	22,02 ± 3,50	106,47 ± 2,58	64,25 ± 2,17
<b>Ολικά καροτενοειδή</b>	49,65 ± 1,00	13,97 ± 1,41	31,81 ± 0,87	19,50 ± 2,18	23,55 ± 1,25	21,52 ± 1,26

**Πίνακας 3.11: Συγκέντρωση χλωροφυλλών και ολικών καροτενοειδών ανά νωπό βάρος**

Χρωστικές (μg/g νωπού βάρους)	Κόκκινη περιοχή			Μαύρη περιοχή		
	Ακετόνη	Διαιβ/έρας	Μέσος όρος	Ακετόνη	Διαιβ/έρας	Μέσος όρος
<b>Χλωροφύλλη α</b>	2,94 ± 0,26	7,82 ± 0,14	5,38 ± 0,15	2,35 ± 0,08	10,18 ± 0,34	6,27 ± 0,17
<b>Χλωροφύλλη β</b>	9,66 ± 0,24	14,35 ± 0,44	12,01 ± 0,25	1,26 ± 0,57	7,33 ± 0,26	4,30 ± 0,31
<b>Ολική χλωροφύλλη</b>	12,60 ± 0,36	22,17 ± 0,47	17,39 ± 0,29	3,62 ± 0,58	17,52 ± 0,42	10,57 ± 0,36
<b>Ολικά καροτενοειδή</b>	8,34 ± 0,17	2,34 ± 0,24	5,34 ± 0,15	3,21 ± 0,36	3,87 ± 0,21	3,54 ± 0,21

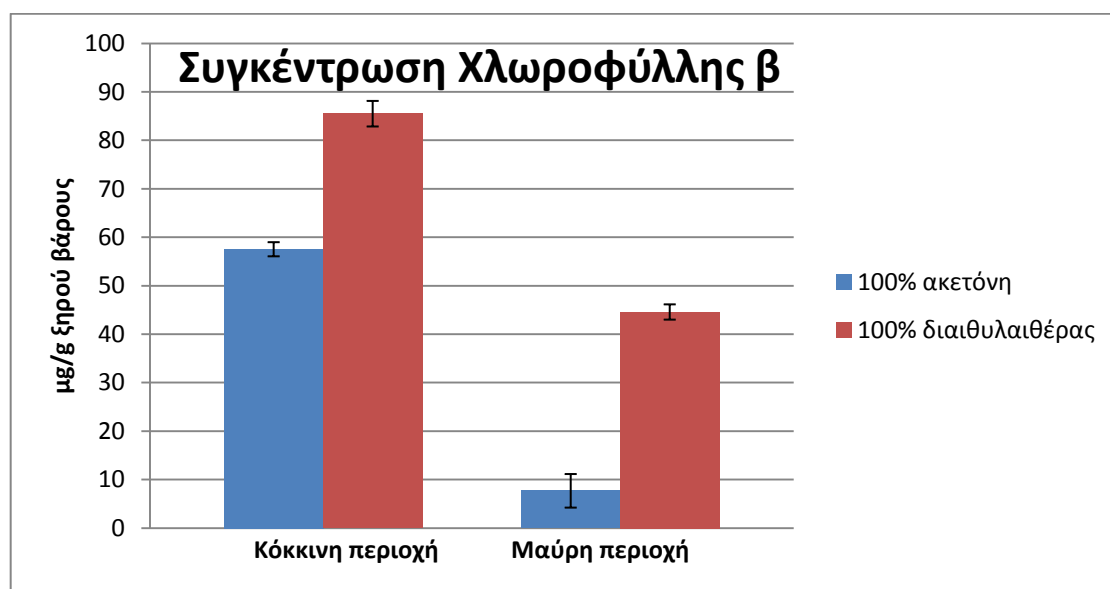
Τα περιθώρια σφάλματος που χρησιμοποιούνται στους πίνακες 3.10 και 3.11 είναι τα διαστήματα 95% εμπιστοσύνης κανονικής κατανομής γύρω από τη μέση τιμή, δηλαδή  $\bar{x} \pm 1,96 * SE$ , όπως προέκυψαν από τις τιμές μέτρησης.

Γενικά παρατηρείται (Πίνακες 3.10 και 3.11) ότι οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή βρίσκονται στα πέταλα σε πολύ μικρές ποσότητες, της τάξης των μg/g. Επιπλέον στις 5 από τις 6 περιπτώσεις ποσοτικοποίησης χρωστικών (χλωροφύλλη α, χλωροφύλλη β και ολικά καροτενοειδή για την κόκκινη και τη μαύρη περιοχή) παρατηρείται ασυμφωνία των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τους δύο διαλύτες (ακετόνη και διαιθυλαιθέρας).



**Εικόνα 3.71:** Συγκέντρωση χλωροφύλλης α στην κόκκινη και τη μαύρη περιοχή των πετάλων *P.rhoeas*.

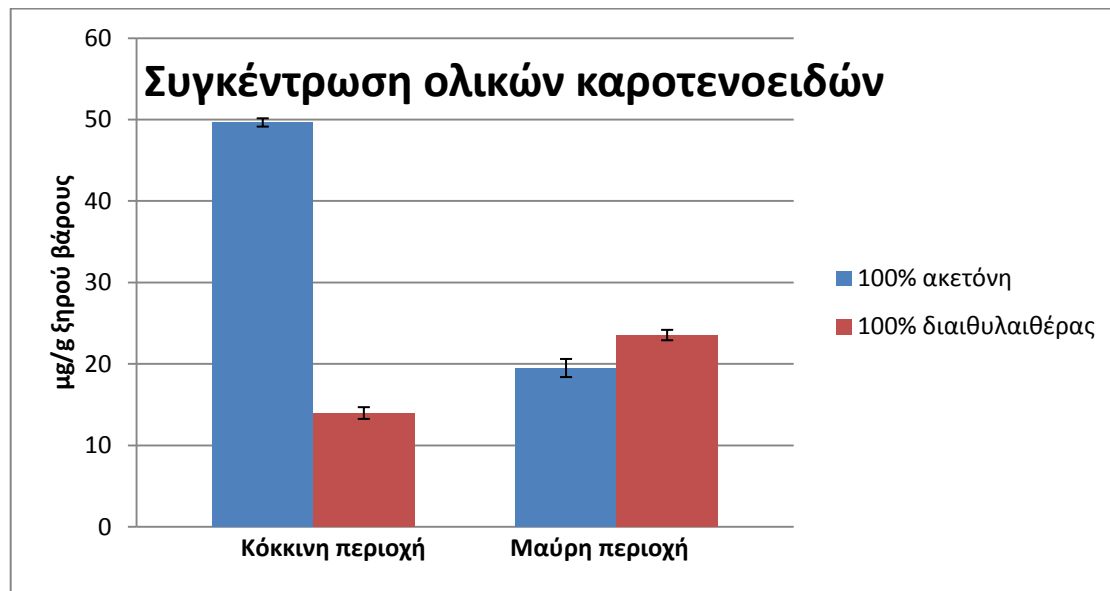
Ο διαιθυλαιθέρας φαίνεται να προκαλεί αποτελεσματικότερη εξαγωγή της χλωροφύλλης α και στους δύο ιστούς (Εικόνα 3.71). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τον διαιθυλαιθέρα, ελαφρά μεγαλύτερη συγκέντρωση χλωροφύλλης α (αλλά πάντα μικρή) συναντάται στη μαύρη περιοχή. Αντιθέτως η ακετόνη δίνει παρόμοια αποτελέσματα συγκέντρωσης και για τους δύο ιστούς (Πίνακας 3.10 και Εικόνα 3.71). Αν ληφθεί μέσος όρος από τους δύο διαλύτες η διαφορά δεν είναι μεγάλη (Πίνακας 3.10).



**Εικόνα 3.72:** Συγκέντρωση χλωροφύλλης β στην κόκκινη και τη μαύρη περιοχή των πετάλων *P.rhoeas*.

Ο διαιθυλαιθέρας φαίνεται να είναι ο αποτελεσματικότερος και για την εξαγωγή της χλωροφύλλης β και στους δύο ιστούς (Εικόνα 3.72). Από τη χρήση και των δύο διαλυτών εκχύλισης προκύπτει μεγαλύτερη (αλλά χαμηλή) συγκέντρωση χλωροφύλλης α για την

κόκκινη περιοχή, εν αντιθέσει προς τα αποτελέσματα για τη χλωροφύλλη α. Η ολική χλωροφύλλη (χλωροφύλλη α + χλωροφύλλη β) εμφανίζεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στην κόκκινη περιοχή είτε χρησιμοποιηθούν τα αποτελέσματα από ακετόνη, διαιθυλαιθέρα ή τον μέσο όρο των δύο διαλυτών (Πίνακας 3.10).



**Εικόνα 3.73:** Συγκέντρωση ολικών καροτενοειδών στην κόκκινη και τη μαύρη περιοχή των πετάλων *P.rhoeas*.

Η συγκέντρωση ολικών καροτενοειδών φαίνεται πολύ χαμηλή. Εδώ δεν ξεχωρίζει κάποιος διαλύτης που να τα εκχυλίζει καλύτερα, καθώς για τη μαύρη περιοχή προκύπτουν παρόμοια αποτελέσματα ενώ για την κόκκινη περιοχή προκύπτει μεγαλύτερη συγκέντρωση κατά την εκχύλιση με ακετόνη (Εικόνα 3.73). Παρά τη χαμηλή συγκέντρωση ολικών καροτενοειδών, η κόκκινη περιοχή ίσως εμφανίζει μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών καροτενοειδών στο εκχύλισμα με ακετόνη ή στον μέσο όρο των διαλυτών (Πίνακας 3.10). Οι τιμές συγκέντρωσης ανά νωπό βάρος καταδεικνύουν παρόμοιες σχέσεις όπως οι τιμές ανά ξηρό βάρος (Πίνακας 3.11).

