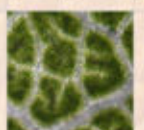
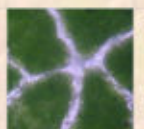
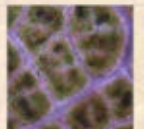


Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών

**Μεταβολές των Φωτοσυνθετικών Χαρακτηριστικών
των Φύλλων Τριών Ποικιλιών Αμπέλου
κατά τη Διάρκεια της Ανάπτυξής τους**



Ασπασία Δ. Κλουβάτου

Αθήνα 2003

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών

Μεταβολές των Φωτοσυνθετικών Χαρακτηριστικών των Φύλλων Τριών Ποικιλιών της Αμπέλου κατά τη Διάρκεια της Ανάπτυξής τους

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων

ΚΑΡΑΜΠΟΥΡΝΙΩΤΗΣ Γ.

Αναπληρωτής Καθηγητής

Μέλη

ΣΤΑΥΡΑΚΑΚΗΣ Μ.

Αναπληρωτής Καθηγητής

ΦΑΣΣΕΑΣ Κ.

Αναπληρωτής Καθηγητής

**Πτυχιακή Μελέτη της Φοιτήτριας
Ασπασίας Δ. Κλουβάτου**

Αθήνα 2003

Η εικόνα του αμπελιού ως φυτό αλλά και ως κύριο μέσο παραγωγής του κρασιού ήταν από τις πιο χαρακτηριστικές των παιδικών και εφηβικών μου χρόνων. Η ενασχόληση με το αμπέλι στα πλαίσια της πτυχιακής μελέτης που πραγματοποίησα μου έδωσε την ευκαιρία να έρθω πιο κοντά στα μυστικά που κρύβει η φύση του αμπελιού, σε λειτουργίες και μηχανισμούς που στηρίζουν την επιβίωση του.

Σημαντικότερο ρόλο στην αποκτηση αυτής μου της εμπειρίας έπαιξε ο Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Καραμπουρνιώτης Γεώργιος, τον οποίο ευχαριστώ θερμά, πρώτα από όλα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του θέματος, για την συνεχή και ουσιαστική του βοήθεια κατά την διάρκεια της εργασίας αλλά και για το ήθος, την σεμνότητα και την φιλική σχέση που καλλιέργησε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μανόλη Σταυρακάκη τόσο για την συμμετοχή του στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή και την σχολαστική διόρθωση της μελέτης μου, όσο και για την παραχώρηση του πειραματικού αμπελώνα του εργαστηρίου Αμπελολογίας του ΓΠΑ, κατά την διάρκεια του πειραματικού μέρους.

Στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Φασσέα θα ήθελα να εκφράσω την εκτίμηση και τις ευχαριστίες μου για την συμμετοχή του στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή, για την προσεκτική διόρθωση της μελέτης μου και τέλος για την φιλική του συμπεριφορά.

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να ευχαριστήσω ξεχωριστά τον Μεταδιδακτορικό Γεώργιο Λιακόπουλο που με απεριόριστη υπομονή συνέβαλε καθοριστικά στο να αποκτήσω την πρώτη ουσιαστική επαφή με το εργαστηριακό τμήμα της Γεωπονικής επιστήμης. Ακόμη, τον ευχαριστώ για την συμπαράσταση και την ενθάρρυνσή του σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπισα.

Επίσης ευχαριστώ την Υποψήφια Διδάκτορα Σωτηρία Σταυριανάκου και την Διδάκτορα Βάλλυ Λιάκουρα καθώς επίσης τους φίλους και συμφοιτητές Κορνήλιο Βέκκο, Καρβώνη Ευάγγελο και Ρέστα Ευαγγελία τόσο για την άμεση βοήθεια στην διεξαγωγή της μελέτης μου, όσο και για την ηθική συμπαράσταση που μου παρείχαν.

Τέλος θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αγάπη την ηθική συμπαράσταση και την στήριξη της, κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

εριεχόμενα



Εισαγωγή	9
1. Φωτοσύνθεση	9
1α. Η σημασία της φωτοσύνθεσης για τους αυτότροφους οργανισμούς	9
1β. Η φυσιολογία της φωτοσύνθεσης.....	10
2. Φωτοπαρεμπόδιση	23
3. Φωτοπροστασία	27
3α. Ανατομικά χαρακτηριστικά των φύλλων που συμβάλλουν στην φωτοπροστασία	27
3β. Φυσιολογικά χαρακτηριστικά των φύλλων που συμβάλλουν στην φωτοπροστασία. Ο κύκλος των ξανθοφυλλών.....	27
4. Η συγκρότηση της φωτοσυνθετικής συσκευής κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φύλλων	32
5. Φωτοσυνθετικά χαρακτηριστικά του φύλλου του αμπελιού	34
5α. Η συγκρότηση της φωτοσυνθετικής συσκευής κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φύλλων του αμπελιού	34
5β. Τα χαρακτηριστικά φωτοπροστασίας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φύλλων του αμπελιού.....	34
Σκοπός της εργασίας.....	37
Υλικά και Μέθοδοι	39
1. Φυτικό Υλικό και Πειραματικό Σχέδιο	39
2. Δειγματοληψίες	39
3. Μορφολογικές Παράμετροι.....	39
3α. Μετρήση Πάχους Φύλλου και Ειδικής Φυλλικής Επιφάνειας	39
3β. Μέτρηση Ποσοστού Διαφανών Περιοχών του Ελάσματος.....	40
4. Βιοχημικές και Φυσιολογικές Παράμετροι	41
4α. Μέτρηση Ανθοκυανινών	41
4β.Ανάλυση Φωτοσυνθετικών και Φωτοπροστατευτικών Χρωστικών και παράμετροι λειτουργίας κύκλου ξανθοφυλλών	41
4γ. Μετρήσεις Φωτοσύνθεσης και Συναφών Παραμέτρων.....	42
4δ. Μέτρηση Παραμέτρου F_v/F_m	43
Αποτελέσματα	45
1. Μορφολογικές Παράμετροι.....	45
2. Βιοχημικές και Φυσιολογικές Παράμετροι	49

Περιεχόμενα

2α. Συγκέντρωση Ανθοκυανινών	49
2β. Παράμετροι Φωτοσυνθετικής Λειτουργίας	50
2γ. Ταχύτητα διαπνοής	50
2δ. Αγωγιμότητα στοματίων	52
2ε. Εσωτερική συγκέντρωση CO ₂	52
2στ. Παράμετρος F _v / F _m	53
2ζ. Συγκέντρωση χλωροφυλλών.....	53
2η. Παράμετροι του Φωτοπροστατευτικού Μηχανισμού του Κύκλου των Ξανθοφυλλών	54
Συζήτηση	61
Βιβλιογραφία	65

1. Φωτοσύνθεση

1α. Η σημασία της φωτοσύνθεσης για τους αυτότροφους οργανισμούς

Ένας απλοποιημένος ορισμός της φωτοσύνθεσης θα ήταν ότι πρόκειται για τη μεταβολική ακολουθία κατά την οποία λαμβάνει χώρα σύνθεση μορίων με τη συμβολή της φωτεινής ακτινοβολίας. Η φωτοσύνθεση περιγράφει την διαδικασία με την οποία οι αυτότροφοι οργανισμοί συνθέτουν οργανικές ενώσεις με υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη ανόργανα συστατικά (Αιβαλάκης, κ.α., 2003). Για να είναι ενεργειακά δυνατή η παραπάνω διαδικασία απαιτείται ενέργεια, η οποία στους αυτότροφους οργανισμούς, παρέχεται από την δέσμευση της ενέργειας του ήλιου (Hall and Rao, 1999). Έτσι, προϋπόθεση για την διεξαγωγή της φωτοσύνθεσης είναι η παρουσία φωτός κατάλληλων μηκών κύματος. Η ακτινοβολία αυτή ονομάζεται φωτοσυνθετικά ενεργός ακτινοβολία (Photosynthetically Active Radiation, PAR) και περιλαμβάνει μήκη κύματος μεταξύ 400 και 700 nm (Taiz and Zeiger, 1998). Το κύριο χημικό μονοπάτι της φωτοσύνθεσης είναι ο μετασχηματισμός του διοξειδίου του άνθρακα σε υδατάνθρακες, μια διαδικασία στην οποία συμμετέχει το νερό και εκλύεται μοριακό οξυγόνο. Είναι σαφές ότι οι υδατάνθρακες που σχηματίζονται περιέχουν υψηλότερα ποσά ενέργειας από τα αρχικά υποστρώματα (Lawlor, 2001). Η βασική αυτή αντίδραση απαιτεί 2840 kJ για κάθε mole εξόζης που σχηματίζεται. Τα οργανικά μόρια που προκύπτουν από τη φωτοσυνθετική λειτουργία παρέχουν χημική ενέργεια και σκελετούς άνθρακα, τόσο στους ίδιους τους αυτότροφους οργανισμούς, οι οποίοι αποτελούν τους παραγωγούς όσο και στους υπόλοιπους οργανισμούς, στους καταναλωτές. Τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως δομικές μονάδες σε διάφορες αναβολικές αντιδράσεις είτε να παράσχουν μέρος της περιεχόμενης ενέργειάς τους για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του κυττάρου κατά την αναπνευστική λειτουργία, στην οποία ελευθερώνονται ως προϊόντα τα αρχικά υποστρώματα της φωτοσύνθεσης (διοξείδιο του άνθρακα και νερό) (Hall and Rao, 1999).

1β. Η φυσιολογία της φωτοσύνθεσης

Ο κύριος όγκος της φωτοσυνθετικής λειτουργίας στα ανώτερα φυτά πραγματοποιείται στα φύλλα και σε κύτταρα τα οποία διαθέτουν χλωροπλάστες, εξειδικευμένα προς το σκοπό αυτό κυτταρικά οργανίδια (Αιβαλάκης, κ.α., 2003). Στα οργανίδια αυτά πραγματοποιείται η αλληλουχία των φωτοχημικών και βιοχημικών σταδίων της φωτοσύνθεσης, από την αρχική δέσμευση της ενέργειας της ηλιακής ακτινοβολίας έως τη βιοσύνθεση των υδατανθράκων (Hall and Rao, 1999). Η φωτοσύνθεση μπορεί να διακριθεί σε δύο φάσεις. Στη πρώτη φάση διεξάγονται οι ονομαζόμενες φωτεινές αντιδράσεις ή φωτοαντιδράσεις για τη διεξαγωγή των οποίων είναι απαραίτητη η παρουσία φωτισμού. Η ενέργεια ακτινοβολίας μετατρέπεται σε χημική, υπό τη μορφή σταθερών χημικών ενώσεων με υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο/ του NADPH και του ATP. Στη φάση αυτή μόρια νερού φωτολύονται παρέχοντας πρωτόνια, ηλεκτρόνια και μοριακό οξυγόνο (Αιβαλάκης, κ.α., 2003). Η δεύτερη φάση περιλαμβάνει καθαρά βιοχημικές αντιδράσεις στις οποίες η ενέργεια που έχει ενσωματωθεί στα NADPH και ATP χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση οργανικών ενώσεων. Η φάση αυτή δεν εξαρτάται άμεσα από την ύπαρξη φωτισμού και γι' αυτό το λόγο αναφέρεται και ως σκοτεινή φάση ή σκοτεινές αντιδράσεις (Taiz and Zeiger, 1998). Παράλληλα με τις παραπάνω βιοχημικές αντιδράσεις, τα φύλλα διαθέτουν ένα σύνολο από φυσιολογικούς μηχανισμούς και συγκεκριμένα μορφολογικά και ανατομικά χαρακτηριστικά, ώστε η όλη διαδικασία να πραγματοποιείται με τη μέγιστη απόδοση σε επίπεδο οργάνου (Αιβαλάκης, κ.α., 2003).