## 4. Συζήτηση – Συμπεράσματα

### 4.1 Μακροσκοπικές παρατηρήσεις

Από τις μακροσκοπικές παρατηρήσεις φαίνεται η ποικιλότητα του μεγέθους, του σχήματος και του ακριβούς χρωματικού προτύπου του πετάλου στους φυσικούς πληθυσμούς. Η συντριπτική πλειονότητα των ατόμων που παρατηρήθηκαν στο πεδίο έφεραν τη μαύρη κεντρική περιοχή, και επομένως εγείρονται ερωτήματα για τη σημασία της κανθαρόφιλης επικονίασης (Dafni *et al.* 1990), όπως έχει παρατηρηθεί σε αντίστοιχους πληθυσμούς σε Μεσογειακά οικοσυστήματα του Ισραήλ (Dafni *et al.* 1990). Επίσης το χρωματικό πρότυπο της παπαρούνας εμπίπτει στο γενικότερο ανθικό πρότυπο του τύπου “bull’s eye” και πιθανώς ενισχύει τα σήματα που υποβοηθούν επικονίαση. Επίσης πολύ ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση της λευκής ζώνης, κυρίως για τρεις λόγους: επειδή το περίγραμμά της είναι πριονωτό ακολουθώντας το περίγραμμα της μαύρης περιοχής, επειδή πρόκειται στην πραγματικότητα για τρεις χρωματικές ζώνες (γκρι, λευκό και ροζ) και επειδή είναι συνήθως ορατή μόνο από την άνω πλευρά των πετάλων. Η διαβάθμιση του χρώματος (γκρι – λευκό – ροζ) μπορεί να υποδηλώνει είτε ενδιάμεση συγκέντρωση χρωστικής σε σχέση με τη μαύρη και την κόκκινη περιοχή, είτε ταυτόχρονη παρουσία διαφορετικών στρώσεων λευκών κυττάρων και κόκκινων ή μαύρων. Η δεύτερη ερμηνεία μπορεί να εξηγήσει και την ταυτόχρονη παρουσία λευκού χρώματος από την άνω πλευρά και κόκκινου ή μαύρου από την κάτω πλευρά. Η λευκή ζώνη ήταν πολύ λεπτή για να απομονωθεί και να μελετηθεί ξεχωριστά (Εικόνα 3.3).

### 4.2 Οπτικές ιδιότητες άθικτων πετάλων

Οι οπτικές ιδιότητες από άθικτα πέταλα προσεγγίστηκαν πειραματικά με τη σφαίρα ολοκλήρωσης. Τα φάσματα που ελήφθησαν είναι παρόμοια με προηγούμενη μελέτη της κόκκινης περιοχής (Αργυρόπουλος 2009). Όλα τα δείγματα παρουσίασαν μέγιστα απορρόφησης στην υπέρυθη περιοχή που αντιστοιχούν σε ταλαντώσεις των μορίων του νερού (Αργυρόπουλος 2009, Χειμώνα 2015). Οι έγχρωμες περιοχές του άνθους αφορούν στην ορατή περιοχή του φάσματος. Οι καμπύλες απορρόφησης των άθικτων πετάλων εμφανίζουν αρκετές διαφορές συγκριτικά με τις καμπύλες απορρόφησης εκχυλισμάτων χρωστικών. Τόσο για την κόκκινη περιοχή, όσο και για τη μαύρη, η απορρόφηση των άθικτων πετάλων είναι σταθερή και πολύ μεγάλη (>90%) από το εγγύς υπεριώδες (250 nm) έως και το μεγαλύτερο τμήμα του ορατού φάσματος. Εκεί οι καμπύλες απορρόφησης των δύο χρωματικών περιοχών διαφοροποιούνται (Εικόνα 3.32). Η καμπύλη απορρόφησης της κόκκινης περιοχής μειώνεται απότομα περίπου στα 570 nm και μηδενίζεται. Αντιθέτως η καμπύλη απορρόφησης της μαύρης περιοχής αρχίζει να φθίνει περίπου στα 620 nm, αλλά με πολύ μικρότερη κλίση, και δεν μηδενίζεται μέσα στο ορατό. Αυτό αντικατοπτρίζει πλήρως το χρώμα των δύο περιοχών. Στην κόκκινη περιοχή απορροφάται έντονα όλο το ορατό φάσμα, εκτός από το κόκκινο το οποίο δεν απορροφάται σχεδόν καθόλου. Αντιθέτως στη μαύρη περιοχή η απορρόφηση εκτείνεται σε όλο το ορατό φάσμα, με κάποια μικρή μείωση στην περιοχή του κόκκινου.

Η ανάκλαση της άνω επιφάνειας της κόκκινης περιοχής δεν μετρήθηκε αξιόπιστα (Εικόνα 3.17). Ωστόσο υπάρχουν πολύ πρόσφατα ερευνητικά αποτελέσματα (van der Kooi and

Stavenga 2019), καθώς και παλιότερα (Αργυρόπουλος 2009) από τα οποία μπορεί να αντικατασταθεί «χαμένη» καμπύλη ανάκλαση. Συγκεκριμένα αναμένεται να είναι παρόμοια με την καμπύλη ανάκλασης της κάτω επιφάνειας. Επίσης από τις υπόλοιπες μετρήσεις προκύπτει ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις οπτικές ιδιότητες της άνω και της κάτω επιφάνειας του πετάλου. Αντιθέτως υπάρχει εμφανής διαφορά στις οπτικές ιδιότητες ανάμεσα σε κόκκινη και μαύρη περιοχή, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Οι καμπύλες απορρόφησης υποδεικνύουν έντονα την ύπαρξη δομικής συνιστώσας στο χρώμα των ανθέων. Μόνο με δομικά δεδομένα σκέδασης μπορεί να ερμηνευθεί η απορρόφηση στη μαύρη περιοχή σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από 700 nm, διότι σε αυτή την ζώνη δεν υπάρχει απορρόφηση λόγω χρωστικών. Σε αυτά τα μήκη κύματος η απορρόφηση μπορεί να οφείλεται σε σκέδαση λόγω εσωτερικής ανομοιογένειας (van der Kooi *et al.* 2016).

### 4.3 Ηλεκτρονιογραφίες SEM

Οι ηλεκτρονιογραφίες SEM έδειξαν ότι η επιδερμίδα των κυττάρων έχει ανάγλυφο στην κλίμακα των μικρομέτρων. Η περισσότερο λεπτομερειακή μικρομορφολογία της επιδερμίδας κυμαίνεται από τις επιμέρους περιοχές του πετάλου από λιγότερο έως περισσότερο άτακτη δομή (Rhizorouliou *et al.* 2008). Στις περισσότερες περιπτώσεις ήταν εμφανές το επίμηκες σχήμα του κυττάρου με το κυματοειδές πλευρικό κράσπεδο (Rhizorouliou *et al.* 2008, Αργυρόπουλος 2009). Εν γένει παρατηρήθηκε μία δομή της εφυμενίδας που αποτελείται από πυκνές υποκείμενες επιμήκεις ποικίλσεις και από αραιότερες υπερκείμενες εγκάρσιες ποικίλσεις. Αυτές οι ποικίλσεις ανάλογα με την περιοχή μελέτης μπορεί να είναι περισσότερο ή λιγότερο ανεπτυγμένες, περισσότερο ή λιγότερο πυκνές και με περισσότερο ή λιγότερο άτακτη δομή. Σε πολλές περιπτώσεις οι υποκείμενες επιμήκεις ποικίλσεις ήταν συσσωματωμένες προς τον κεντρικό άξονα του κυττάρου. Επίσης σε αρκετές περιπτώσεις, σε πολλά σημεία των κυττάρων δεν είναι σαφής η διάκριση μεταξύ επίμηκων και εγκάρσιων ποικίσεων με βάση τη διαρρύθμιση των ποικίσεων.

Οι δύο επιφάνειες (άνω και κάτω) του πετάλου δεν φαίνεται να εμφανίζουν ιδιαίτερη διαφοροποίηση στη μικρομορφολογία τους, όπως έχει φανεί και από προηγούμενες μελέτες (Αργυρόπουλος 2009). Ωστόσο σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες (Αλεξανδρίδης 2004, Αργυρόπουλος 2009) η κόκκινη περιοχή φάνηκε να έχει εντονότερο ανάγλυφο σε σχέση με τη μαύρη περιοχή. Ενδεχομένως στα τμήματα της μαύρης περιοχής που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη να είχαν αλλοιωθεί οι εφυμενιδιακές ποικίλσεις λόγω χειρισμών. Κάποιες επιπλέον ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις περιλαμβάνουν τον εντοπισμό στομάτων στην άνω και κάτω επιφάνεια, στην κόκκινη και μαύρη περιοχή. Επίσης εντοπίστηκαν κάποιες περίεργες κυκλικές ενδοκυτταρικές δομές στα άκρα κάποιων κυττάρων της κάτω επιφάνειας της μαύρης περιοχής (Εικόνα 3.40). Ένα άλλο ενδιαφέρον σημείο είναι η παρατήρηση λεπτοφυών επιμήκων ποικίσεων επάνω από τις άλλες ποικίλσεις στην κάτω επιφάνεια της κόκκινης περιοχής (Εικόνα 3.51). Οι λεπτοφυείς αυτές ποικίλσεις είναι περιοδικές ή ημι-περιοδικές τις τάξης των μερικών nm και μπορούν δυνητικά να αλληλεπιδράσουν με περιοχή του ορατού φάσματος του φωτός. Σε άλλη περιοχή της άνω επιφάνειας της κόκκινης περιοχής εντοπίστηκε μεγάλη διαφοροποίηση στη μορφολογία και το μικροανάγλυφο γειτονικών ομάδων κυττάρων, υποδηλώνοντας πιθανώς κάποιο υποκείμενο στοιχείο του αγωγού ιστού (Εικόνες 3.33 και 3.34).

Σύμφωνα με απλουστευμένο μοντέλο που διατυπώθηκε για την ανάπτυξη των ποικίσεων (Αντωνίου Kourounioti *et al.* 2013), πιθανώς πρώτα εναποτέθηκε υλικό για τις εγκάρσιες ποικίσεις κατά την επιμήκη κυτταρική αύξηση και στη συνέχεια εναποτέθηκε υλικό για της υποκείμενες επιμήκεις ποικίσεις κατά την πλευρική διόγκωση. Στοιχεία για τη δημιουργία των ποικίσεων και την ανάπτυξη των κυττάρων προσδίδει πιθανώς η παρατήρηση ότι σε αρκετές περιπτώσεις οι εγκάρσιες ποικίσεις συνέπιπταν με την περιοδικότητα του κυματοειδούς κρασπέδου. Ως προς τις οπτικές ιδιότητες του μικροανάγλυφου, δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Είναι γνωστό ότι η δομή συμβάλλει στο χρώμα των πετάλων (Γκίκας 2015). Εκτεταμένες περιοδικές ή ημι-περιοδικές ποικίσεις που θα μπορούσαν να μαρτυρούν δομικό χρώμα δεν παρατηρήθηκαν. Επίσης δεν παρατηρήθηκαν οι «παγίδες φωτός» στη μαύρη περιοχή που είχαν παρατηρηθεί στο παρελθόν (Αλεξανδρίδης 2004). Η παρατήρηση εντονότερου ανάγλυφου στην κόκκινη σε σχέση με τη μαύρη περιοχή αποτελεί ένα ενδιαφέρον στοιχείο που αξίζει περισσότερη διερεύνηση.