1βα. Τα ανατομικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των φύλλων αναφορικά με τη φωτοσυνθετική λειτουργία

Η δομή των φύλλων είναι στενά συνυφασμένη με τη λειτουργία τους. Πρόκειται για ελασματοειδείς κατασκευές, των οποίων η διάταξη και τοποθέτηση στο χώρο στοχεύει στην όσο το δυνατό αποτελεσματικότερη αξιοποίηση των πρώτων υλών της φωτοσύνθεσης, της φωτεινής ακτινοβολίας και του διοξειδίου του άνθρακα της ατμόσφαιρας. Ο στόχος αυτός επιτυγχάνεται με την ανάπτυξη μιας τεράστιας επιφάνειας εκτεθειμένης στις ακτίνες του ήλιου. Η αρχιτεκτονική κατασκευή των φύλλων στοχεύει αφενός μεν στην όσο το δυνατό αποτελεσματικότερη απορρόφηση φωτεινής ακτινοβολίας και αφετέρου στην ευχερέστερη διάχυση του διοξειδίου του άνθρακα προς τα φωτοσυνθετικά κύτταρα. Για το λόγο αυτό τα περισσότερα φύλλα είναι λεπτά, ώστε όλα τα

φωτοσυνθετικά κύτταρα να δέχονται ικανή ένταση φωτεινής ακτινοβολίας και να έχουν εύχερη πρόσβαση στο διοξείδιο του άνθρακα της ατμόσφαιρας (Αιβαλάκης, κ.α., 2003).

Η ανατομική παρατήρηση ενός τυπικού φύλλου αποκαλύπτει ότι το όργανο αυτό συγκροτείται από εξειδικευμένους ιστούς με αυστηρά καταμερισμένους ρόλους. Η εξωτερική επιφάνεια του φύλλου καλύπτεται από την εφυμενίδα και την επιδερμίδα. Η περιοχή μεταξύ της προσαξονικής και της αποαξονικής επιδερμίδας αποτελεί την περιοχή του μεσοφύλλου και περιλαμβάνει τα φωτοσυνθετικά κύτταρα, τα οποία περιέχουν χλωροπλάστες και τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Taiz and Zeiger, 1998).

Η επιδερμίδα κυρίως λόγω του στρώματος της εφυμενίδας απαρτίζει έναν ιστό αδιαπέραστο στους υδρατμούς, ο οποίος αποτρέπει την εξάτμιση του νερού από το εσωτερικό του φύλλου προς την ατμόσφαιρα. Ταυτόχρονα όμως παρεμποδίζει και την είσοδο του διοξειδίου του άνθρακα στο εσωτερικό του ελάσματος. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος η επιδερμίδα φέρει κατά τόπους, εκτός από τα τυπικά επιδερμικά κύτταρα, ζεύγη εξειδικευμένων κύτταρων/τα καταφρακτικά κύτταρα, τα οποία σχηματίζουν πόρους, τα στόματα. Η σημαντικότερη ανατομική ιδιομορφία τους είναι η χαρακτηριστική ανομοιόμορφη πάχυνση του τοιχώματός τους, ενώ τη σημαντικότερη φυσιολογική διαφορά από τα υπόλοιπα επιδερμικά κύτταρα αποτελεί η ύπαρξη χλωροπλαστών (Αιβαλάκης, κ.α., 2003). Τα στόματα έχουν την δυνατότητα του ενεργητικού ανοίγματος και κλεισίματος με αποτέλεσμα, αφενός να ελέγχονται οι απώλειες νερού και αφετέρου να επιτρέπεται η ανταλλαγή των αερίων μεταξύ μεσοφύλλου και ατμόσφαιρας (Andersson and Barber, 1996).

Εκτός από τα στόματα, ενδιαφέρον παρουσιάζουν και διάφορα επιδερμικά εξαρτήματα συνηθέστερα από τα οποία είναι οι τρίχες. Οι τελευταίες μπορεί να είναι μονοκύτταρες ή πολυκύτταρες. Οι τρίχες αποτελούν προεκβολές της επιδερμίδας με τεράστια ποικιλία μορφής αλλά και λειτουργίας. Διακρίνονται σε δύο μεγάλες βασικές κατηγορίες, τις αδενώδεις και τις μη αδενώδεις. Οι μη αδενώδεις τρίχες σε πολλά φυτά σχηματίζουν το τρίχωμα, δηλαδή ένα ή περισσότερα στρώματα στην επιφάνεια του φύλλου, το οποίο προσδίδει λευκή ή υπόλευκη χροιά και βελουδίνη υφή στο έλασμα. Η παρουσία πυκνού τριχώματος σχετίζεται με τη μηχανική ενδυνάμωση του ελάσματος, την προστασία του από προσβολές παθογόνων και εντόμων, καθώς και την προστασία από τις έντονες απώλειες νερού και τις υψηλές εντάσεις ορατής και υπεριώδους ακτινοβολίας. Συμβάλλει επίσης και στη βελτίωση του

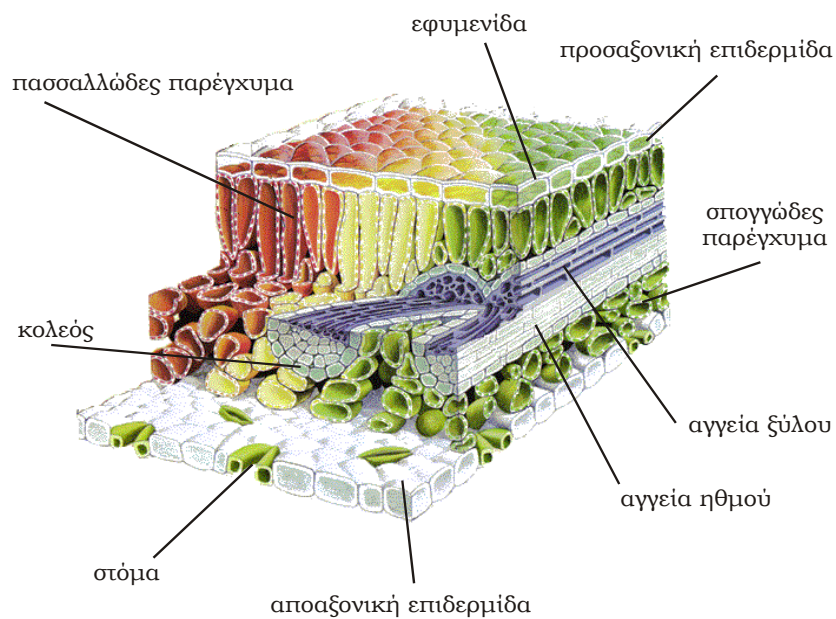
θερμικού ισοζυγίου του ελάσματος επειδή ανακλά ένα μέρος της ακτινοβολίας που προσπίπτει στο φύλλο (Αιβαλάκης, κ.α., 2003).

Η περιοχή του φύλλου που παρεμβάλλεται μεταξύ των δύο επιδερμίδων, δηλαδή το μεσόφυλλο, αποτελείται από τα κύτταρα του φωτοσυνθετικού παρεγχύματος, τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και τους στηρικτικούς ιστούς. Τα κύτταρα του φωτοσυνθετικού παρεγχύματος διαθέτουν πολυάριθμους χλωροπλάστες και άφθονους μεσοκυττάριους χώρους, ώστε να διευκολύνεται η ανταλλαγή αερίων (Taiz and Zeiger, 1998).

Στα τυπικά φύλλα των δικότυλων το μεσόφυλλο απαρτίζεται από δύο τύπους φωτοσυνθετικού παρεγχύματος, το δρυφρακτειδές ή πασσαλώδες, και το σπογγώδες παρέγχυμα (Taiz and Zeiger, 1998).

Τα πασσαλώδη κύτταρα παρουσιάζουν τη μορφή δοκών ή πασσάλων κάθετα προσανατολισμένων στην επιφάνεια του φύλλου. Διατάσσονται σε μία ή περισσότερες επάλληλες στοιβάδες προς την πλευρά της προσαξονικής επιφάνειας. Το σπογγώδες παρέγχυμα αποτελείται από έλοβα συνήθως, ακανόνιστα κύτταρα, με άφθονους μεσοκυττάριους χώρους (Αιβαλάκης, κ.α., 2003) (εικόνα 1).

Η επιμήκης κατασκευή των κυττάρων του πασσαλώδους παρεγχύματος, σε συνδυασμό με την τοποθέτηση των χλωροπλαστών στα αντικληνή τοιχώματα, διευκολύνει τη διείσδυση της ακτινοβολίας στο εσωτερικό του



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της τρισδιάστατης δομής ενός τυπικού φύλλου δικότυλου φυτού C3. Διακρίνονται οι κυριότεροι ιστοί.

μεσοφύλλου. Από την άλλη πλευρά το σχήμα των κυττάρων του σπογγώδους παρεγχύματος ευνοεί την απορρόφηση της φωτεινής ακτινοβολίας, ενώ η αποαξονική επιδερμίδα συμπεριφέρεται ως εσωτερικός ανακλαστήρας που επιστρέφει τα φωτόνια προς το εσωτερικό του μεσοφύλλου. Η τελευταία, επιτρέπει επίσης την αύξηση του πάχους του φύλλου, κυρίως με την αύξηση των στοιβάδων του πασσαλώδους παρεγχύματος, χωρίς να δημιουργούνται σημαντικά προβλήματα φωτισμού στις κατώτερες στοιβάδες των κυττάρων του μεσοφύλλου (Αιβαλάκης, κ.α., 2003).

Οι ηθμαγγειώδεις αγωγοί δεσμίδες διασχίζουν το μεσόφυλλο και γίνονται αντιληπτές με τη μορφή των νευρώσεων. Στο έλασμα καταφθάνουν οι τελικές απολήξεις του συστήματος μεταφοράς που ξεκινά από τη ρίζα και διασχίζει όλο το βλαστό και το μίσχο. Η μεταφορά νερού και θρεπτικών συστατικών επιτελείται μέσω των αγγείων του ξύλου τα οποία εντοπίζονται στην πλευρά της δεσμίδας που βρίσκεται προς την προσαξονική επιφάνεια του φύλλου, ενώ η εξαγωγή των φωτοσυνθετικών προϊόντων γίνεται μέσω των στοιχείων του ηθμού τα οποία εντοπίζονται στη πλευρά της δεσμίδας που βρίσκεται προς την αποαξονική επιφάνεια (Αιβαλάκης, κ.α., 2003).

Οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες συνήθως προστατεύονται από σκληρεγχυματικές ίνες και περιβάλλονται από παρεγχυματικά κύτταρα του λεγόμενου δεσμικού κολεού. Οι σκληρεγχυματικές ίνες προσφέρουν μηχανική στήριξη και προστασία έναντι προσβολών παθογόνων και εντόμων. Η μηχανική θωράκιση φαίνεται ότι είναι επιβεβλημένη αν ληφθεί υπόψη ότι οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες είναι εξαιρετικά πλούσιες σε θρεπτικά συστατικά και σάκχαρα, επομένως αποτελούν στόχο για τους βιοτικούς εχθρούς. Τα κύτταρα του δεσμικού κολεού βοηθούν κυρίως στη τροφοδότηση του ηθμού με σάκχαρα (Αιβαλάκης, κ.α., 2003).

Στα φύλλα πολυάριθμων φυτικών ειδών, κυρίως ξηροφύτων, ο δεσμικός κολεός σχηματίζει προεκτάσεις που συγκροτούνται από κύτταρα παρεγχύματος, κολεγχύματος ή σκληρεγχύματος οι οποίες εφάπτονται των δύο επιδερμίδων του φύλλου. Οι προεκτάσεις αυτές προσφέρουν μηχανική στήριξη, προμηθεύουν με νερό τα επιδερμικά κύτταρα αλλά και μεταφέρουν φωτεινή ακτινοβολία στα κατώτερα στρώματα του μεσοφύλλου (Nikolopoulos et al., 2002).