#### 4.4 Στοιχειακή ανάλυση EDX

Από τη στοιχειακή ανάλυση τα στοιχεία που μπορεί να παρουσιάζουν κάποιο ενδιαφέρον είναι το μαγνήσιο (Mg), το θείο (S), το κάλιο (K) και το μολυβδαίνιο (Mo). Το θείο εντοπίστηκε μόνο στην κόκκινη περιοχή, παρά την ευρύτατη παρουσία του στις πρωτεΐνες. Ακόμα και στην κόκκινη περιοχή που εντοπίστηκε, η στοιχειακή αναλογία του θείου ήταν κοντά στο όριο ανίχνευσης και πιθανώς στη μαύρη περιοχή να μην μπόρεσε να ανιχνευθεί λόγω περιορισμών της μεθόδου. Το κάλιο εμφανίζει σταθερά μεγαλύτερη συγκέντρωση στη μαύρη περιοχή, αλλά δεν είναι γνωστό αν και κατά πόσο αυτό έχει κάποια σχέση με τη διαφορά στο χρώμα.

Το μαγνήσιο ανιχνεύθηκε σε παρόμοια συγκέντρωση και στους δύο ιστούς. Σε περίπτωση που η συγκέντρωσή του έχει κάποια σχέση με το χρώμα του πετάλου, αυτό μπορεί να σχετίζεται με την παρουσία χλωροφύλλης, με τη σταθεροποίηση των ανθοκυανινών ειδικά σε υψηλότερες θερμοκρασίες, ή με τη συγκρότηση έγχρωμων συμπλόκων με ανθοκυανίνες (Miller *et al.* 2011). Ωστόσο η ποσοτικοποίηση των χλωροφυλλών δεν έδειξε σημαντικές συγκεντρώσεις χλωροφυλλών. Το μολυβδαίνιο που ανιχνεύθηκε μπορεί να οφείλεται σε σφάλμα της μεθόδου γιατί οι δύο από τις τρεις κορυφές του μολυβδαινίου στο φάσμα των ακτίνων Χ συνέπιπτε με τις κορυφές του χλωρίου. Αν και δεν έχει βρεθεί η συμπλοκοποίηση ιόντων μολυβδαινίου με ανθοκυανίνες, είναι γνωστό ότι οι ανθοκυανίνες μπορούν να συμπλοκοποιηθούν, μαζί και με άλλα φλαβονοειδή, με δισθενή ή με συνδυασμό δισθενών και τρισθενών κατιόντων. Μεταξύ των αριθμών οξείδωσης του μολυβδαινίου περιλαμβάνονται οι +2 και +3, και επιπλέον δισθενή κατιόντα μπορούν να σχηματισθούν από το μαγνήσιο.

#### 4.5 Φάσματα εκχύλισης χρωστικών

Το μόνο από τα φάσματα στο οποίο εμφανίζεται έντονη απορρόφηση στην περιοχή του ορατού είναι το φάσμα απορρόφησης σε διαλύτη 80% Μεθανόλη – 1% HCl (Εικόνα 3.63). Είναι γνωστό ότι το χρώμα των ανθοκυανινών σταθεροποιείται σε ισχυρά όξινο pH (Swain 1976). Στον συγκεκριμένο διαλύτη και τα δύο φάσματα – από την κόκκινη και από τη μαύρη



περιοχή – εμφανίζουν μέγιστο απορρόφησης στην περιοχή απορρόφησης των ανθοκυανινών. Η γενική μορφή στις καμπύλες απορρόφησης εμφανίζει παρόμοια μορφή με προηγούμενη μελέτη (Αργυρόπουλος 2009) για το ίδιο είδος και με τον ίδιο διαλύτη. Οι καμπύλες απορρόφησης της κόκκινης και της μαύρης περιοχής για την παρούσα εργασία στον συγκεκριμένο διαλύτη, εμφανίζουν μέτρια απορρόφηση στην περιοχή του κυανού, έντονη απορρόφηση στην περιοχή του πράσινου και ελάχιστη ή καθόλου απορρόφηση στην περιοχή του κόκκινου. Ωστόσο οι καμπύλες που αντιστοιχούν στην κόκκινη και τη μαύρη περιοχή εμφανίζουν τρεις σημαντικές διαφοροποιήσεις. Η πρώτη διαφοροποίηση είναι στη θέση της κορυφής του μεγίστου, η οποία βρίσκεται σε μικρότερο μήκος κύματος για το κόκκινο σε σχέση με το μαύρο. Από αυτό προκύπτει ότι οι επικρατούσες ανθοκυανίνες είναι πελαργονιδίνη ή γλυκοζίτες της ομάδας της κυανιδίνης (κυανιδίνη, παιονιδίνη) για την κόκκινη περιοχή και κυανιδίνη, παιονιδίνη ή γλυκοζίτες της ομάδας της δελφινιδίνης (δελφινιδίνη, πετουνιδίνη, μαλβιδίνη) για τη μαύρη περιοχή (Swain 1974). Αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες (Αλεξανδρίδης 2004, Αργυρόπουλος 2004, 2009). Είναι γνωστό ότι όσο αυξάνεται ο βαθμός υδροξυλίωσης του Β δακτυλίου της ανθοκυανιδίνης, τόσο μεταβάλλεται η απόχρωση της χρωστικής από πορτοκαλί-κόκκινη (πελαργονιδίνη) σε κόκκινο-ματζέντα (ομάδα κυανιδίνης) και μωβ-μπλε (ομάδα δελφινιδίνης).

Η δεύτερη διαφοροποίηση στις καμπύλες των δύο χρωματικών περιοχών είναι η κλίση στην περιοχή γύρω από το μέγιστο. Η κορυφή μεγίστου για την κόκκινη περιοχή είναι πολύ πιο οξεία και «απότομη», ενώ η περιοχή από τη μαύρη περιοχή είναι πιο ευρεία. Όσο πιο οξεία είναι η κλίση γύρω από την κορυφή τόσο πιο έντονος είναι ο κορεσμός, δηλαδή η «καθαρότητα» του χρώματος (van der Kooi *et al.* 2018). Αντιθέτως μια πιο ευρεία κορυφή απορρόφησης υποδηλώνει χρώμα πιο μικρό σε κορεσμό, δηλαδή ένα άτονο χρώμα που τείνει προς το μαύρο. Υπενθυμίζεται ότι η περιοχή του μεγίστου και για τις δύο περιοχές εντοπίζεται στην πράσινη περιοχή του ορατού φάσματος.

Η τρίτη διαφοροποίηση ανάμεσα στις δύο καμπύλες απορρόφησης αφορά στην περιοχή μετάβασης του ορατού φάσματος από το πράσινο στο κόκκινο χρώμα. Στο σημείο αυτό η καμπύλη απορρόφησης της μαύρης περιοχής μειώνεται ήπια και σταδιακά, και η μείωση αυτή συνεχίζεται στο κόκκινη ζώνη του φάσματος. Αντιθέτως η καμπύλη απορρόφησης για την κόκκινη περιοχή εμφανίζει πολύ απότομη μείωση προς το τέλος της ζώνης του πράσινου χρώματος και στη ζώνη του κόκκινου χρώματος δεν εμφανίζει σχεδόν καθόλου απορρόφηση. Αυτά τα στοιχεία της κόκκινης περιοχής, δηλαδή η κυριαρχία πιο ανοιχτόχρωμων ανθοκυανινών, η στενή απορρόφηση μεγάλου κορεσμού χρώματος, η μεγάλη απορρόφηση στη ζώνη του πράσινου (συμπληρωματικό χρώμα του κόκκινου) και η ελάχιστη απορρόφηση στη ζώνη του κόκκινου, συμβάλλουν στο έντονο κόκκινο χρώμα της αντίστοιχης περιοχής του πετάλου. Αντίθετα στη μαύρη περιοχή, η κυριαρχία πιο σκούρων ανθοκυανινών, η πιο ευρεία απορρόφηση μικρού κορεσμού, και η υπαρκτή - αν και μικρή - απορρόφηση στη ζώνη του κόκκινου, συμβάλλουν στο χρώμα της μαύρης περιοχής. Σημειώνεται ότι το εκχύλισμα της συγκεκριμένης περιοχής σε οξιμισμένη μεθανόλη είχε βαθύ μωβ, και όχι μαύρο, χρώμα. Η απορρόφηση από τη μαύρη περιοχή εμφανίζει αρκετά σημεία με plateau γύρω από το μέγιστο, δείχνοντας την ταυτόχρονη παρουσία αρκετών ανθοκυανινών.

Τα φάσματα εκχυλισμάτων σε 100% μεθανόλη (Εικόνα 3.62) και σε 100% αιθανόλη (Εικόνα 3.64), είναι περισσότερο διαφωτιστικά για την περιοχή του υπεριώδους, παρά του ορατού. Στα δύο φάσματα φαίνεται απορρόφηση των εκχυλισμάτων στην περιοχή του υπεριώδους. Η απορρόφηση στο υπεριώδες για τη μαύρη περιοχή παρατηρείται σε μικρότερα μήκη κύματος, σε σχέση με την απορρόφηση της κόκκινης περιοχής. Από τη σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Swain 1976) για την απορρόφηση της υπεριώδους περιοχής, φαίνεται ότι πιθανώς στην κόκκινη περιοχή κυριαρχούν οι φλαβονόλες ενώ στη μαύρη οι φλαβόνες. Οι φλαβόνες και οι φλαβανόλες προέρχονται από το ίδιο μεταβολικό ενδιάμεσο. Από μία φλαβανόνη μπορεί να προκύψει μέσω ενός ενζυμικού βήματος μία φλαβόνη, ή μέσω δύο άλλων ενζυμικών βημάτων μία φλαβονόλη (Schwinn and Cavies 2004). Πιθανώς στην κόκκινη και τη μαύρη περιοχή τα ένζυμα αυτά να παρουσιάζουν διαφορετικές ενεργότητας με αποτέλεσμα να ενισχύεται είτε η σύνθεση φλαβόνης είτε η σύνθεση φλαβονόλης, ανταγωνιστικά μεταξύ τους. Στα φάσματα δεν ανιχνεύθηκαν άλλες κατηγορίες φυτικών χρωστικών όπως αουρόνες, χαλκόνες, καρτενοειδή ή χλωροφύλλες.

#### 4.6 Ανθοκυανίνες

Όπως φάνηκε και από την ποιοτική ανάλυση χρωστικών, αλλά και από την ποσοτικοποίηση των επιμέρους ομάδων, οι ανθοκυανίνες είναι οι μόνη – ή τουλάχιστον η μόνη κύρια – ομάδα χρωστικών του ορατού φάσματος. Με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Hatier and Gould 2007, Thill *et al.* 2012, Li *et al.* 2014, Markham *et al.* 2014, Degushi *et al.* 2016, Lei *et al.* 2017) αναμένεται να υπάρχει μεγαλύτερη συγκέντρωση ανθοκυανινών στον μαύρο ιστό. Ωστόσο κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε σε καμία από τις ημερομηνίες συλλογής. Σημειώνεται ότι ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν από τους πιο κοινούς για την εκχύλιση των ανθοκυανινών. Επιπρόσθετα, ενώ η συγκέντρωση των ανθοκυανινών ανά ξηρό βάρος μειώνεται αισθητά προς το τέλος της ανθοφορίας, τα επίπεδά τους στη μαύρη περιοχή είναι σταθερά (επιλέχθηκε η συγκέντρωση ανά ξηρό και όχι ανά νωπό βάρος για να μην επηρεάζεται από διακυμάνσεις της υδατοπεριεκτικότητας του ιστού). Επομένως πρέπει να υπάρχει κάποιος άλλος μηχανισμός που να εξηγεί το μαύρο χρώμα, και όχι η μεγάλη απόλυτη συγκέντρωση ολικών ανθοκυανινών.

Σχετικά με την εποχική διακύμανση των ανθοκυανινών (Εικόνα 3.67), παρατηρείται – όπως αναφέρθηκε – μείωσή τους προς το τέλος της ανθοφορίας, μόνο για την κόκκινη περιοχή. Αυτή η μείωση μπορεί να οφείλεται σε μειωμένη βιοσύνθεση ή σε αυξημένη αποικοδόμησή τους. Κατά την τελευταία συλλογή ανθέων (4/5/2018) από το πεδίο παρατηρήθηκε ότι πολλά πέταλα βρίσκονταν αποκολλούνταν πολύ εύκολα από τη στεφάνη. Αυτό ενδεχομένως υποδηλώνει ότι πολλά από τα άνθη που συλλέχθηκαν βρίσκονταν στο τέλος της ανθοφορίας τους (Rhizoroulou and Pantazi 2015). Υπενθυμίζεται ότι η διάρκεια ζωής ενός άνθους είναι περίπου μία ημέρα. Στα άνθη αυτά που βρίσκονταν στο τέλος της περιόδου ανθοφορίας της παπαρούνας *Papaver rhoeas*, πιθανώς να αναμένονται διαδικασίες αποδόμησης των χρωστικών τους. Η ίδια μειωτική τάση φαίνεται και στις φλαβόνες και φλαβονόλες, αλλά εκεί η μείωση είναι πιο εμφανής από νωρίτερα. Ενδεχομένως η γενικότερη αύξηση της περιβαλλοντικής θερμοκρασίας να μείωσε με κάποιο τρόπο τη βιοσύνθεση των χρωστικών, π.χ. μέσω επίδρασης στην ενεργότητα κάποιων ενζύμων, (ή να αύξησε την αποικοδόμησή τους). Εναλλακτικά ενδεχομένως

ενισχύθηκε κάποια διαφορετική βιοσυνθετική οδός, η οποία έδρασε ανταγωνιστικά προς την οδό βιοσύνθεσης των ανθοκυανινών.

Η συμπεριφορά των ανθοκυανινών στη μαύρη περιοχή εμφανίζει διαφορετικό πρότυπο. Εμφανίζεται σταθερότητα στη συγκέντρωση ανεξάρτητα από τη χρονική περίοδο. Ενδεχομένως οι ανθοκυανίνες αυτές να σχηματίζουν σύμπλοκα με συγχρωστικές ή μεταλλικά ιόντα σχηματίζοντας υπερομοριακές δομές καθιστώντας τα πιο δυσπρόσιτα κατά τη διαδικασία της ενζυματικής αποικοδόμησης. Επίσης μπορεί να βρίσκονται συνδεδεμένες με πρωτεΐνες σχηματίζοντας χυμοτοπιακά σύμπλοκα ανθοκυανίνης (AVIs) – τα οποία μπορεί να επιφέρουν διαφοροποιήσεις και στο χρωματικό αποτέλεσμα – καθιστώντας τες και πάλι πιο δυσπρόσιτες σε ένζυμα αποικοδόμησης. Αυτή η υπόθεση θα μπορούσε ίσως να εξηγήσει τη δυσκολία στην εκχύλιση των χρωστικών στη μαύρη περιοχή και επομένως πιθανή υποεκτίμηση της συγκέντρωσής τους. Συμπυκνωμένες δομές ανθοκυανινών έχουν παρατηρηθεί σποραδικά και στα επιδερμικά κύτταρα της κόκκινης περιοχής των πετάλων (Αργυρόπουλος 2009). Αντί αυτών των υποθέσεων μπορεί απλά σήματα για αυξημένη αποικοδόμηση ή/και μειωμένη βιοσύνθεση ανθοκυανινών της κόκκινης περιοχής, να μην έχουν δοθεί στους ιστούς της μαύρης περιοχής. Είναι γνωστό ότι στα κύτταρα με δίχρωμα πέταλα υπάρχει διαφορετική ρύθμιση των μεταβολικών οδών των χρωστικών, εξ ου και το διαφορετικό τους χρώμα (Glover *et al.* 2013).

#### 4.7 Φλαβόνες και φλαβονόλες

Μελετήθηκε η εποχική διακύμανση των «ολικών φλαβονοειδών» ή όπως θα ήταν πιο ακριβές των ολικών φλαβονών και φλαβονολών. Από το γενικό φάσμα απορρόφησης των εκχυλισμάτων χρωστικών εικάζεται ότι στη μαύρη περιοχή κυριαρχούν οι φλαβόνες, ενώ στην κόκκινη κυριαρχούν οι φλαβονόλες. Το γενικό πρότυπο εποχικής διακύμανσής (Εικόνα 3.69) τους είναι παρόμοιο με το πρότυπο των ολικών ανθοκυανινών, αλλά όχι ακριβώς ίδιο. Δηλαδή, οι φλαβόνες και φλαβονόλες της κόκκινης περιοχής φθίνουν διαρκώς κατά τη διάρκεια της ανθοφορίας, και με αυξανόμενο τάχος, ενώ οι φλαβόνες και φλαβονόλες της μαύρης περιοχής παραμένουν σε σταθερή συγκέντρωση. Η μείωση αυτή στη συγκέντρωση των φλαβονών και φλαβονολών για την κόκκινη περιοχή πιθανώς οφείλεται σε μειωμένη βιοσύνθεση ή/και αυξημένη αποικοδόμησή τους. Πιθανότατα τα σήματα για αυτή τη διαφοροποίηση της δραστηριότητας των μεταβολικών οδών των καροτενοειδών, να διαφέρουν μεταξύ της κόκκινης και της μαύρης περιοχής. Εναλλακτικά, η διαφοροποίηση αυτή μπορεί να διαφέρει για τις φλαβόνες και τις φλαβονόλες, οι οποίες κυριαρχούν στη μαύρη και την κόκκινη περιοχή αντίστοιχα.

Οι φλαβόνες και φλαβονόλες της μαύρης περιοχής πιθανώς είναι πιο ανθεκτικές στην αποικοδόμηση επειδή μπορεί να σχηματίζουν σύμπλοκα με ανθοκυανίνες σχηματίζοντας πιο σύνθετες υπερομοριακές δομές (Lee 2007). Ωστόσο αυτό το φαινόμενο, δηλαδή η δράση των φλαβονών και φλαβονολών ως συγχρωστικών, δεν φαίνεται να ερμηνεύει το χρώμα της μαύρης περιοχής, σε αντίθεση με άλλες περιπτώσεις (Thill *et al.* 2012, Markham *et al.* 2014, Lei *et al.* 2017). Στις περιπτώσεις στις οποίες οι συγχρωστικές έχουν μείζονα ρόλο για το μαύρο χρώμα του άνθους, παρατηρείται συνήθως αρκετά μεγαλύτερη συγκέντρωση στις συγχρωστικές σε σχέση με τη συγκέντρωση των ανθοκυανινών. Η μικρή συγκέντρωση φλαβονών και φλαβονολών στη μαύρη περιοχή των πετάλων του *P. rhoeas*, δεν αποκλείει

τη δράση τους ως συγχρωστικές, αλλά καθιστά αμφίβολη την καθοριστική σημασία τους για τη δημιουργία του μαύρου χρώματος.

Οι φλαβόνες και φλαβονόλες της μαύρης περιοχής εμφανίζουν σαφώς μεγαλύτερη δυνατότητα εκχύλισης με τον διαλύτη 80% αιθανόλη, σε σχέση με τον διαλύτη 100% αιθανόλη. Αντιθέτως οι φλαβόνες και φλαβονόλες της κόκκινης περιοχής εμφανίζουν παρόμοιο βαθμό εκχύλισης και στους δύο διαλύτες. Αυτή η διαφοροποίηση αποτελεί πιθανώς ένδειξη ότι οι φλαβόνες και φλαβονόλες της μαύρης περιοχής είτε είναι πιο ισχυρά προσδεμένες στον ιστό (π.χ. σε υπερμοριακά σύμπλοκα), είτε είναι πιο υδρόφιλες (π.χ. περισσότερο υποκατεστημένες με σάκχαρα και μικρά οργανικά όξέα) σε σχέση με τις φλαβόνες και φλαβονόλες της κόκκινης περιοχής.