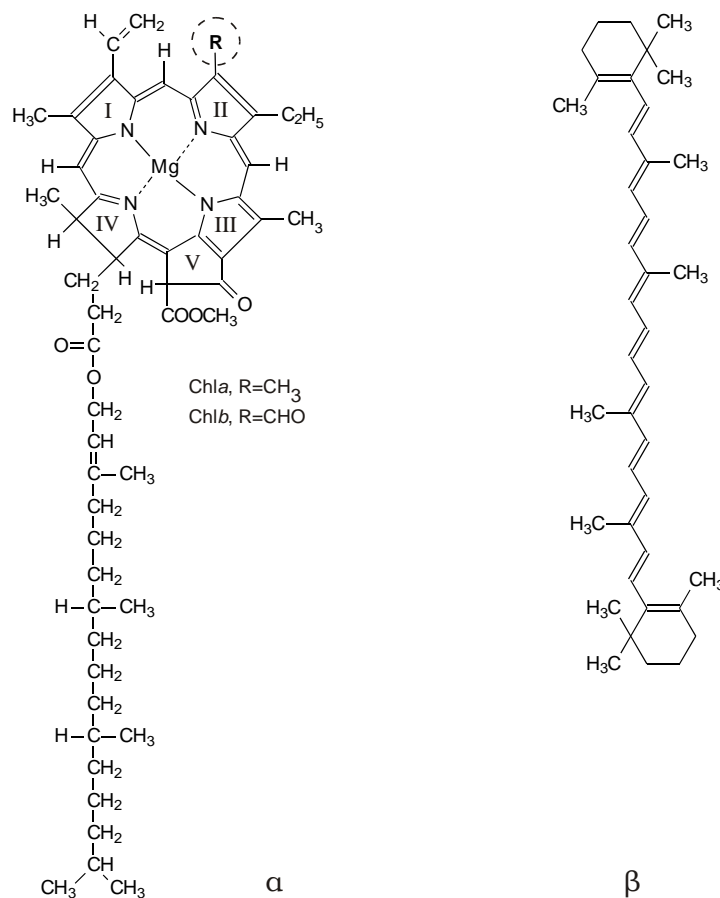
1ββ. Δομή των χλωροπλαστών

Τα φωτοσυνθετικά κύτταρα των ανώτερων φυτών περιέχουν μικροσκοπικά υποκυτταρικά οργανίδια με δισκοειδή συνήθως μορφή, τους χλωροπλάστες. Στο κοινό οπτικό μικροσκόπιο οι χλωροπλάστες εμφανίζουν έντονο πράσινο χρώμα, λόγω της παρουσίας χλωροφύλλης. Η διάμετρός τους κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 3 και 10 μm . Κάθε τυπικό φωτοσυνθετικό κύτταρο του μεσοφύλλου περιέχει συνήθως 20–60 χλωροπλάστες (Αιβαλάκης, κ.α., 2003). Τα οργανίδια αυτά περιβάλλονται από διπλή εξωτερική μεμβράνη, τον φάκελο, ο οποίος αποτελείται από δύο διλιπιδιακές μεμβράνες από γαλακτολιπίδια οι οποίες περιέχουν καροτενοειδή, αλλά όχι χλωροφύλλη (Δροσόπουλος, 1998; Lawlor, 2001). Ο φάκελος του χλωροπλάστη περικλείει στο εσωτερικό του ένα άμορφο ζελατινώδες υλικό, το στρώμα. Στο στρώμα εντοπίζονται τα υδατοδιαλυτά ένζυμα τα οποία καταλύουν τις αντιδράσεις της φωτοσυνθετικής αφομοίωσης του διοξειδίου του άνθρακα. Μέσα στο στρώμα αναπτύσσεται ένα δίκτυο μεμβρανών, τα θυλακοειδή του στρώματος, τα οποία σε ορισμένες περιοχές στοιβάζονται σε επάλληλες σειρές σχηματίζοντας τα grana. Τα θυλακοειδή που συμμετέχουν στο σχηματισμό των grana ονομάζονται θυλακοειδή των grana. Στα θυλακοειδή συμβαίνουν οι φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης καθώς εκεί εντοπίζονται όλα τα μόρια της χλωροφύλλης και των άλλων φωτοσυνθετικών χρωστικών. Η κοιλότητα η οποία σχηματίζεται στο εσωτερικό κάθε θυλακοειδούς ονομάζεται lumen (Hall and Rao, 1999).

Όλοι οι χλωροπλάστες περιέχουν λιπόφιλα μόρια χρωστικών τα οποία είναι βυθισμένα στη διπλοστοιβάδα των λιπιδίων των θυλακοειδών και σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτείνες. Οι χρωστικές αυτές συμμετέχουν είτε άμεσα απορροφώντας φωτόνια είτε έμμεσα προστατεύοντας τη φωτοσυνθετική συσκευή, στη φωτοσυνθετική λειτουργία και για το λόγο αυτό ονομάζονται φωτοσυνθετικές χρωστικές. Από την άποψη τόσο της δομής, όσο και του ρόλου τους, οι φωτοσυνθετικές χρωστικές των ανώτερων φυτών κατατάσσονται σε δύο ομάδες, τις χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή (εικόνα 2).

Οι χλωροφύλλες παρουσιάζουν τον χαρακτηριστικό πράσινο χρωματισμό στον οποίο οφείλουν το χρώμα τους οι χλωροπλάστες και κατ' επέκταση τα φύλλα, ενώ τα καροτενοειδή παρουσιάζουν κίτρινο–πορτοκαλί έως ερυθρό χρωματισμό. Το μόριο της χλωροφύλλης αποτελείται από τέσσερις πυρολικούς δακτυλίους οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς άνθρακα–άνθρακα σχηματίζοντας έναν πορφυρινικό δακτύλιο (εικόνα 2α). Ο πορφυρινικός

δακτύλιος αποτελεί τη χρωμοφόρο ομάδα του μορίου πρόκειται δηλαδή για το τμήμα του μορίου που είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση των φωτονίων. Ένα γενικό χαρακτηριστικό των χρωμοφόρων των βιολογικών μορίων είναι ότι περιλαμβάνουν ένα σχετικά υψηλό αριθμό συζευγμένων διπλών δεσμών. Μεταξύ των πυρολικών δακτυλίων III και IV σχηματίζεται ένας πέμπτος δακτύλιος κυκλοπεντανόνης. Τα άτομα αζώτου των πυρολικών δακτυλίων συγκρατούν στο κέντρο του πορφυρινικού δακτυλίου ένα άτομο μαγνησίου. Ο πυρολικός δακτύλιος IV συνδέεται με ένα μόριο με λιπόφιλλο χαρακτήρα, τη φυτόλη, η οποία αποτελεί την πλάγια αλυσίδα του μορίου της χλωροφύλλης. Με την απόσπαση του ατόμου του μαγνησίου από τον πορφυρινικό δακτύλιο προκύπτει το μόριο της φαιοφυτίνης. Στους χλωροπλάστες των ανώτερων φυτών απαντώνται δύο είδη χλωροφυλλών, η χλωροφύλλη α και η χλωροφύλλη β, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον υποκαταστάτη του πυρολικού δακτυλίου II (Αιβαλάκης, κ.α., 2003). Τα φάσματα απορρόφησης των χλωροφυλλών παρουσιάζουν μέγιστα στην μπλέ και κόκκινη περιοχή του



Εικόνα 2. α. Συντακτικός τύπος των δύο παραλλαγών του μορίου της χλωροφύλλης των ανώτερων φυτών. **β.** Συντακτικός τύπος τυπικού καροτενοειδούς.

ορατού φάσματος (Lawlor, 2001). Το μόριο των καροτενοειδών αποτελείται από μια ευθύγραμμη αλυσίδα 40 ατόμων άνθρακα στην οποία εναλλάσσονται μονοί και διπλοί δεσμοί (εικόνα 2β). Η ομάδα των καροτενοειδών περιλαμβάνει λιπόφιλα μόρια χρωστικών, τα οποία είναι ευρέως κατανεμημένα στην φύση και εμφανίζονται σε όλους τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς. Συμπεριφέρονται ως φωτοσυλλεκτικές αντένες και ακόμη προστατεύουν την φωτοσυλλεκτική συσκευή από την καταστροφή σε υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας (Siefermann-Harms, 1985; Bartley and Scolnik 1995). Η ομάδα των καροτενοειδών αποτελείται από τα καροτένια, μόρια με τυπική δομή υδρογονάνθρακα, και τις ξανθοφύλλες, δηλαδή τα οξυγονωμένα παράγωγα των καροτενίων. Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι της ομάδας των καροτενοειδών είναι το α- και β-καροτένιο, ενώ των ξανθοφυλλών η λουτεΐνη, η βιολαξανθίνη και η ζεαξανθίνη.

1βγ. Οι φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης

Κάθε ένωση που απορροφά ενέργεια ακτινοβολίας στην ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος ονομάζεται χρωστική. Τις χρωστικές το ανθρώπινο μάτι τις αντιλαμβάνεται έγχρωμες. Την χλωροφύλλη πράσινη, τα καροτενοειδή πορτοκαλί ή κίτρινα και το φυτόχρωμα μπλε (Hall and Rao, 1999).

Στις φωτοχημικές αντιδράσεις φωτόνια με κατάλληλο μήκος κύματος μπορούν να προκαλέσουν μεταπτώσεις ηλεκτρονίων. Στην περίπτωση αυτή τα ηλεκτρόνια μετακινούνται σε στάθμη υψηλότερου ενεργειακού περιεχομένου, το μόριο της χρωστικής βρίσκεται πλέον σε διηγερμένη κατάσταση ενώ η διαφορά ενέργειας μεταξύ των δύο ενεργειακών σταθμών αντικατοπτρίζει την ενέργεια του συγκεκριμένου quantum που απορροφήθηκε. Μεταπτώσεις των ηλεκτρονίων μπορούν να συμβούν σε περισσότερες της μιας ενεργειακές στάθμες, δηλαδή καταστάσεις διέγερσης (Αιβαλάκης, κ.α., 2003). Για το λόγο αυτό το μόριο της χλωροφύλλης έχει τη δυνατότητα να απορροφά φωτόνια σε περισσότερες από μία περιοχές του φάσματος (μπλέ και κόκκινη). Η δυνατότητα αυτή έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση δύο μεγίστων στα φάσματα απορρόφησης της χλωροφύλλης (Lawlor, 2001).

Η αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη, είναι ένα αντιστρεπτό φαινόμενο. Τα μόρια που βρίσκονται σε διηγερμένη κατάσταση είναι ασταθή και παρουσιάζουν τη τάση να επανέλθουν ταχέως στην αρχική (βασική) κατάσταση αποδίδοντας την επιπλέον ενέργεια που απορροφήθηκε. Η

διαδικασία αυτή ονομάζεται αποδιέγερση των μορίων. Η απόδοση της ενέργειας διέγερσης του μορίου της χλωροφύλλης μπορεί να συμβεί με διαφορετικούς τρόπους:

α. *Με τη μορφή θερμότητας.* Η ενέργεια διέγερσης μετατρέπεται βαθμιαία σε θερμική μέσω αλλαγών δόνησης και περιστροφής του μορίου.

β. *Με τη μορφή ακτινοβολίας.* Στην περίπτωση αυτή το μόριο της χρωστικής επιστρέφει στη βασική κατάσταση με ταυτόχρονη εκπομπή ενός φωτονίου. Η εκπομπή συμβαίνει συνήθως πολύ γρήγορα (10^{-8} έως 10^{-9} sec) και ονομάζεται φθορισμός. Επειδή η απόδοση της ενέργειας διέγερσης συνοδεύεται πάντα από μικρές απώλειες θερμότητας, η ενέργεια ακτινοβολίας που εκπέμπεται είναι μικρότερη εκείνης που απορροφήθηκε, επομένως η εκπομπή φθορισμού αφορά ακτινοβολία σε μεγαλύτερα μήκη κύματος συγκριτικά με την ακτινοβολία διέγερσης που προκάλεσε την αρχική διέγερση.

γ. *Με μεταφορά της διέγερσης σε γειτονικά μόρια.* Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι εάν η αποδιέγερση συμβεί με τους δύο πρώτους τρόπους, δεν είναι δυνατό να παραχθεί φωτοχημικό έργο. Αυτό σημαίνει ότι η ενέργεια του quantum που απορροφήθηκε από το μόριο στόχο δεν μπορεί να προκαλέσει χημική αλλαγή, αλλά χάνεται με τη μορφή είτε ακτινοβολίας, είτε θερμότητας (Αιβαλάκας, κ.α., 2003).