#### 4.8 Χλωροφύλλες και καροτενοειδή

Τα γενικά φάσματα απορρόφησης των εκχυλισμάτων χρωστικών δεν έδειξαν μέγιστα σε θέσεις που θα υποδείκνυαν σημαντική συγκέντρωση χλωροφυλλών και καροτενοειδών. Έχει βρεθεί ότι η παρουσία χλωροφυλλών μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά στο μαύρο χρώμα (Hatier and Gould 2007), καθώς και τα καροτενοειδή μπορούν να συμβάλλουν σημαντικά στο κόκκινο χρώμα (Ng and Smith 2016), αλλά τίποτα από τα δύο δεν φαίνεται να συμβαίνει στην περίπτωση των πετάλων του *P. rhoeas*. Για την ποσοτικοποίηση της χλωροφύλλης α, της χλωροφύλλης β και των ολικών καροτενοειδών χρησιμοποιήθηκαν δύο διαλύτες εκχύλισης (100% ακετόνη και διαιθυλαιθέρας) για να μεγιστοποιηθούν οι πιθανότητες εκχύλισης στην περίπτωση παρουσίας των χρωστικών στον ιστό. Ωστόσο οι απορροφήσεις που ελήφθησαν ήταν μικρές και οι τελικές συγκεντρώσεις της τάξης των mg/g ξηρού βάρους. Επομένως ακόμα και αν αυτές οι χρωστικές υπάρχουν σε ίχνη στους ιστούς, δεν συνεισφέρουν εμφανώς στο χρωματικό αποτέλεσμα. Τα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις των χρωστικών διέφεραν ανάλογα με τον διαλύτη εκχύλισης (ακετόνη ή διαιθυλαιθέρας) που χρησιμοποιήθηκε.

#### 4.9 Γενικά συμπεράσματα για τις οπτικές ιδιότητες

Οι οπτικές ιδιότητες των πετάλων του *P. rhoeas*, και ιδιαίτερα η βιοχημική/οπτική αιτία της διαφοροποίησης του χρώματος μεταξύ των περιοχών του πετάλου, αποτελεί ένα πεδίο που χρήζει ακόμα μελέτης για να εξαχθούν συμπεράσματα. Είναι αρκετά εμφανές ότι υπάρχει έντονη δομική συνιστώσα στο χρώμα των πετάλων – και στην κόκκινη και στη μαύρη περιοχή των πετάλων – όπως προκύπτει από τη σύγκριση των φασμάτων απορρόφησης άθικτων πετάλων καθώς και εκχυλισμένων χρωστικών. Είναι γνωστό ότι τα πέταλα του *P. rhoeas* είναι λεπτά, με πολύ εκτεταμένους μεσοκυττάριους χώρους στο μεσόφυλλο (Αργυρόπουλος 2009, van der Kooi and Stavenga 2019). Υπάρχει η υπόθεση ότι υφίσταται στρατηγική κατά την οποία τα πολύ λεπτά πέταλα χαρακτηρίζονται από αυξημένη σκέδαση, και με αυτόν τον τρόπο αντισταθμίζεται το μικρό τους πάχος ως προς την ανάδειξη του χρώματος (van der Kooi *et al.* 2016). Η παρουσία μεσοκυττάριων χώρων είναι γνωστό ότι αυξάνει τη διαφορά στους δείκτες διάθλασης στο εσωτερικό του πετάλου. Το αποτέλεσμα είναι να μεταβάλλεται η πορεία των ακτίνων φωτός μέσα στο πέταλο, και όταν οι μεσοκυττάριοι χώροι περιβάλλονται από χρωστικές (ανθοκυανίνες στις επιδερμίδες) το χρώμα γίνεται εντονότερο λόγω αλληλεπίδρασης φωτός και χρωστικών (Lee 2007,

Argiropoulos and Rhizoroulou 2012a). Ενδεχομένως να συμβαίνει κάτι τέτοιο και στην περίπτωση που μελετάται, δηλαδή η συγκέντρωση των χρωστικών στις επιδερμίδες γύρω από τους εκτενείς μεσοκυττάριους χώρους να εντείνει το χρωματικό αποτέλεσμα, τόσο στη μαύρη όσο και στην κόκκινη περιοχή (van der Kooi and Stavenga 2019).

Στη μαύρη περιοχή η μελέτη οπτικών ιδιοτήτων σε νωπούς ιστούς που έδειξε απορρόφηση σε μήκος κύματος  $>700$  nm πιθανώς υποδεικνύει σκέδαση λόγω εσωτερικής ανομοιογένειας (van der Kooi *et al.* 2016) και να λειτουργεί σαν «παγίδα φωτός». Ως ανομοιομορφία πιθανώς υπάρχουν κοκκία συμπυκνωμένων ανθοκυανινών (χυμοτοπιακά έγκλειστα ανθοκυανίνης), καθώς αντίστοιχες δομές έχουν εντοπιστεί στην κόκκινη περιοχή (Αργυρόπουλος 2009). Αν ισχύει μια τέτοια υπόθεση, τότε πιθανώς εξηγείται η δυσκολία εξαγωγής των χρωστικών από τη μαύρη περιοχή, συγκριτικά με την κόκκινη περιοχή. Επιπρόσθετο σημείο σκέδασης του φωτός αποτελούν πιθανώς το κυματοειδές κράσπεδο των επιδερμικών κυττάρων (van der Kooi and Stavenga 2019).

Σχετικά με τις ηλεκτρονιογραφίες SEM, δεν εντοπίστηκαν δομές ικανές να παράγουν δομικό χρώμα, και οι δομές που παρατηρήθηκαν δεν μπορούν να συσχετισθούν άμεσα με το οπτικό αποτέλεσμα. Εξάιρεση αποτελεί ίσως μία μικρή κυρτότητα των κυττάρων που πιθανώς συγκεντρώνει τις ακτίνες φωτός (Αργυρόπουλος 2009, Gkikas *et al.* 2015). Σχετικά με τη μελέτη των χρωστικών φαίνεται ότι το μαύρο χρώμα δεν οφείλεται σε μεγάλη συγκέντρωση ανθοκυανινών, αλλά σε μεγαλύτερη ποικιλία ανθοκυανινών που καλύπτουν μεγαλύτερη περιοχή του ορατού φάσματος, και περιορισμένη, ίσως, δράση άλλων φλαβονοειδών ως συγχρωστικών.

#### 4.10 Προτάσεις για περαιτέρω διερεύνηση

Για την περαιτέρω μελέτη του θέματος μια από τις προτάσεις θα ήταν η προσεκτική παρατήρηση της κόκκινης και της μαύρης περιοχής σε οπτικό μικροσκόπιο. Η παρατήρηση θα μπορούσε να γίνει σε παραδερμική τομή για την παρατήρηση πιθανών σωματιδίων συμπυκνωμένων ανθοκυανινών. Επιπλέον θα μπορούσε να γίνει παρατήρηση εγκάρσια μονιμοποιημένη τομή και εφαρμογή μοντέλου πρόβλεψης της πορείας των ακτίνων φωτός σε αυτή, με σκοπό τη διαπίστωση της σκέδασής τους από τους μεσοκυττάριους χώρους και της εστίασής τους από τα επιδερμικά κύτταρα. Ένας ακόμα τρόπος για τη διαπίστωση του ρόλου των μεσοκυττάριων χώρων είναι η μελέτη των οπτικών ιδιοτήτων του πετάλου αφού έχει γίνει πλήρωση των μεσοκυττάριων χώρων με νερό. Για την προσεκτικότερη μελέτη της τοπογραφίας της επιφάνειας προτείνονται περισσότερες μελέτες με SEM, και ενδεχομένως με AFM (Atomic Force Microscope – Μικροσκόπιο Ατομικής Διακριτικότητας). Αυτή η μελέτη πιθανώς να ήταν καλό να είναι ειδικά ανάλογα με τις μικροπεριοχές του πετάλου (π.χ. νεύρωση, άκρες του πετάλου, κύτταρα λευκής ζώνης). Σχετικά με την αποτελεσματικότερη ποσοτικοποίηση των χρωστικών προτείνεται η χρήση διαφορετικών διαλυτών εκχύλισης (και κυρίως διαφορετικές αναλογίες διαλύτη και νερού), ώστε να βρεθεί ο καταλληλότερος. Τέλος, σχετικά με τη διερεύνηση στοιχείων όπως το μολυβδαίνιο, προτείνεται η εφαρμογή αναλυτικής μεθόδου στοιχειακής ανάλυσης περισσότερο ευαίσθητης σε συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων. Ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η συγκριτική μελέτη πετάλων ανθέων που δεν έχουν εκπτυχθεί ακόμα πλήρως, αλλά βρίσκονται στο στάδιο της ανάπτυξής τους και της διαμόρφωσης του χρωματικού προτύπου τους.

## 6. Βιβλιογραφία

- Andersen OM and Jordheim M. 2006. The anthocyanins. In: *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, O.M. Andersen and K.R. Markham eds., Taylor & Francis Group, pp. 471-552.
- Antoniou Kourounioti RL, Band LR, Fozard JA, Hampstead A, Lovrics A, Moyroud E, Vignolini S, King JR, Jensen OE and Glover B. 2013. Buckling as an origin of ordered cuticular patterns in flower petals. *Journal of the Royal Society Interface*, 10: 20120847.
- Argiropoulos A and Rhizopoulou S. 2012a. Micromorphology of the petals of the invasive weed, *Oxalis pes-caprae*. *Weed Biology and Management*, 12 (1): 47-52.
- Argiropoulos A and Rhizopoulou S. 2012b. Topography and nanosculpture of petals' surfaces of short-lived flowers of the wild species *Cistus creticus*, *Cistus salviifolius*, *Eruca sativa* and *Sinapis arvensis*. *Botanical Studies*, 53 (4): 479-488.
- Argiropoulos A and Rhizopoulou S. 2013. Morphological features of petals of *Nerium oleander* L. *Plant Biosystems – An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 147 (3): 638-644.
- Argiropoulos A, Spanakis E and Rhizopoulou S. 2017. Functional micromorphology of petals of *Chaenomeles japonica* exposed to humid and cold season. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39 (11): 246.
- Bailey MP. 2016. Pigments: going beyond black and white. *Chemical Engineering*, 123 (8): 16-20.
- Ball P. 2016. None more black. *Nature Materials*, 15 (5): 500.
- Bercu R. 2012. Histoanatomical aspects of the vegetative organs of *Papaver rhoeas* L. *Annals of RSCB*, 17 (2): 186-191.
- Bernath J and Nemeth E. 1999. Biology of poppy, physiological-ecological aspects. In: *Poppy, The Genus Papaver*, J. Bernath ed., Harwood Academic Publishers, pp. 65-91.
- Boden SA, Asadollahbaik A, Rutt HN, Bagnall DM. 2012. Helium ion microscopy of lepidoptera scales. *Scanning*, 34 (2): 107-120.
- Bosch J, Retana J and Cerda X. 1997. Flowering phenology, floral traits and pollinator composition in a herbaceous Mediterranean plant community. *Oecologia*, 109: 583-591.
- Bozzola JJ. 2007a. Conventional specimen preparation techniques for transmission electron microscopy of cultured cells. In: *Electron Microscopy Methods and Protocols* (Second Edition), J. Kuo ed., Humana Press, Totowa New Jersey, pp. 1-18.
- Bozzola JJ. 2007b. Conventional specimen preparation techniques for scanning electron microscopy of biological specimens. In: *Electron Microscopy Methods and Protocols* (Second Edition), J. Kuo ed., Humana Press, Totowa New Jersey, pp. 449-466.
- Brainard DH. 2003. Color appearance and color difference specification. In: *The Science of Color*, S.K. Shevell, ed., Optical Society of America – Elsevier, pp. 191-216.
- Capolan J, Hook I, Chase M, Kadereit J and Hodkinson T. 2006. Phylogenetics of *Papaver* and related genera based on DNA sequences from ITS nuclear ribosomal DNA and plastid trnL intron and trnL-F Intragenic Spacers. *Annals of Botany*, 98: 141-155.
- Cartwright J. 2015. Fifty shades of black. *Physics World*, 28 (11): 25-28.



- Castaneda-Ovando A, de Lourdes Pacheco-Hernandez Ma, Paez-Hernandez MaE, Rodriguez JA and Galan-Vidal CA. 2009. Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chemistry*, 113: 859-871.
- Chandler CJ, Wilts BD, Brodie J and Vignolini S. 2017. Structural color in marine algae. *Advanced Optical Materials*, 5 (5): 201600646.
- Chang C-C, Yang M-H, Wen H-M and Chern J-C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug analysis*, 10 (3): 178-182.
- Chimona C, Stamellou A, Argiropoulos A and Rhizopoulou S. 2012. Study of variegated and white flower petals of *Capparis spinosa* expanded at dusk and arid landscapes. *Journal of Arid Land*, 4 (2): 171-179.
- Chimona C, Koukos D, Meletiou-Christou M-S, Spanakis E, Argiropoulos A and Rhizopoulou S. 2018. Functional traits of floral and leaf surfaces of the early flowering *Asphodelus ramosus* in the Mediterranean region. *Flora*, 248: 10-21.
- Christie RM. 2001. *Colour Chemistry*, ed. Royal Society of Chemistry, Manchester.
- Cresti M, Milanesi C, Salvatici P and Van Aelst AC. 1990. Ultrastructure observations of *Papaver rhoeas* mature pollen grains. *Botanica Acta*, 103 (4): 349-354.
- Cuttriss A and Pogson B. 2004. Carotenoids. In: *Plant Pigments and their manipulation*, K. Davies ed., Blackwell Publishing, pp. 57-91.
- Cvek J, Medic-Saric m, Jasprica I, Zubcic S, Vitali D, Mornar A, Vedrina-Dragojevic I and Tomic S. 2007. Optimisation of an extraction procedure and chemical characterisation of Croatian propolis tinctures. *Phytochemical Analysis*, 18: 451-459
- Dafni A, Bernhardt P, Shmida A, Ivri Y, Greenbaum S, O'Toole C and Losito L. 1990. Red bowl-shaped flowers: convergence for beetle pollination in the Mediterranean. *Israel Journal of Botany*, 39 (1-2): 81-92.
- Davies BH. 1976. Carotenoids. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments Volume 2*, T.W. Goodwin ed., Academic Press pp. 38-165.
- Davies KM. 2004a. An introduction to plant pigments in biology and commerce. In: *Plant Pigments and their manipulation*, K. Davies ed., Blackwell Publishing, pp. 1-22.
- Davies KM. 2004b. Important rare plant pigments. In: *Plant Pigments and their manipulation*, K. Davies ed., Blackwell Publishing, pp. 214-247.
- Deguchi A, Tatsuzawa F, Hosokawa M, Doi M and Ohno S. 2016. Quantitative evaluation of the contribution of four major anthocyanins to black flower coloring of dahlia petals. *The Horticulture Journal*, 85 (4): 340-350.
- Egerton RF. 2005. *Physical Principles of Electron Microscopy. An Introduction to TEM, SEM and AEM*, Springer.
- Ellestad GA. 2006. Structure and chiroptical properties of supramolecular flower pigments. *Chirality*, 18 (2): 134-144.
- Feng L, Zhang Y, Li M, Zheng Y, Shen Y and Jiang L. 2010. The structural color of red rose petals and their duplicates. *Langmuir*, 26 (18): 14885-14888.
- Fernandez-Segura E and Warley A. 2008. Electron probe X-ray microanalysis for the study of cell physiology. In: *Introduction to Electron Microscopy for Biologists*, T.D. Allen ed., Elsevier, pp. 19-43.

- Frey B. 2007. Botanical X-ray microanalysis in cryoscanning electron microscopy. In: *Electron Microscopy Methods and Protocols* (Second Edition), J. Kuo ed., Humana Press, Totowa New Jersey, pp. 529-541.
- Fritz B, Hünig R, Schmager R, Hetterich M, Lemmer U and Gomard G. 2017. Assessing the influence of structural disorder on the plant epidermal cells' optical properties: a numerical analysis. *Bioinspiration & Biomimetics*, 12 (3): 036011.
- Ghoshooni H and Sahraei H. 2014. Pharmacological properties of *Papaver rhoeas* L. *Annual Research & Review in Biology*. 4 (24): 4445-4449.
- Giusti MM and Wrolstad RE. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*: F1.2.1-F.1.2.13.
- Gkikas D, Argiropoulos A and Rhizopoulou S. 2015. Epidermal focusing of light and modeling of reflectance in floral-petals with conically shaped epidermal cells. *Flora*, 212: 38-45.
- Glover BJ. 2014. *Understanding Flowers and Flowering*, B.J. Glover ed., Oxford University Press, New York.
- Glover BJ and Whitney HM. 2010. Structural colour and iridescence in plants: the poorly studied relations of pigment colour. *Annals of Botany*, 105 (4): 505-511.
- Glover BJ and Martin C. 2012. Anthocyanins. *Current Biology*, 22 (5): R147-R150.
- Glover B, Moyroud E and Vignolini S. 2012. Modelling the formation of diffraction gratings on top of iridescent petal epidermis. *The 5<sup>th</sup> Mathematics in the Plant Sciences Study Group (MPSSG V) at the University of Nottingham*.
- Glover BJ, Walker RH, Moyroud E and Brockington SF. 2013. How to spot a flower. *New Phytologist*, 197 (3): 687-689.
- Gomez BL and Nosanchuk JD. 2003. Melanin and fungi. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 16 (2): 91-96.
- Gordon PF and Gregory P. 1987. *Organic Chemistry in Colour*, ed. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Gorton HL and Vogelmann TC. 1996. Effects of epidermal cell shape and pigmentation of *Antirrhinum* petals at visible and ultraviolet wavelengths. *Plant Physiology*, 112 (3): 879-888.
- Goto T and Kondo T. 1991. Structure and molecular stacking of anthocyanins – flower color variation. *Angewandte Chemie International Edition*, 30 (1): 17-33.
- Gould KS and Lee DW. 1996. Physical and ultrastructural basis of blue leaf iridescence in four Malaysian understory plants. *American Journal of Botany*, 83 (1): 45-50.
- Grotewold E. 2006. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 61-80.
- Han Z, Li B, Mu Z, Yang M, Niu S, Zhang J and Ren L. 2015. An ingenious super light trapping surface templated from butterfly wing scales. *Nanoscale Research Letters*, 10 (1): 344.
- Harborne JB. 1984. *Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Springer Dordrecht.
- Harris S. 2018. Corn Poppy, <https://herbaria.plants.ox.ac.uk/bol/plants400/Profiles/op/Papaverr>.