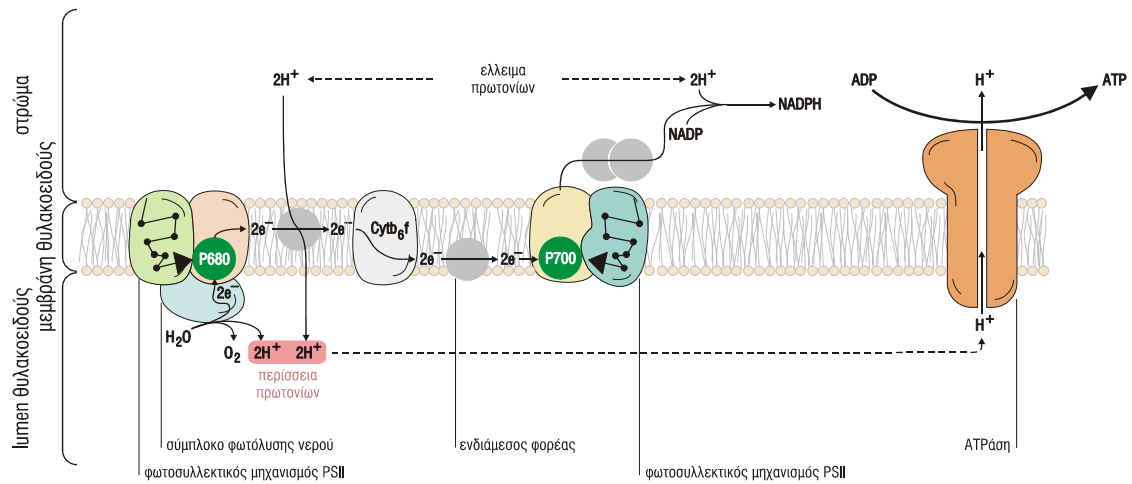
Η απορρόφηση φωτεινής ακτινοβολίας μπορεί να καταλήξει σε μια φωτοχημική αντίδραση στην οποία δεν παίρνει μέρος το αρχικό μόριο στόχος που απορρόφησε το quantum. Το δεδομένο αυτό οδηγεί αναπόφευκτα στο συμπέρασμα ότι η ενέργεια διέγερσης ενός μορίου μπορεί να μεταφερθεί σε γειτονικό μόριο, με αποτέλεσμα την αποδιέγερση του πρώτου και την διέγερση του δεύτερου μορίου (Αιβαλάκας, κ.α., 2003).

Αποδιέγερση μπορεί να συμβεί όμως με την απόδοση του διηγεργμένου ηλεκτρονίου σε ένα γειτονικό κατάλληλο μόριο-δέκτη, οπότε επισυμβαίνει μεταφορά ηλεκτρονίου. Με τον μηχανισμό αυτόν δημιουργείται διαχωρισμός φορτίου, το αρχικό μόριο οξειδώνεται και φορτίζεται θετικά ενώ το μόριο δέκτης ανάγεται και φορτίζεται αρνητικά. Το φορτισμένο πλέον μόριο της χρωστικής μπορεί να επανέλθει στην αρχική του κατάσταση με απόσπαση ενός ηλεκτρονίου από ένα τρίτο γειτονικό μόριο (Taiz and Zeiger, 1998). Η ολοκλήρωση της διαδικασίας έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φωτοχημικού έργου μέσω μιας οξειδοαναγωγικής αντίδρασης, με ταυτόχρονη επαναφορά του μορίου της χρωστικής στην αρχική του κατάσταση. Η διέγερση μπορεί να ξεκινήσει από οποιονδήποτε φωτοδέκτη, όπως π.χ. χλωροφύλλη, καροτενοειδή,

φυτόχρωμα, κ.λ.π. Τελικά στη φωτοσύνθεση, η διέγερση μιας ειδικής μορφής χλωροφύλλης *a* (Chl*a*) προκαλεί διαχωρισμό φορτίου με αποτέλεσμα ηλεκτρόνια να αποσπώνται από το νερό και να μεταφέρονται στο NADP⁺ το οποίο ανάγεται προς NADPH. Η μεταφορά των ηλεκτρονίων πραγματοποιείται μέσω διαδοχικών οξειδώσεων και αναγωγών ενδιάμεσων φορέων, δηλαδή μέσω της λεγόμενης φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Αιβαλάκης, κ.α., 2003).

Για την ολοκλήρωση των φωτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης λειτουργούν και συνεργάζονται μεταξύ τους δύο φωτοσυστήματα, το φωτοσύστημα I (PS I) και το φωτοσύστημα II (PS II) (Lawlor, 2001).

Κάθε φωτοσύστημα διαθέτει ένα φωτοχημικό κέντρο αντίδρασης, δηλαδή ένα διαμεμβρανικό σύμπλοκο πρωτεϊνών στο οποίο εδράζεται ένα μόριο Chl*a* ειδικής μορφής και στο οποίο συμβαίνει ο διαχωρισμός φορτίου. Τα κέντρα αντίδρασης των PSII και PSI ονομάζονται P680 και P700 αντίστοιχα, από τα μέγιστα απορρόφησης τα οποία παρουσιάζουν (εικόνα3). Οι ελαφρά τροποποιημένες ιδιότητες του μορίου Chl*a* των δύο κέντρων αντίδρασης οφείλονται στις διαφορετικές μορφές των πρωτεϊνών με τις οποίες σχηματίζονται τα σύμπλοκα. Κάθε κέντρο αντίδρασης διαθέτει ένα κατάλληλο φωτοσυλλεκτικό μηχανισμό ή αντένα φωτοσυλλογής. Ο φωτοσυλλεκτικός μηχανισμός απαρτίζεται από πολυάριθμα σύμπλοκα πρωτεϊνών-βοηθητικών φωτοσυνθετικών χρωστικών (Chl*a*, Chl*b*, καροτενοειδή), τα λεγόμενα LHC (Light Harvesting Complexes). Οι βοηθητικές φωτοσυνθετικές χρωστικές δεν συμμετέχουν άμεσα στο διαχωρισμό φορτίου αλλά απορροφούν φωτόνια, διεγείρονται και μεταφέρουν τη διέγερση προς το κέντρο αντίδρασης. Η κατάλληλη τοποθέτηση στο χώρο, σε συνδυασμό με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά διέγερσης κάθε επί μέρους μορίου βοηθητικής φωτοσυνθετικής χρωστικής στο φωτοσυλλεκτικό μηχανισμό καθιστά την απορρόφηση φωτονίων και τη διέγερση των κέντρων αντίδρασης εξαιρετικά αποτελεσματική. Αφενός μεν αυξάνεται η ενεργός επιφάνεια, αφετέρου δίδεται η δυνατότητα απορρόφησης και φωτονίων τα οποία δεν απορροφώνται αποδοτικά από τα μόρια Chl*a* των φωτοχημικών κέντρων αντίδρασης (Αιβαλάκης, κ.α., 2003). Οι χρωστικές στο φωτοσυλλεκτικό μηχανισμό είναι κατάλληλα διευθετημένες, ώστε απορρόφηση ενός φωτονίου από ένα μόριο χρωστικής να μεταφέρει τη διέγερση αναγκαστικά προς το κέντρο αντίδρασης (Lawlor, 2001).



Εικόνα 3. Η διεύθυνση των κυριότερων πρωτεϊνικών συμπλόκων στη μεμβράνη των θυλακοειδών των grana.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, από τη στιγμή που ένα μόριο βοηθητικής φωτοσυνθετικής χρωστικής συλλαμβάνει την ενέργεια ενός φωτονίου μέχρι να διεγερθεί το φωτοχημικό κέντρο αντίδρασης μπορεί να μεσολαβήσει ένας μεγάλος αριθμός μεταφορών διέγερσης από μόριο σε μόριο. Κατά τη μεταφορά της διέγερσης ένα ποσοστό της ενέργειας (περίπου 10%) χάνεται με τη μορφή θερμικών απωλειών (Αιβαλάκης, κ.α., 2003).

Όταν ένα φωτόνιο απορροφάται από το φωτοσυλλεκτικό μηχανισμό του PSII, το μόριο Chl_a του ενεργού κέντρου διεγείρεται και προκαλείται διαχωρισμός φορτίου με αποτέλεσμα ένα ηλεκτρόνιο να μεταφέρεται σε ένα διπλανό μόριο (πρωταρχικό δέκτη). Το ηλεκτρόνιο αυτό αναπληρώνεται μέσω της φωτόλυσης του νερού, επομένως το νερό αποτελεί τον πρωταρχικό δότη ηλεκτρονίων στην όλη διαδικασία (Αιβαλάκης, κ.α., 2003).

Κατά συνέπεια το μόριο της Chl_a του φωτοχημικού κέντρου επανέρχεται στη βασική κατάσταση και η διαδικασία μπορεί πλέον να επαναληφθεί. Η διάσπαση των μορίων νερού καταλύεται από το σύμπλοκο φωτόλυσης του νερού, ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο στενά συνδεδεμένο με το κέντρο αντίδρασης του PSII και προσανατολισμένο προς τη πλευρά της κοιλότητας του θυλακοειδούς (Lawlor, 2001, Αιβαλάκης, et al., 2003).

Τα ηλεκτρόνια από το PSII μεταφέρονται μέσω αλληπάλληλων οξειδώσεων και αναγωγών των ενδιάμεσων φορέων προς το ενεργό κέντρο του PSI. Ο σημαντικότερος ενδιάμεσος φορέας είναι το σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων (cyt b₆f). Στο PSI η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Η απορρόφηση ενός φωτονίου από τις βοηθητικές χρωστικές του φωτοσυλλεκτικού μηχανισμού του PSI προκαλεί διέγερση και διαχωρισμό

φορτίου στο ενεργό κέντρο (P700). Ένα ηλεκτρόνιο αποσπάται από το μόριο του P700 το οποίο μέσω μιας αλυσίδας ενδιάμεσων φορέων ανάγει τον τελικό αποδέκτη, δηλαδή το NADP. Στην περίπτωση ωστόσο του PSI το ηλεκτρόνιο το οποίο αποσπάστηκε από το ενεργό κέντρο δεν αντικαθίσταται μέσω της φωτόλυσης του νερού, αλλά προσλαμβάνεται μέσω των ενδιάμεσων φορέων από το φωτοσύστημα II. Συνεπώς η συνολική διαδικασία περιλαμβάνει σύνδεση των δύο φωτοσυστημάτων εν σειρά και ροή ηλεκτρονίων από το νερό προς το NADP⁺ (Αιβαλάκης, κ.α., 2003) (εικόνα 3).

Η ροή των ηλεκτρονίων από φορέα σε φορέα στην όλη διαδικασία αποτελεί μια αυθόρμητη διαδικασία είναι δηλαδή ενεργειακά δυνατή, εκτός από τα σημεία στα οποία γίνεται διαχωρισμός φορτίου στα ενεργά κέντρα των δύο φωτοσυστημάτων. Στα σημεία αυτά η μεταφορά ηλεκτρονίου γίνεται δυνατή επειδή εισάγεται επίπλέον ενέργεια στο σύστημα με τη μορφή φωτεινής ακτινοβολίας, δηλαδή των φωτονίων που απορροφώνται. Με τον τρόπο αυτό γίνεται δυνατή η αναγωγή του NADPH και η σύνθεση ATP, δύο βιοχημικές αντιδράσεις που απαιτούν υψηλά ποσά ενέργειας για να ολοκληρωθούν (Hall and Rao, 1999).

Η απορρόφηση φωτονίων από τα φωτοχημικά κέντρα αντίδρασης και η επακόλουθη αναγωγή του NADP⁺ προς NADPH έχει δύο σημαντικές επιπτώσεις. Κατ' αρχάς μόρια νερού διασπώνται, με συνέπεια να απελευθερώνονται πρωτόνια μέσα στην κοιλότητα του θυλακοειδούς και μοριακό οξυγόνο, το οποίο διαφεύγει ως παραπροϊόν.

Επιπλέον, η ροή των ηλεκτρονίων δια μέσου των ενδιάμεσων φορέων προκαλεί διαφορά στην συγκέντρωση των πρωτονίων (pH) μεταξύ της κοιλότητας του θυλακοειδούς και του στρώματος, δηλαδή των δύο περιοχών που οριοθετεί η μεμβράνη των θυλακοειδών. Η διαφορά pH δημιουργείται για δύο κυρίως λόγους:

α. Η συγκέντρωση των πρωτονίων στην κοιλότητα του θυλακοειδούς αυξάνεται λόγω της παραγωγής τους κατά τη φωτόλυση των μορίων νερού αλλά και της μεταφοράς τους από τη περιοχή του στρώματος κατά τη διάρκεια της φωτοσυνθετικής ροής των ηλεκτρονίων.

β. Η συγκέντρωση των πρωτονίων στην περιοχή του στρώματος τείνει να μειωθεί λόγω της αναγωγής του NADP⁺ σε NADPH (Αιβαλάκης, κ.α., 2003).

Η διαφορά στο pH που δημιουργείται με τον τρόπο αυτό μεταξύ των δύο διαμερισμάτων του χλωροπλάστη αντιπροσωπεύει ελεύθερη ενέργεια η οποία μπορεί να αξιοποιηθεί για τη σύνθεση ATP. Η σύνθεση του ATP

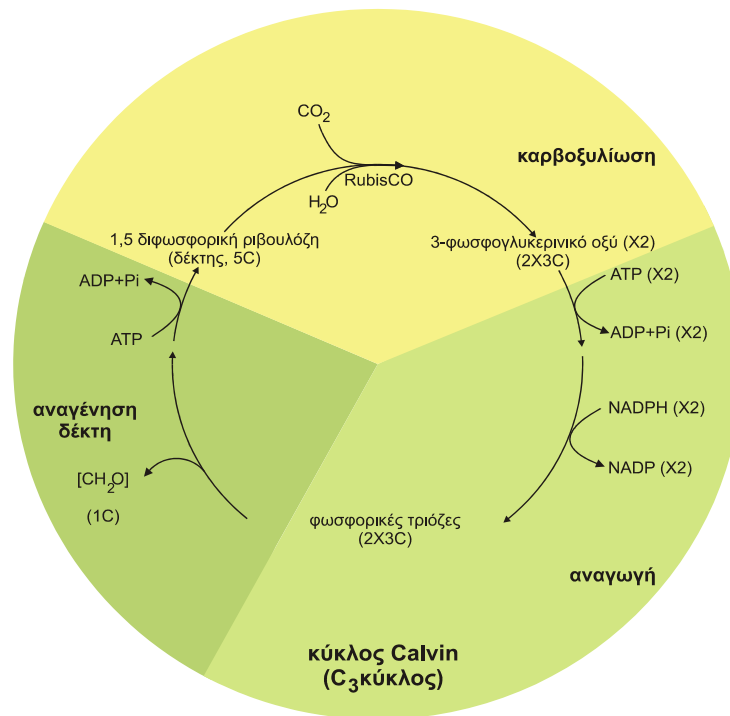
πραγματοποιείται λόγω μιας αντίστροφης–αυθόρμητης εκροής πρωτονίων από την κοιλότητα του θυλακοειδούς προς το στρώμα η οποία τείνει να εξισορροπήσει τη διαφορά pH που έχει ήδη δημιουργηθεί. Επειδή η μεμβράνη των θυλακοειδών είναι ουσιαστικά αδιαπέραστη στα πρωτόνια, η εκροή πρωτονίων συμβαίνει μέσω ειδικών πρωτεϊνικών καναλιών τα οποία εντοπίζονται στη μεμβράνη των θυλακοειδών. Πρόκειται για τα διαμεμβρανικά σύμπλοκα της συνθετάσης του ATP (εικόνα 3). Η ροή πρωτονίων δια μέσου των καναλιών αυτών παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για τη φωσφορυλίωση του ADP προς ATP. Η όλη επομένως ροή ηλεκτρονίων στη φωτοσύνθεση, η οποία οφείλεται στην απορρόφηση φωτονίων από τη χλωροφύλλη των φωτοχημικών κέντρων δημιουργεί τις προϋποθέσεις και για την ολοκλήρωση της φωτοφωσφορυλίωσης, της σύνθεσης δηλαδή ATP από τη συνθετάση του ATP των μεμβρανών των θυλακοειδών (Αιβαλάκης, κ.α., 2003). Το ATP που παράγεται, όπως και το NADPH, απελευθερώνονται στη περιοχική του στρώματος ώστε να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση υδατανθράκων (Andersson and Barber, 1996).

1βδ. Οι σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης

Τα πλούσια σε ενέργεια προϊόντα των φωτεινών αντιδράσεων, ATP και NADPH μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολυάριθμες βιοχημικές αντιδράσεις σύνθεσης και μεταφοράς, η προώθηση των οποίων απαιτεί τη δαπάνη ενέργειας. Ένα σημαντικό μέρος της ενέργειας των ATP και NADPH καταναλώνεται για τη δέσμευση του CO₂ της ατμόσφαιρας και την αναγωγή του μέχρι το επίπεδο του υδατάνθρακα (φωτοσυνθετική αφομοίωση του CO₂). Αυτό σημαίνει ότι, η ενέργεια που παράγεται στις φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης καταναλώνεται για τη δημιουργία του ανθρακικού σκελετού των φυτικών οργανισμών, δηλαδή την παραγωγή βιομάζας (Αιβαλάκης, κ.α., 2003). Έως σήμερα είναι γνωστές τρεις κύριες βιοχημικές παραλλαγές του φωτοσυνθετικού μεταβολισμού του άνθρακα (Hall and Rao, 1999).

α. Η C₃ φωτοσύνθεση της οποίας η ονομασία υποδηλώνει ότι το πρώτο προϊόν της δέσμευσης του CO₂ είναι μία ένωση με τρία άτομα άνθρακα (3-φωσφογλυκερινικό οξύ, 3PGA).

β. Η C₄ φωτοσύνθεση στην οποία το πρώτο προϊόν της δέσμευσης του CO₂ είναι μία ένωση με τέσσερα άτομα άνθρακα (οξαλοξικό οξύ), και



Εικόνα 4. Ο κύκλος του Calvin συνίσταται από τρία στάδια με τελική κατάληξη την αφομοίωση και αναγωγή ενός μορίου CO₂ και την αναγέννηση του αρχικού υποστρώματος.

γ. Ο μεταβολισμός οξέων τύπου Crassulaceae (CAM) η ονομασία του οποίου οφείλεται στο γεγονός ότι ο τρόπος αυτός δέσμευσης παρατηρήθηκε αρχικά σε παχύφυτα, μέλη της οικογένειας Crassulaceae (Αιβαλάκις, κ.α., 2003).

Στη C₃ φωτοσυνθετική οδό το CO₂ δεσμεύεται και στη συνέχεια ανάγεται έως το επίπεδο του υδατάνθρακα μέσω μιας κυκλικής διαδικασίας, η οποία ονομάζεται αναγωγικός κύκλος των φωσφοπεντοζών (RPPC) ή κύκλος του Calvin (εικόνα 4). Το CO₂ μετατρέπεται σε φωσφορυλιωμένα (ενεργοποιημένα) σάκχαρα ενώ ταυτόχρονα ο δέκτης του CO₂ (η 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη, μια πεντόζη) αναγεννάται. Ο κύκλος αυτός λειτουργεί σε όλους τους φωτοσυνθετικούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς καθώς και σε ορισμένους προκαρυωτικούς. Η όλη πορεία περιλαμβάνει επί μέρους αντιδράσεις οι οποίες καταλύονται από υδατοδιαλυτά ένζυμα που εντοπίζονται στο στρώμα των χλωροπλαστών (Αιβαλάκις, κ.α., 2003). Ο κύκλος Calvin δεν περιλαμβάνει φωτοχημικές αντιδράσεις, ωστόσο η λειτουργία του εξαρτάται άμεσα από τον εφοδιασμό σε ATP και NADPH (τα προϊόντα των φωτεινών αντιδράσεων) καθώς και σε CO₂. Ο κύκλος περιλαμβάνει τρία επί μέρους στάδια: καρβοξυλίωση, αναγωγή και αναγέννηση του δέκτη.

Στο αρχικό και καθοριστικό στάδιο του κύκλου το CO₂ ενσωματώνεται με τη μορφή μιας καρβοξυλομάδας στο μόριο-δέκτη, την 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη και παράγονται, ως το πρώτο προϊόν, δύο μόρια 3-φωσφογλυκερινικού οξέος. Την αντίδραση καταλύει το ένζυμο καρβοξυλάση-οξυγενάση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης (RubisCO). Στο δεύτερο στάδιο το 3PGA ανάγεται προς φωσφορικές τριόζες (3-φωσφορική γλυκεριναλδεύδη ή φωσφορική διϋδροξυακετόνη) με κατανάλωση ATP και NADPH. Με την ολοκλήρωση του σταδίου αυτού το CO₂ έχει πλέον αναχθεί στο επίπεδο του υδατάνθρακα με κέρδος μια υδατανθρακική μονάδα, ενώ για κάθε έξι περιστροφές του κύκλου το καθαρό προϊόν είναι ένα μόριο εξόζης. Στο τρίτο στάδιο επιτελούνται μια σειρά από αντιδράσεις, οι οποίες είναι απαραίτητες για την αναγέννηση του μορίου-δέκτη. Στο στάδιο αυτό καταναλώνεται ενέργεια με τη μορφή ATP. Με τη συμπλήρωση και του τρίτου σταδίου ο κύκλος Calvin έχει ολοκληρωθεί και η 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη είναι διαθέσιμη εκ νέου ως υπόστρωμα της RubisCO (Taiz and Zeiger, 1998).

2. Φωτοπαρεμπόδιση

Η απορρόφηση της ορατής φωτεινής ακτινοβολίας από τη φωτοσυνθετική συσκευή των φυτών είναι άμεσα συνδεδεμένη και εναρμονισμένη με τη χρησιμοποίηση του παραγόμενου φωτοχημικού έργου σε βιοσυνθετικές οδούς. Ωστόσο σε υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας η παραγόμενη ενέργεια από τις φωτοχημικές αντιδράσεις υπερβαίνει κατά πολύ τις ανάγκες χρήσης της από τις αναβολικές διαδικασίες (Hall and Rao, 1999). Το γεγονός αυτό μπορεί να προκαλέσει διαταραχές στην φωτοσυνθετική λειτουργία. Ιδιαίτερα σε φυτά τα οποία δεν έχουν προσαρμοστεί σε περιβάλλοντα άπλετου φωτισμού, η έκθεση σε υψηλές εντάσεις φωτεινής ακτινοβολίας συνήθως επιφέρει αρχικά ισχυρή ελάττωση της φωτοσυνθετικής ταχύτητας χωρίς όμως να παρατηρείται ελάττωση στον μεγάλο όγκο των φωτοσυνθετικών χρωστικών (Καραμπουρνιώτης, 2003; Choudhury and Behera, 2001) , η οποία συνοδεύεται και από ελάττωση της απόδοσης ανά φωτόνιο. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται φωτοπαρεμπόδιση. Η φωτοπαρεμπόδιση παρουσιάζεται τόσο σε φυτά τα οποία είναι υποχρεωτικά σκιάφυτα, όσο και σε ηλιόφυτα, στα οποία μετά από μία περίοδο φωτισμού με ασθενείς εντάσεις φωτεινής ακτινοβολίας παρέχεται αιφνίδιος φωτισμός υψηλής έντασης. Το φαινόμενο της φωτοπαρεμπόδισης κάνει επίσης εποχιακή εμφάνιση σε φυτά τα οποία διαβιώνουν στον υπόροφο δασών φυλλοβόλων δένδρων, αλλά και παροδική στη διάρκεια της ημέρας με την είσοδο

ακτινοβολίας διαμέσου του υπερκείμενου φυλλώματος, λόγω μετακίνησής του ή μεταβολής της γωνίας πρόσπτωσης των ηλιακών ακτίνων. Το φάσμα δράσης της φωτοπαρεμπόδισης υποδεικνύει ότι η δυσλειτουργία αυτή προξενείται από την απορρόφηση φωτονίων από τα μόρια της χλωροφύλλης (Καραμπουρνιώτης, 2003).