- Hatier J-HB and Gould KS. 2007. Black coloration in leaves of *Ophiopogon planiscapus* - 'Nigrescens'. Leaf optics, chromaticity, and internal light gradients. *Functional Plant Biology*, 34 (2): 130-138.
- Hatier J-HB, Clearwater MJ and Gould KS. 2013. The functional significance of black-pigmented leaves: photosynthesis, photoprotection and productivity in *Ophiopogon planiscapus* 'Nigrescens'. *PLOS ONE*, 8 (6): 1-13
- Heldt H-W and Piechulla B. 2011. *Plant Biochemistry* (Fourth Edition). Academic Press – Elsevier.
- Hill HZ. 1992. The function of melanin or six blind people examine an elephant. *Bioassays*, 14 (1): 49-56.
- Hodson MJ. 2000. Microanalysis, In: *Methods in Plant Electron Microscopy and Cytochemistry*, W.V. Dashek ed., Humana Press, Totowa New Jersey, pp. 263-278.
- Holden M. 1976. Chlorophylls. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* Volume 2, T.W. Goodwin ed., Academic Press pp. 1-37.
- Hopwood D. 1969. Fixatives and fixation: a review. *Histochemical Journal*, 1 (4): 323-360.
- Hosaka H, Mizuno T and Iwashina T. 2012, Flavonoid pigments and color expression in the flowers of black hollyhock (*Alcea rosea* 'Nigra'). *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B* 38 (2): 69-75.
- Iwashina T. 2000. The structure and distribution of flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, 113 (3): 287-299.
- Jeffree CE. 2006. The fine structure of the plant cuticle. In: *Biology of the Plant Cuticle*, M. Riederer and C. Müller eds., Blackwell Publishing, pp. 11-125.
- Jeffrey SW and Humphrey GF. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c<sub>1</sub> and c<sub>2</sub> in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie Pflanzen*, 167 (2): 191-194.
- Kadereit J. 1990. Some suggestions on the geographical origin of the central, west and north European synantropic species of *Papaver* L. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 103 (3): 221-231.
- Kadereit JW. 2002. Papaveraceae, In: *Flora Hellenica* (Volume two), A. Strid and K. Tan eds., A. R. G. Gartner Verlag K. G.
- Karlsson L and Milberg P. 2007. A comparative study of germination ecology of four *Papaver* taxa. *Annals of Botany*, 99 (5): 935-946.
- Kinoshita S and Yoshioka S. 2005. Structural colors in nature: the role of regularity and irregularity in the structure. *ChemPhysChem*, 6 (8): 1442-1459.
- Kinoshita S, Yoshioka S and Miyazaki J. 2008. Physics of structural colors. *Reports on Progress in Physics*, 71 (7): 076401.
- Kolle M. 2011. Structural colours in nature. In: *Photonic Structures Inspired by Nature*, M. Kolle ed., Springer-Verlag, pp. 29-56.
- Kumar JB and Kumar MS. 2013. A general idea about phytomelanin layer in some Compositae. *Indian Journal of Plant Science*, 2 (4): 44-48.
- Kuo J. 2007. Processing plant tissues for ultrastructural study. In: *Electron Microscopy Methods and Protocols* (Second Edition), J. Kuo ed., Humana Press, Totowa New Jersey, pp. 35-46.
- Lee D. 2007. *Nature's Palette, The Science of Plant Color*, The University of Chicago Press, Chicago.

- Lee DW. 2009. Plant tissue optics: micro- and nanostructures. *Biomimetics and Bioinspiration* R. J. Martin-Palma and A. Lakhtakia eds., *Proceedings of SPIE*, Vol. 7401.
- Lee J, Durst RW and Wrolstad RE. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: a collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88 (5): 1269-1278.
- Lewin RA. 2006. Black algae. *Journal of Applied Phycology*, 18 (6): 699-702.
- Li Q, Wang J, Sun H-Y and Shang X. 2014. Flower color patterning in pansy (*Viola x wittrockiana* Gams.) is caused by the differential expression of three genes from the anthocyanic pathway in acyanic and cyanic flower areas. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84: 134-141.
- Lichtenthaler HK and Wellburn AR. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Acta*, 11: 591-592.
- Lichtenthaler HK and Buschmann C. 2001a. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-Vis Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1 (1): F4.3.1.-F4.3.8.
- Lichtenthaler HK and Buschmann C. 2001b. Extraction of photosynthetic tissues: chlorophylls and carotenoids. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*: F4.2.1.-F4.2.6.
- Markham KR, Gould KS, Winefield CS, Mitchell KA, Bloor SJ and Boase MR. 2000. Anthocyanin vacuolar inclusions - their nature and significance in flower colouration. *Phytochemistry*, 55 (4): 327-336.
- Markham KR, Bloor SJ, Nicholson R, Rivera R, Shemluck M, Kevan PG and Michener C. 2004. Black flower coloration in wild *Lisianthus nigrescens*: its chemistry and ecological consequences. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59 (9): 625-630.
- Mascorro JA and Bozzola JJ. 2007. Processing biological tissues for ultrastructural study. In: *Electron Microscopy Methods and Protocols* (Second Edition), J. Kuo ed., Humana Press, Totowa New Jersey, pp. 19-34.
- McCoy DE, Feo T, Harvey TA and Prum RO. 2018. Structural absorption by barbules microstructures of super black bird of paradise feathers. *Nature communications*, 9: 1 doi: 10.1038/s41467-017-02088-w.
- McNaughton IH and Harper JL. 1964. *Papaver* L. *Journal of Ecology*, 52 (3): 767-793.
- Mihalik E. 1999. Biology of poppy, taxonomy. In: *Poppy, The Genus Papaver*, J. Bernath ed., Harwood Academic Publishers, pp. 7-46.
- Mihalik E and Petri G. 1999. Biology of poppy, morphological-anatomical aspects. In: *Poppy, The Genus Papaver*, J. Bernath ed., Harwood Academic Publishers, pp. 47-63.
- Miller R, Owens SJ and Rorslett B. 2011. Plants and colour: flowers and pollination. *Optics & Laser Technology*, 43 (2): 282-294.
- Mitich LW. 2000. Corn Poppy (*Papaver rhoeas* L.). *Weed Technology*, 14 (4): 826-829.
- Mlodzinska E. 2009. Survey of plant pigments: molecular and environmental determinants of plant colors. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 51 (1): 7-16.
- Morehouse NI and Rutowski RL. 2009. Comment on 'floral iridescence, produced by diffractive optics, acts as a cue for animal pollinators'. *Science*, 325 (5944): 1072.

- Moyroud E and Glover BJ. 2016. The physics of pollinator attraction. *New Phytologist*, 216 (2): 350-354.
- Müller C and Riederer M. 2005. Plant surface properties in chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology*, 31 (11): 2621-2651.
- Nassau K. 1983. *The Physics and Chemistry of Color*, ed. John Wiley & Sons, Canada.
- Nassau K. 2003. The physics and chemistry of color: the 15 mechanisms. In: *The Science of Color*, S.K. Shevell, ed., Optical Society of America – Elsevier, pp. 247-280.
- Ng J and Smith SD. 2016. How to make a red flower: the combinational effect of pigments. *AoB Plants*, 8: doi: 10.1093/aobpla/plw013.
- Orna MV. 2013. *The Chemical History of Color*, ed. Springer.
- Parker AR. 1998. The diversity and implications of animal structural colours. *The Journal of Experimental Biology*, 201 (16): 2343-2347.
- Paroti VT, Xystouris S, Papagianni G and Tsimidou MZ. 2011. “Total flavonoid” content assesment via aluminium [Al(III)] complexation reactions. what we really measure?. *Italian Journal of Food Science*, 23 (2): 251-259.
- Pekal A and Pyrzynska K. 2014. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*, 7 (9): 1772-1782.
- Perkowitz S. 2016. Paint it nanoblack. *Physics World*, 29 (3): 48.
- Porra RJ. 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research*, 73 (1-3): 149-156.
- Rhizopoulou S, Argiropoulos A, Spanakis E, Gikas D, Alexandredes N, Koukos D and Anglos D. 2008. Visual perception of colourful petals reminds us of classical fragments. *Nature Proceedings*, hdl:10101/npre.2008.1523.1.
- Rhizopoulou S and Pantazi H. 2015. Constraints on floral water status of successively blossoming Mediterranean plants under natural conditions. *Acta Botanica Gallica*, 162 (1): 97-102.
- Rhizopoulou S, Spanakis E and Argiropoulos A. 2015. Study of the petal topography of *Lysimachia arvensis* grown under natural conditions. *Acta Botanica Gallica*, 162 (4): 355-364.
- Riley PA. 1997. Melanin. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 29 (11): 1235-1239.
- Ritchie RJ. 2008. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol or ethanol solvents. *Photosynthetica*, 46 (1): 115-126.
- Roomans GM and Dragomir A. 2007. X-ray microanalysis in the scanning electron microscope. In: *Electron Microscopy Methods and Protocols* (Second Edition), J. Kuo ed., Humana Press, Totowa New Jersey, pp. 507-528.
- Saleh NAM, Maksoud SA, El-Hadidi MN and Amer WMM. 1987. A comparative study of flavonoids in some members of Papaveraceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 15 (6): 673-675.
- Schwinn KE and Cavies KM. 2004. Flavonoids. In: *Plant Pigments and their manipulation*, K. Davies ed., Blackwell Publishing, pp. 93-149.
- Sfikas G. 1984. *Flowers of Greece*. ed. papeco, Athens, pp. 74-75.

- Shevell SK. 2003. Color appearance. In: *The Science of Color*, S.K. Shevell, ed., Optical Society of America – Elsevier, pp. 149-190.
- Spinner M, Kovalev A, Gorb SN and Westhoff G. 2013. Snake velvet black: hierarchical micro- and nanostructure enhances dark colouration in *Bitis rhinoceros*. *Scientific Reports*, 3: doi: 10.1038/srep01846.
- Stratakis E, Zorba V, Barberoglou M, Spanakis E, Rhizopoulou S, Tzanetakis P, Anastasiadis S and Fotakis C. 2009. Laser structuring of water-repellent biomimetic surfaces. *SPIE Newsroom*: 1-3, doi: 10.1117/2.1200901.1441.
- Sumanta N, Haque CI, Nishika J and Suprakash R. 2014. Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Research Journal of Chemical Sciences*, 4 (9): 63-69.
- Swain T. 1976. Flavonoids. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* Volume 2, T.W. Goodwin ed., Academic Press pp. 166-206.
- Swan GA. 1974. Structure, chemistry and biosynthesis of melanins. In: *Progress in the Chemistry of Organic Natural*, N. H. Andersen et al. eds., Springer Verlag Wien, pp. 522-582.
- Thacker E. 2013. Black on black, <https://publicdomainreview.org/2015/04/09/black-on-black/>.
- Thill J, Miosic S, Ahmed R, Schlangen K, Muster G, Stich K and Halbeirth H. 2012. 'Le Rouge et le Noir': a decline in flavone formation correlates with the rare color of black dahlia (*Dahlia variabilis* hort.) flowers. *BMC Plant Biology*, 12: 225, <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/12/225>.
- Ting L, Zang S, Xuehua J, Tianyu S and Yiwen P. 2017. Effects of pigment constituents and their distribution on spathe coloration of *Zantedeschia hybrida*. *HortScience*, 52 (12): 1840-1848.
- Trichopoulou A, Vasilopoulou E, Hollman P, Chamalides Ch, Foufa E, Kaloudis Tr, Kromhout D, Miskaki Ph, Petrochilou I, Poulima E, Stafilakis K and Theophilou D. 2000. Nutritional composition and flavonoid content of edible wild greens and green pies: a potential rich source of antioxidant nutrients in the Mediterranean diet. *Food Chemistry*, 70 (3): 319-323.
- van der Kooi CJ, Wilts BD, Leertouwer HL, Staal M, Elzenga JTM and Stavenga DG. 2014. Iridescent flowers? contribution of surfaces structures to optical signaling. *New Phytologist*, 203 (2): 667-673.
- van der Kooi CJ, Dyer AG and Stavenga DG. 2015. Is floral iridescence a biologically relevant cue in plant-pollinator signaling?. *New Phytologist*, 205 (1): 18-20.
- van der Kooi CJ, Elzenga JTM, Staal M and Stavenga DG. 2016. How to colour a flower: on the optical principles of flower coloration. *Proceedings of the Royal Society B*, 283 (1830): 20160429, <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2016.0429>.
- van der Kooi CJ, Elzenga TM, Dijksterhuis J and Stavenga DG. 2017. Functional optics of glossy buttercup flowers. *Journal of Royal Society Interface*, 14 (127): 20160933, <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2016.0933>.
- van der Kooi CJ, Dyer AG, Kevan PG and Lunau K. 2018. Functional significance of the optical properties of flowers for visual signaling. *Annals of Botany*, doi: 10.1093/aob/mcy119.