Σε επίπεδο ιστών οι υψηλές εντάσεις φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας αποτελούν μόνιμο παράγοντα καταπόνησης για τους χλωροπλάστες των εξωτερικών στοιβάδων του δρυφρακτοειδούς παρεγχύματος σε φύλλα τα οποία εκτίθενται συνεχώς σε άπλετο φως.

Σε υψηλές εντάσεις φωτεινής ακτινοβολίας η αφομοίωση CO₂ περιορίζεται, επειδή ο υπάρχων βιοχημικός εξοπλισμός μεταφοράς ηλεκτρονίων και του κύκλου του Calvin δεν επαρκεί ώστε να καταναλωθεί η πλεονάζουσα ενέργεια. Φωτοπαρεμπόδιση μπορεί επίσης να παρατηρηθεί ακόμη και σε μέτριες εντάσεις φωτεινής ακτινοβολίας, όταν π.χ. σε συνθήκες μέτριας υδατικής καταπόνησης αυξάνεται η αντίσταση των στομάτων και επομένως περιορίζεται η παροχή CO₂. Στις συνθήκες αυτές η φωτοσυνθετική ροή των ηλεκτρονίων διακόπτεται, ενώ οι ενδιάμεσοι φορείς μεταφοράς των ηλεκτρονίων παραμένουν σε ανηγμένη μορφή (Καραμπουρνιώτης, 2003). Τα πλεονάζοντα ηλεκτρόνια στα φωτοχημικά κέντρα μπορούν πλέον να προκαλέσουν αλλοιώσεις της δομής των πρωτεϊνών. Οι τελευταίες σχηματίζουν σύμπλοκα με την Ch1a, η οποία καταστρέφεται με ρυθμούς ταχύτερους εκείνων μέσω των οποίων συντίθεται. Η φωτοπαρεμπόδιση έχει ως πρωταρχικό στόχο το PSII, διότι αυτό μπορεί να παράγει πολύ ισχυρά οξειδωτικά, αφού η δημιουργία τους αποτελεί την ενεργειακή προϋπόθεση για τη διάσπαση του μορίου του νερού (Andersson and Barber, 1996). Πιο συγκεκριμένα, το φαινόμενο της φωτοπαρεμπόδισης εμφανίζεται όταν ο ρυθμός της μεταφοράς της ενέργειας διέγερσης από την αντένα στο ενεργό κέντρο του φωτοσυστήματος ξεπερνά τον αντίστοιχο ρυθμό της μεταφοράς της από το ενεργό κέντρο στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η πλεονάζουσα ενέργεια η οποία παράγεται ως φωτοχημικό έργο από τα σύμπλοκα των φωτοσυνθετικών χρωστικών των θυλακοειδών διατίθεται πλέον σε φωτοχημικές αντιδράσεις μέσω των οποίων παράγονται τοξικά προϊόντα όπως υπεροξειδικό ανιόν, οξυγόνο σε κατάσταση απλότητας και ρίζες υδροξυλίου. Τα προϊόντα αυτά προκαλούν ανεξέλεγκτες οξειδώσεις λιπιδίων, πρωτεϊνών, νουκλεϊνικών οξέων, αποχρωματισμό χλωροφυλλών και καροτενοειδών με αποτέλεσμα την φωτοξείδωση και καταστροφή τους (Choudhury and Behera, 2001). Έτσι, σε

πρώτο στάδιο η έκθεση σε υψηλή ένταση ακτινοβολίας προκαλεί καταστροφή των θυλακοειδών και οδηγεί σε μείωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης. Στο δεύτερο στάδιο, όταν η έκθεση των φυτών σε ισχυρή ακτινοβολία έχει μεγάλη διάρκεια, προκαλείται φωτοοξειδωση των χρωστικών η οποία σχετίζεται με τον αποχρωματισμό των χρωστικών της αντένας (Choudhury and Behera, 2001). Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα παρουσία οξυγόνου.

Η φωτοπαρεμπόδιση στο PSII ερμηνεύεται με δύο διαφορετικούς μηχανισμούς (Andersson and Barber, 1996). Ο πρώτος αφορά στην καταστροφή της αναγωγικής πλευράς του PSII και πιο συγκεκριμένα στο σημείο πρόσδεσης των πλαστοκυανινών Q_A ή Q_B και καλείται μηχανισμός σημείου δέκτη (acceptor site mechanism) ενώ ο άλλος αφορά στην καταστροφή της οξειδωτικής πλευράς του PSII, καταστροφή η οποία εμποδίζει το διαχωρισμό φορτίου και καλείται μηχανισμός σημείου δότη (donor side mechanism) (Hall and Rao, 1999). Η φωτοπαρεμπόδιση που προέρχεται από την πλευρά του δέκτη, προκαλείται όταν η ένταση της ακτινοβολίας υπερβαίνει τη χωρητικότητα της αλυσίδας φωτοσυνθετικής μεταφοράς ηλεκτρονίων. Ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει ανασυνδιασμό του ζεύγους ριζών $P680^+$ Pheo- (Vass et al., 1992) όπου το $P680^+$ αποτελεί τον πρωταρχικό δότη στο PSII, ενώ η φαιοφυτίνη Pheo- αποτελεί τον πρωταρχικό δέκτη στο PSII (Andersson and Barber, 1996). Στην συνέχεια, μεταφέρονται ηλεκτρόνια με ταχείς ρυθμούς από την Pheo- στο Q_A (ως τον επόμενο δέκτη ηλεκτρονίων) με αποτέλεσμα η πλαστοκυανίνη να υπερανάγεται στο επίπεδο Q_AH_2 (με δύο ηλεκτρόνια) και όχι στην φυσιολογική της μορφή Q_AH (με ένα ηλεκτρόνιο), φαινόμενο το οποίο παρεμποδίζει προσωρινά την μεταφορά ηλεκτρονίων από το ενεργό κέντρο στο Q_A . Έτσι στο ενεργό κέντρο παράγεται $P680-Chl$ στην κατάσταση διέγερσης τριπλότητας, το οποίο κάτω από αερόβιες συνθήκες συμπεριφέρεται σαν μοριακό οξυγόνο, δεν μπορεί να αποσβεστεί από τα καροτενοειδή και σχηματίζει οξυγόνο στην κατάσταση διέγερσης απλότητας (Hall and Rao, 1999). Εκτός αυτών στις συνθήκες αυτές, η πρωτεΐνη D1, η οποία προσδένεται στην πλαστοκυανίνη Q_B τροποποιείται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να ευνοείται η πρωτεολυτική της αποδόμηση (Andersson and Barber, 1996). Έτσι, τόσο η συνεχής αφομοίωση του διοξειδίου του άνθρακα, όσο και η θερμική απόσβεση της πλεονάζουσας ενέργειας έχουν την ικανότητα να μειώνουν το ανηγμένο κλάσμα του πρωταρχικού δέκτη ηλεκτρονίων, της πλαστοκυανίνης Q_A με τελικό αποτέλεσμα την μείωση της ενεργειακής πίεσης στο PSII (Maxwell et al., 1995).

Από την άλλη πλευρά, ο μηχανισμός της πλευράς του δότη δεν εξαρτάται από την παρουσία του οξυγόνου και είναι αποτέλεσμα της καταστροφής που προκαλείται από την απώλεια της ικανότητας του συμπλόκου οξειδωσης του νερού να παραχωρεί ηλεκτρόνια στο ενεργό κέντρο του P680, λόγω της υψηλής έντασης ακτινοβολίας (Biswal and Biswal 1999, Minkov et al. 1999). Κάτω από τέτοιες συνθήκες, το σύμπλοκο φωτόλυσης του νερού παρουσιάζεται ανίκανο να διατηρήσει τον ρυθμό με τον οποίο μεταφέρονται τα ηλεκτρόνια από το P680 προς τους δέκτες της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Αυτό οδηγεί στην παραγωγή του P680⁺ (Thompson and Brudvig, 1988). Ακολούθως το P680⁺ αφαιρεί ηλεκτρόνια από το γύρω περιβάλλον, φαινόμενο το οποίο οδηγεί σε καταστροφή της πρωτεΐνης D₁ του φωτοχημικού κέντρου P680, η οποία συμμετέχει στο σύμπλοκο LHC, και του β-καροτενίου, παραγόντων που συνδέονται με το φωτοχημικό κέντρο του PSII (Barber, 1994). Αξίζει να τονιστεί ότι η πρωτεΐνη D₁ του φωτοχημικού κέντρου του PSII αποτελεί ένα από τα συστατικά της φωτοσυνθετικής συσκευής που επηρεάζονται περισσότερο, καθώς καταστρέφεται με ταχύτερους ρυθμούς από εκείνους με τους οποίους συντίθεται (Mattoo et al. 1984, Reisman and Ohad 1986, Jegerschöld et al., 1990; Aro et al., 1993; Critchley and Russell 1994; Anderson et al., 1997; Minkov et al., 1999). Παρόλα αυτά, η πρωτεΐνη D₁ του PSII διαθέτει τον υψηλότερο ρυθμό αναπλήρωσης αποθεμάτων (turnover rate) μέσω εκ νέου σύνθεσης ανάμεσα στις πρωτεΐνες των χλωροπλαστών, και συνεπώς θα μπορούσε να αποτελέσει τον κύριο παράγοντα για την αποκατάσταση των καταστροφών του φωτοσυστήματος από την φωτοπαρεμπόδιση της ακτινοβολίας στο PSII (Minkov et al., 1999; Hall and Rao, 1999).

Η έκθεση των χλωροπλαστών σε υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας μπορεί να παρεμποδίσει και την μεταφορά ηλεκτρονίων στο PSI. Ωστόσο η έκταση της παρεμπόδισης είναι μικρότερη από εκείνη που προκαλείται στο PSII (Prášil et al., 1992; Choudhury et al., 1993; Choudhury et al., 1994). Ο στόχος της παρεμπόδισης βρίσκεται κοντά στο ενεργό κέντρο του PSI. Τα προϊόντα που προκύπτουν από τον διαχωρισμό του φορτίου στο PSI ανασυνδιάζονται, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό του P700 σε κατάσταση διέγερσης τριπλότητας (³P700*) γεγονός που οδηγεί στην παραγωγή του ¹O₂ (Sonoike et al., 1994). Ακολούθως, οι ενεργές ρίζες οξυγόνου που δημιουργούνται από την ³Chl*, καταστρέφουν τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό του PSI κατά τρόπο ανάλογο με του PSII (Choudhury and Behera, 2001).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι, η φωτοπαρεμπόδιση του φωτοσυστήματος II *in vivo* συχνά θεωρείται περισσότερο ως μια φωτοπροστατευτική στρατηγική παρά ως μια καταστρεπτική διαδικασία (Choudhury and Behera, 2001). Γενικά, ο υπερκορεσμός των φωτοχημικών κέντρων μέσω υπερδιέγερσης εκφράζεται με μία χαρακτηριστική αύξηση του φθορισμού της χλωροφύλλης. Παράλληλα παρουσιάζεται πτώση του λόγου F_m/F_v .

Το φαινόμενο της φωτοπαρεμπόδισης εντείνεται από την δράση και άλλων παραγόντων καταπόνησης (π.χ. κλείσιμο των στομάτων λόγω έλλειψης νερού, αποδραστηριοποίηση ενζύμων, έλλειψη απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων ή χαμηλές θερμοκρασίες) (Sonoike et al., 1994) σε συνδυασμό με υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας οι οποίοι παρεμποδίζουν, εν μέρει ή στο σύνολό τους, τους βιοχημικούς μηχανισμούς της φωτοσύνθεσης.

3. Φωτοπροστασία

Η αποφυγή των επιπτώσεων από την υπερβολική παροχή ενέργειας στα φωτοχημικά κέντρα επιτυγχάνεται μέσω ορισμένων μηχανισμών προστασίας.

3α. Ανατομικά χαρακτηριστικά των φύλλων που συμβάλλουν στην φωτοπροστασία

Σε μορφολογικό-ανατομικό επίπεδο ορισμένα χαρακτηριστικά δίδουν την ικανότητα αποφυγής της έκθεσης της φωτοσυνθετικής συσκευής σε υπερβολικές εντάσεις φωτεινής ακτινοβολίας. Στα χαρακτηριστικά αυτά περιλαμβάνονται κατάλληλες κινήσεις ή κυλινδρισμός των φύλλων και μετακινήσεις των χλωροπλαστών στα κύτταρα. Η ύπαρξη πυκνού τριχώματος, πεπαχυσμένων κυτταρικών τοιχωμάτων των επιδερμικών και υποδερμικών κυττάρων, και κατάλληλων χρωστικών (π.χ. ανθοκυανών), συμβάλλει στην αποφυγή της έκθεσης των υποκείμενων φωτοσυνθετικών ιστών σε υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας (Gould et al., 2002; Steyn et al., 2002).