- van der Kooi CJ and Stavenga DG. 2019. Vividly coloured poppy flowers due to dense scattering in thin petals. *Journal of Comparative Physiology A*: 1-10, doi: 10.1007/s00359-018-01313-1
- Velisek J and Cejpek K. 2011. Pigments of higher fungi: a review. *Czech Journal of Food Science*, 29 (2): 87-102.
- Vigneron JP, Rassart M, Vertesy Z, Kertesz K, Sarrazin M, Biro LP, Ertz D and Lousse V. 2005. Optical structure and function of the white filamentary hair covering the edelweiss bracts. *Physical Review E*, 71 (1): 011906, doi: 10.1103/PhysRevE.71.011906.
- Vignolini S, Davey MP, Bateman RM, Rudall PJ, Moyroud E, Tratt J, Malmgren S, Steiner U and Glover BJ. 2012a. The mirror crack'd: both pigment and structure contribute to the glossy blue appearance of the mirror orchid *Ophrys speculum*. *New Phytologist*, 196 (4): 1038-1047.
- Vignolini S, Thomas MM, Kolle M, Wenzel T, Rowland A, Rudall PJ, Baumberg JJ, Glover BJ and Steiner U. 2012b. Directional scattering from the glossy flower of *Ranunculus*: how the buttercup lights up your chin. *Journal of the Royal Society Interface*, 9: 1295-1301.
- Vignolini S, Rudall PJ, Rowland AV, Reed A, Moyroud E, Faden RB, Baumberg JJ, Glover BJ and Steiner U. 2012c. Pointillist structural color in *Pollia* fruit. *PNAs*, 109 (39): 15712-15715.
- Vignolini S, Glover B and Steiner U. 2013a. Photonic structures in plants. In: *Biomimetics in Photonics*, O. Karthaus ed., CRC Press Taylor & Francis Group, pp. 1-18.
- Vignolini S, Moyroud E, Glover BJ and Steiner U. 2013b. Analysing photonic structures in plants. *Journal of the Royal Society Interface*, 10 (87), doi: 10.1002/cphc.200500007.
- Vignolini S, Moyroud E, Hingant T, Banks H, Rudall PJ, Steiner U and Glover BJ. 2015a. Is floral iridescence a biologically relevant cue in plant-pollinator signalling? A response to van der Kooi *et al.* (2014b). *New Phytologist*, 205 (1): 21-22.
- Vignolini S, Moyroud E, Hingant T, Banks H, Rudall PJ, Steiner U and Glover BJ. 2015b. The flower of *Hibiscus trionum* is both visibly and measurably iridescent. *New Phytologist*, 205 (1): 97-101.
- Vignolini S, Gregory T, Kolle M, Lethbridge A, Moyroud E, Steiner U, Glover BJ, Vukusic P, and Rudall PJ. 2016. Structural colour from helicoidal cell-wall architecture in fruits of *Margaritaria nobilis*. *Journal of the Royal Society Interface*, 13 (124), <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2016.0645>.
- Vogelmann TC. 1993. Plant tissue optics. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 44: 231-251.
- Vukusic P. and Sambles JR. 2003. Photonic structures in biology. *Nature*, 424: 852-855.
- Welch VL and Vigneron J-P. 2007. Beyond butterflies - the diversity of biological photonic crystals. *Optical and Quantum Electronics*, 39 (4-6): 296-303.
- Wellburn AR. 1994. The Spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144 (3): 307-313.
- Wenzel T and Vignolini S. 2018. A flower's nano-powers. *Physics World*, 31 (4): 28-31.
- Whitney HM, Kolle M, Alvarez-Fernandez R, Steiner U, and Glover BJ. 2009a. Contributions of iridescence to floral patterning. *Communicative & Integrative Biology*, 2 (3): 230-232.

- Whitney HM, Kollé M, Andrew P, Chittka L, Steiner U and Glover BJ. 2009b. Floral iridescence, produced by diffractive optics, acts as a cue for animal pollinators. *Science*, 323 (5910): 130-133.
- Whitney HM, Veronica Bennett KM, Dorling M, Sandbach L, Prince D, Chittka L and Glover BJ. 2011. Why do so many petals have conical epidermal cells?. *Annals of Botany*, 108 (4): 609-616.
- Willows RD. 2004. Chlorophylls. In: *Plant Pigments and their manipulation*, K. Davies ed., Blackwell Publishing, pp. 23-56.
- Wilts BD, Whitney HM, Glover BJ, Steiner U and Vignolini S. 2014. Natural helicoidal structures: morphology, self assembly and optical properties. *Materials Today: Proceedings*, 1S: 177-185.
- Wilts BD, Rudall PJ, Moyroud E, Gregory T, Ogawa Y, Vignolini S, Steiner U, Glover BJ. 2018. Ultrastructure and optics of the prism-like petal epidermal cells of *Eschscholzia californica* (California poppy). *New Phytologist*, 219 (3): 1124-1133.
- Wolbarsht ML, Walsh AW and George G. 1981. Melanin, a unique biological absorber. *Applied Optics*, 20 (3): 2184-2186.
- Yoshida K, Mori M and Kondo T. 2009. Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Natural Products Reports*, 26 (7): 857-964.
- Zryd J-P and Christinet L. 2004. Betalains. In: *Plant Pigments and their manipulation*, K. Davies ed., Blackwell Publishing, pp. 185-213.

- Αλεξανδρίδης Ν. 2004. Μελέτη για την επίδειξη των πετάλων από άνθη αυτοφυών φυτών του Μεσογειακού οικοσυστήματος. Διπλωματική εργασία, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ.
- Αλεξόπουλος ΚΔ. 1966. Γενική Φυσική, Τόμος πέμπτος: Οπτική, [εκδόσεις του Πανεπιστημίου Αθηνών], Αθήνα.
- Αργυρόπουλος, ΑΦ. 2004. Το άνθος της ελληνικής χλωρίδας, ανατομική και φυσιολογική μελέτη. Διπλωματική εργασία, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ.
- Αργυρόπουλος ΑΦ. 2009. Το χρώμα των ανθέων. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ.
- Γιαννίτσaros Α, Κουσούνης Γ, Κυριακοπούλου Π, Οικονομίδου Ε, Παντίδου Μ, Παρασκευοπούλου Α, Ρουσομουστακάκη-Θεοδωράκη Μ, Σωτηρόπουλος Δ, Τσακίρη Φ, Φοίτος Δ, Χαριτωνίδης Σ, Χατζοπούλου-Μπλέμπα Α και Ψαράς Γ. 1999. *Εκπαιδευτική Εγκυκλοπαίδεια Τόμος 12 – Φυτολογία*, Εκδοτική Αθηνών, Αθήνα.
- Γκίκας Δ. 2016. Οπτικές και φωτονικές ιδιότητες πετάλων από άνθη φυτών του Μεσογειακού οικοσυστήματος. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ.
- Ελευθερίου ΕΠ. 2007. *Βοτανική – Βιολογία φυτικού κυττάρου και ιστολογία φυτών*, University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
- Καββάδας ΔΚ. 1963. *Εικονογραφημένο Βοτανικόν – Φυτολογικόν Λεξικόν, Τόμος Στ΄*.
- Μαργαρίτης ΛΧ, Γαλανόπουλος ΒΚ, Κεραμάρης ΚΕ, Μαρίνος ΕΣ, Παπασιδέρη ΙΣ, Στραβοπόδης ΔΙ και Τρουγκάκος ΙΠ. 2004. *Βιολογία κυττάρου*, Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα.
- Ριζοπούλου Σ, Γεωργίου Κ, Θάνος Κ, Μελετίου-Χρήστου Σ-Μ και Ρούσσης Α. 2015. *Εργαστηριακές Ασκήσεις Φυσιολογίας Φυτών*. Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράμματα και Βοηθήματα [www.kallipos.gr](http://www.kallipos.gr), <http://hdl.handle.net/11419/5137>.

- Τρικαλινός Χ. 2015. Εισαγωγή στη θεωρία των σφαλμάτων. Στο: *Εργαστηριακές Ασκήσεις Φυσικής για τους φοιτητές του Τμήματος Βιολογίας*, [Έκδοση του Πανεπιστημίου Αθηνών], σελ. 29-66.
- Τριχόπουλος Δ., Τζώνου Α. και Κατσουγιάννη Κ. 2001. *Βιοστατιστική*, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., Αθήνα.
- Τσεκούρα Δ-Θ. 2018. *Μελέτη φασμάτων ανάκλασης σε άνθη*. Διπλωματική εργασία, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ.
- Χατζηιωάννου ΘΠ και Κούππαρης ΜΑ. 2014. *Ενόργανη Ανάλυση*, [Έκδοση του Πανεπιστημίου Αθηνών], Αθήνα.
- Χειμώνα Χ. 2015. Βιομημητική και υδατική κατάσταση φυτικών ιστών. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ.

### Ιστοσελίδες

- Daily Mail reporter. 2010. Black is the colour: scientists create world's first all black petunia for next summer's gardens. *DailyMail Online*, <https://www.dailymail.co.uk/sciencetech/article-1332642/Black-colour-Scientists-create-black-petunia-summers-gardens.html>, ανακτήθηκε στις 21/12/2017.
- <https://www.greekflora.gr/>, τελευταία επίσκεψη στις 21/12/2017.