3β. Φυσιολογικά χαρακτηριστικά των φύλλων που συμβάλλουν στην φωτοπροστασία. Ο κύκλος των ξανθοφυλλών.

Για την διατήρηση της λειτουργίας των χλωροπλαστών, σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας, τα φυτά αναπτύσσουν ορισμένες φωτοπροστατευτικές στρατηγικές (Choudhury and Behera, 2001). Σε

βιοχημικό επίπεδο, τίθενται σε κίνηση ορισμένοι μηχανισμοί απόσβεσης της πλεονάζουσας ενέργειας των φωτοχημικών κέντρων :

α. Χρησιμοποίηση του παραγόμενου φωτοχημικού έργου για την αναγωγή οργανικών μορίων (κυρίως μέσω του κύκλου του Calvin).

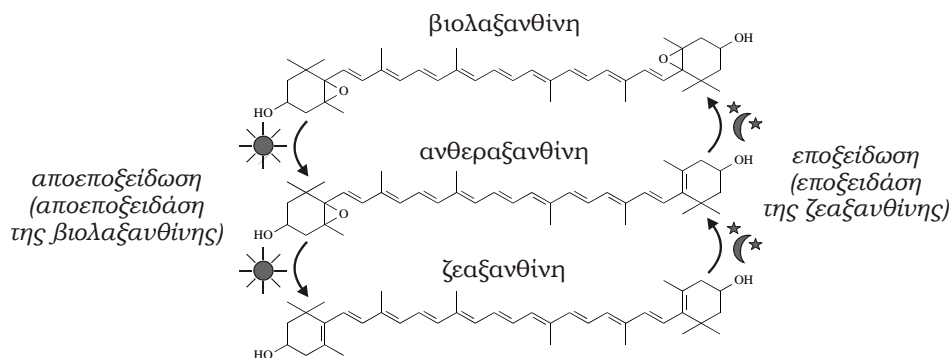
β. Επανεκπομπή των φωτονίων με τη μορφή φθορισμού.

γ. Κατανάλωση της πλεονάζουσας ενέργειας με τη μορφή ATP σε μεταβολικές διαδικασίες μέσω των οποίων δεν παράγονται ανηγμένα μόρια. Στις διαδικασίες αυτές περιλαμβάνονται η φωτοαναπνοή, η ενεργητική μεταφορά ιόντων και η αντίδραση Mehler.

δ. Η πλεονάζουσα ενέργεια των φωτοσυστημάτων αποσβαίνει με τη μορφή απωλειών θερμότητας (θερμική απόσβεση) (Καραμπουρνιώτης, 2003).

Ο πρώτος μηχανισμός αφορά σε φωτοχημική απόσβεση (qP), ενώ οι επόμενοι τρεις σε μη φωτοχημική απόσβεση (qNP). Ωστόσο οι μηχανισμοί αυτοί σε ορισμένες περιπτώσεις δεν παρέχουν επαρκή προστασία έναντι της φωτοοξειδωσης της φωτοσυνθετικής συσκευής. Η αδυναμία των μηχανισμών προστασίας σε συνθήκες καταπόνησης από υψηλές εντάσεις φωτεινής ακτινοβολίας αντισταθμίζεται με τη δραστηριοποίηση μηχανισμών επιδιόρθωσης των ζημιών οι οποίες έχουν προκύψει. Συνήθως περιλαμβάνουν αναπλήρωση ενζυμικών μορίων ή/και χρωστικών με *de novo* σύνθεσή τους (Καραμπουρνιώτης, 2003).

Ο τέταρτος μηχανισμός αφορά κυρίως στον κύκλο των ξανθοφυλλών (εικόνα 5), ο οποίος παρέχει τη δυνατότητα απόσβεσης της ενέργειας διέγερσης μέσω ορισμένων καροτενοειδών. Τα καροτενοειδή εκτελούν βασικούς φωτοπροστατευτικούς ρόλους στους χλωροπλάστες δεδομένου ότι προκαλούν απόσβεση της χλωροφύλλης στην κατάσταση διέγερσης τριπλότητας, και αποτοξίνωση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου ή άλλων ενεργών μορφών οξυγόνου (Choudhury and Behera, 2001), που σχηματίζονται λόγω της έκθεσης σε



Εικόνα 5. Ο κύκλος των ξανθοφυλλών λειτουργεί ως αποσβεστικός μηχανισμός του πλεονάσματος της ενέργειας διέγερσης.

υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας, μέσω εξειδικευμένων αντιδράσεων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η τοπολογία των καροτενοειδών στο φωτοσύστημα II. Το φωτοχημικό κέντρο περιστοιχίζεται από δύο διαφορετικού μεγέθους και σύστασης σύμπλοκα αντενών. Εγγύτερα του φωτοχημικού κέντρου, εντοπίζεται το μικρό σύμπλοκο το οποίο περιλαμβάνει ένα περιορισμένο μόνο κλάσμα της συνολικής χλωροφύλλης, αποτελείται κυρίως από Ch1a και είναι πλούσιο σε συστατικά του κύκλου των ξανθοφυλλών, ενώ εξωτερικά αυτού εδράζεται το μεγάλο σύμπλοκο της αντέννας το οποίο δεσμεύει περισσότερα μόρια χλωροφύλλης και αποτελείται κυρίως από Ch1b. Τα δεδομένα δείχνουν ότι το μεγάλο περιφερειακό σύμπλοκο φωτοσυλλογής πιθανώς να αποτελεί το σημείο στο οποίο λαμβάνει χώρα η εποξειδωση (Demmig-Adams and Adams, 1996).

Σημαντικό ρόλο στην φωτοπροστασία διαδραματίζουν το β-καροτένιο και οι ξανθοφύλλες. Το β-καροτένιο προκαλεί άμεση απόσβεση τόσο των ελεύθερων ριζών οξυγόνου όσο και της χλωροφύλλης στην κατάσταση διέγερσης τριπλότητας, η οποία ευνοεί τον σχηματισμό της ελεύθερης ρίζας οξυγόνου (Cogdell and Frank 1987), ενώ οι ξανθοφύλλες περιορίζουν τον σχηματισμό της χλωροφύλλης στην κατάσταση διέγερσης τριπλότητας αποσβaineοντας την ενέργεια των μορίων σε κατάσταση απλότητας της ($^1\text{Chl}^*$) (Choudhury and Behera, 2001). Οι ξανθοφύλλες, οι οποίες εδράζονται στους χλωροπλάστες έχουν ως κύρια λειτουργία να αυξάνουν την μη φωτοχημική απόσβεση της πλεονάζουσας ενέργειας διέγερσης με την μορφή θερμότητας και να προστατεύουν με τον τρόπο αυτό τους χλωροπλάστες από την καταπόνηση της πλεονάζουσας ακτινοβολίας (Demmig-Adams, 1990; Gilmore and Govindjee, 1999; Bukhov et al., 2001; Grudziński et al., 2001). Η λειτουργία του κύκλου των ξανθοφυλλών επάγεται από ισχυρά όξινο pH στην κοιλότητα των θυλακοειδών (Demmig-Adams and Adams, 1996), καθώς και από την παρουσία ασκορβικού οξέος (Hall and Rao, 1999)

Η επικράτηση συνθηκών φωτοπαρεμπόδισης προκαλεί τη δημιουργία μιας πολύ υψηλής τιμής διαφοράς pH (ΔpH) μεταξύ της κοιλότητας του θυλακοειδούς (χαμηλό pH) και του στρώματος (υψηλό pH) στους χλωροπλάστες. Υπό κανονικές συνθήκες η διαβάθμιση αυτή του pH τροφοδοτεί ενεργειακά τις διαδικασίες φωτοφωσφορυλίωσης και επομένως εξασφαλίζει τη παραγωγή ATP. Ωστόσο σε συνθήκες φωτοπαρεμπόδισης η δημιουργία πολύ υψηλής ΔpH αποτελεί το σήμα κινδύνου το οποίο σηματοδοτεί την έναρξη λειτουργίας των προστατευτικών μηχανισμών (Καραμπουρνιώτης, 2003). Έτσι, η έντονη οξίνιση της κοιλότητας των θυλακοειδών προκαλεί μεταβολές στη

διαμόρφωση των πρωτεϊνών που σχηματίζουν σύμπλοκα με τις χρωστικές στην αντένα φωτοσυλλογής του PSII καθώς και επαναδιευθέτηση των χρωστικών (Καραμπουρνιώτης, 2003). Συνεπώς, τα PSI και PSII μεταπίπτουν από την κατάσταση υψηλής απόδοσης στην κατάσταση φωτοπροστασίας. Λόγω των πολύ χαμηλών τιμών του pH της κοιλότητας του θυλακοειδούς δραστηριοποιείται η απο-εποξειδάση της βιολαξανθίνης, με αποτέλεσμα την ενδομετατροπή της βιολαξανθίνης σε ζεαξανθίνη, μέσω του σχηματισμού της ανθεραξανθίνης (Καραμπουρνιώτης, 2003). Η μετατροπή αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της δέσμευσης ακτινοβολίας από τα συστήματα φωτοσυλλογής (LHC) και στην επακόλουθη διάχυση της ενέργειας (Choudhury and Behera, 2001).

Τα ένζυμα που εμπλέκονται στις ενδομετατροπές στον κύκλο των ξανθοφυλλών είναι η αποεποξειδάση της βιολαξανθίνης (VDE) και η εποξειδάση της ζεαξανθίνης (ZE). Η βιολαξανθίνη μετατρέπεται με αποεποξειδωση σε ζεαξανθίνη με τελική κατάληξη δομικές μεταβολές στα σύμπλοκα LHC (Choudhury and Behera, 2001). Τα παραπάνω φαινόμενα έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την κατευθυνόμενη απόσβεση του φθορισμού της χλωροφύλλης (Choudhury and Behera, 2001).

Πιο συγκεκριμένα, το ένζυμο VDE εκβάλλει προς την κοιλότητα του θυλακοειδούς και μετατρέπει την βιολαξανθίνη σε ζεαξανθίνη όταν η τιμή του pH της κοιλότητας είναι χαμηλή, φαινόμενο το οποίο προκαλείται από υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας. Από την άλλη πλευρά η εποξειδάση της ζεαξανθίνης εκβάλλει προς το στρώμα και καταλύει τον σχηματισμό της βιολαξανθίνης από την ζεαξανθίνη. Με την μετατροπή της βιολαξανθίνης σε ζεαξανθίνη, η πλεονάζουσα ενέργεια στην αντένα του PSII αποσβάζεται με την μορφή θερμότητας (Καραμπουρνιώτης, 2003). Η απόσβεση αυτή αναφέρεται ως ενεργειακά-εξαρτώμενη απόσβεση (q_E) ή ως εξαρτώμενη από την διαβάθμιση του pH, μη-φωτοχημική απόσβεση μέσω φθορισμού της χλωροφύλλης (NPQ) (Demmig-Adams 1990). Είναι αξιοσημείωτη η υπόθεση που υποστηρίζει ότι εκτός από την βιολαξανθίνη και την ζεαξανθίνη σημαντικό ρόλο στην απόσβεση της πλεονάζουσας ενέργειας παίζει και η ανθεραξανθίνη. Η τελευταία εμπλέκεται στον φωτοπροστατευτικό μηχανισμό απόσβεσης, καθώς έχει την ικανότητα να παγιδεύει και να αποσβάζει το πλεόνασμα της ενέργειας διέγερσης των συμπλόκων της αντένας του PSII υπό μορφή θερμότητας (Gilmore et al., 1998; Gilmore and Yamamoto, 2001; Gilmore, 2001). Υπάρχουν δύο θεωρίες που ασχολούνται με την φύση και τον μηχανισμό μέσω του οποίου μια απλή μετατροπή στην σύνθεση των ξανθοφυλλών του LHC

επιηρεάζει την ισορροπία μεταξύ της δέσμευσης φωτονίων και της απόσβεσης της ενέργειας σε διαφορετικές εντάσεις ακτινοβολίας (Young et al. 1997, Horton et al. 1999). Η πρώτη περιγράφει ένα θεωρητικό μοντέλο που βασίζεται στην αυθόρμητη singlet-singlet μεταφορά διέγερσης από την Ch1 στην ζεαξανθίνη και έχει ως αποτέλεσμα την απόσβεση του φθορισμού της χλωροφύλλης και την έκλυση της ενέργειας διέγερσης. Η θεωρία αναφέρεται ως αυθόρμητη (direct) απόσβεση της ενέργειας. Το ενδεχόμενο ότι οι διαφορές στο S_1 ενεργειακό επίπεδο ανάμεσα στην βιολαξανθίνη και στην ζεαξανθίνη μπορεί να ευθύνονται για την δράση της μεσολαβητικής απόσβεσης της περίσσειας ενέργειας προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Demmig-Adams (1990) και αργότερα διευκρινίστηκε από τους Owens et al. (1992). Πρότειναν ότι η ζεαξανθίνη έχει ενεργειακό επίπεδο S_1 πανομοιότυπο με εκείνο του β-καροτενίου. Το S_1 ενεργειακό επίπεδο της ζεαξανθίνης βρίσκεται χαμηλότερα από εκείνο της Ch1a, επιτρέποντας στο μόριο της ζεαξανθίνης να συμπεριφέρεται ως κοάνη για την περίσσεια ενέργεια της Ch1a. Το ενεργειακό επίπεδο S_1 της ζεαξανθίνης δύναται να αποσβέσει τον φθορισμό της Ch1a, με την απενεργοποίηση της $^1Ch1^*$. Αντίθετα, το υψηλότερο S_1 επίπεδο της βιολαξανθίνης θα μπορούσε μόνο να λειτουργήσει ως φωτοσυλλεκτική χρωστική, μεταφέροντας την ενέργεια διέγερσης στην Ch1a. Επομένως όταν υπάρχει ανάγκη απόσβεσης της περίσσειας ενέργειας σχηματίζεται ζεαξανθίνη μέσα στο LHCII, η οποία συνεισφέρει στην απενεργοποίηση της $^1Ch1^*$ και στην απόσβεση της πλεονάζουσας ενέργειας υπό μορφή θερμότητας (Gilmore, 1997; Minkov et al., 1999). Η δεύτερη θεωρία αποσαφηνίζει τον ρόλο των χρωστικών του κύκλου των ξανθοφυλλών στο να προκαλούν μεταβολές στην διάταξη του LHCII στον χώρο, η οποία καταλλήγει στην μη φωτοχημική απόσβεση ενέργειας. Σύμφωνα με την θεωρία αυτή προτείνεται ότι η ζεαξανθίνη προκαλεί δομικές αλλαγές στο φωτοσυλλεκτικό σύστημα των θυλακοειδών μεμβρανών που συμβάλλουν στην μη φωτοχημική απόσβεση (Gilmore, 1997; Minkov et al., 1999). Η μείωση της ακτινοβολίας που προκαλείται από την μείωση του pH στην κοιλότητα του θυλακοειδούς ενεργοποιεί το αποεποξειδάση της βιολαξανθίνης και προωθεί την πρωτονίωση της CP πρωτεΐνης. Αυτά τα δύο γεγονότα προκαλούν εξειδικευμένες δομικές αλλαγές στο LHC και μετατροπή της βιολαξανθίνης σε ζεαξανθίνη. Στο φωτοπροστατευτικό σύστημα των πρωτεϊνών που σχηματίζουν χλωροπρωτεϊνικά σύμπλοκα στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό με τις χλωροφύλλες a και b, τα μόρια των χλωροφυλλών τοποθετούνται κοντά, αλλά διαχωρίζονται μεταξύ τους από μόρια ξανθοφυλλών.

Αυτοί οι ισχυροί αποσβέστες (οι ξανθοφύλλες) εμποδίζουν με τον τρόπο αυτό τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων της χλωροφύλλης και διευκολύνουν την απόσβεση (Searle et al., 1990) χωρίς ωστόσο να παρεμβαίνουν στην μεταφορά ενέργειας μεταξύ των μορίων της χλωροφύλλης. Η βασική διαδικασία που προκαλεί την απόσβεση με αυτό τον μηχανισμό είναι οι αλλαγές στην κατάσταση ιονισμού των πρωτεϊνών που επισυμβαίνουν και οδηγούν σε μια συσσωμάτωση χλωροφυλλών και ξανθοφυλλών. Έτσι επιτρέπουν την αυθόρμητη απόσβεση της $^1\text{Chl}^*$ από την ζεαξανθίνη και την ενεργειακή απόσβεση (Eskling et al., 1997; Gilmore, 1997).

Υπό κανονικές συνθήκες φωτοσύνθεσης η θερμική απόσβεση μπορεί να ευθύνεται για απώλειες πάνω από το 50% της ενέργειας ακτινοβολίας που απορροφάται από τις χλωροφύλλες του ενεργού κέντρου του φωτοσυστήματος II.

4. Η συγκρότηση της φωτοσυνθετικής συσκευής κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φύλλων

Η έναρξη της φωτοσυνθετικής λειτουργίας σε ένα φύλλο εξαρτάται πρωταρχικά τόσο από την οντογένεση των χλωροπλαστών και τη βιοσύνθεση των βασικών εξαρτημάτων της φωτοσυνθετικής συσκευής όσο και από την ανάπτυξη των φωτοπροστατευτικών μηχανισμών ώστε η λειτουργία των πρώτων να είναι απρόσκοπτη. Η διαδικασία της οντογένεσης των χλωροπλαστών αποτελεί μια αυτόνομη διαδικασία αλλά εξαρτάται σαφώς από την πορεία της διαφοροποίησης του κυττάρου (Van Lijsebettens and Clarke, 1998). Οι χλωροπλάστες προέρχονται από τη διαφοροποίηση προπ्लाστιδίων τα οποία εντοπίζονται στα κύτταρα που προκύπτουν από το κορυφαίο μερίστωμα του βλαστού. Η διαφοροποίηση περιλαμβάνει τόσο εξαρτώμενες όσο και μη εξαρτώμενες από το φως διαδικασίες (Bauer et al., 2001). Η αντίληψη των φωτεινών ερεθισμάτων και η μεταγωγή των σημάτων πραγματοποιείται από ειδικούς φωτοδέκτες με κατάληξη την επαγωγή γονιδίων τόσο στο πυρηνικό όσο και στο χλωροπλαστικό DNA (Fankhauser and Chory, 1997). Εκτός από τις διαδικασίες που εξαρτώνται από την παρουσία φωτός, η οντογένεση των χλωροπλαστών περιλαμβάνει και διαδικασίες ανεξάρτητες από το φως η έναρξη και η ρύθμιση των οποίων συντελούνται μέσω σημάτων που ανταλλάσσονται μεταξύ των χλωροπλαστών και του πυρήνα (Bauer et al., 2001). Έτσι η όλη διαδικασία περιλαμβάνει επαγωγή γονιδίων, σύνθεση πρωτεϊνών και μεταφορά

αυτών στο πλαστίδιο όπου και συναρμολογούνται στις μεμβράνες των θυλακοειδών, διαδικασία η οποία απαιτεί το συντονισμό των δύο ξεχωριστών διαμερισμάτων, του κυτταροπλάσματος και του χλωροπλάστη (Choquet and Vallon, 2000).

Για την αποδοτική λειτουργία της φωτοσύνθεσης απαιτείται, εκτός από την οντογένεση των χλωροπλάστων, και η ανάπτυξη του φύλλου ως συνόλου. Η διαδικασία αυτή ορίζεται από μια διαδοχή σταδίων όπως η κατά πλάτος αύξηση η οποία δίνει γένεση στους βασικούς ιστούς που συγκροτούν το όργανο (Van Lijsebettens and Clarke, 1998). Οι κύριοι ιστοί των φύλλων είναι οι επιδερμικοί και τα χλωροφυλλούχα παρεγχύματα, τυπικά το πασσαλώδες και το οπογγώδες παρέγχυμα. Η οντογένεση των φύλλων έχει μελετηθεί επιισταμένα στο φυτό *Arabidopsis thaliana* όπου καθορίστηκαν τα βασικά στάδια ανάπτυξης στο χρονικό διάστημα μεταξύ 5 και 22 ημερών μετά τη σπορά. Κατά τους Pyke et al. (1991), οι επιδερμίδες και το πασσαλώδες παρέγχυμα είναι ορατά σε διάστημα 5–8 ημερών. Στο διάστημα αυτό η αύξηση είναι κατά κύριο λόγο κατά πλάτος, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη του ελάσματος η οποία κορυφώνεται στο χρονικό διάστημα μεταξύ 7 και 15 ημερών. Κατά το διάστημα αυτό αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό το μέγεθος των κυττάρων του μεσοφύλλου και σχηματίζονται οι μεσοκυττάριοι χώροι (Pyke et al., 1991). Ο σχηματισμός των μεσοκυττάριων χώρων παίζει ουσιώδη ρόλο στη φωτοσυνθετική λειτουργία των φύλλων καθώς γίνεται δυνατή η διάχυση του διοξειδίου του άνθρακα από τον υποστομάτιο χώρο προς τα κύτταρα του μεσοφύλλου. Στο φυτό *A. thaliana* το έλασμα παρουσιάζει πλήρη έκπτυξη κατά την 18^η ημέρα. Από εκεί και μετά, το φύλλο συνεχίζει να αυξάνει με κατά μήκος έκταση των κυττάρων προκαλώντας κυρίως αύξηση του πάχους του ελάσματος και του ποσοστού των μεσοκυττάριων χώρων (Pyke et al., 1991).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, ένα αναπτυσσόμενο φύλλο δεν προβλέπεται να μπορεί να φτάσει στο μέγιστο της φωτοσυνθετικής του ικανότητας πριν την ολοκλήρωση τουλάχιστον του σταδίου της έκπτυξης του ελάσματος (Miyazawa et al., 2003). Ωστόσο ένα αναπτυσσόμενο φύλλο εμφανίζει συνήθως θετικό ισοζύγιο καθαρής φωτοσυνθετικής ταχύτητας πριν την ολοκλήρωση της ανάπτυξής του (Turgeon, 1989). Αυτό υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι, κατά μέσο όρο, η μετάβαση από το στάδιο του καταναλωτή στο στάδιο του παραγωγού, όπου τελικά το φύλλο διαθέτει τέτοιο πλεόνασμα φωτοσυνθετικών προϊόντων ώστε να μπορεί να τροφοδοτεί και άλλα μέρη του φυτού, εντοπίζεται

όταν το φύλλο έχει ολοκληρώσει το 60% περίπου της πλήρους έκπτυξής του (Turgeon, 1989).

5. Φωτοσυνθετικά χαρακτηριστικά του φύλλου του αμπελιού

5α. Η συγκρότηση της φωτοσυνθετικής συσκευής κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φύλλων του αμπελιού

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φύλλων του αμπελιού η συγκέντρωση χλωροφυλλών και καροτενοειδών αυξάνει σταδιακά. Ανάλογα αυξάνει και ο λόγος Ch1a/Ch1b υποδεικνύοντας την σταδιακή ωρίμανση της φωτοσυνθετικής συσκευής (Bertamini and Nedunchezhian, 2003b). Η μέγιστη τιμή του λόγου παρατηρείται στα ώριμα φύλλα. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως εξηγεί την μέγιστη τιμή φωτοσυνθετικής ικανότητας που παρατηρείται στο στάδιο αυτό (Bertamini and Nedunchezhian, 2003b). Η πλήρης απόδοση της φωτοσυνθετικής συσκευής στο στάδιο αυτό υποδηλώνεται από την παράμετρο F_v/F_m της οποίας η τιμή αυξάνεται κατά την ανάπτυξη των φύλλων έως την πλήρη ωρίμανση. Έτσι, κατά το στάδιο της πλήρους ωρίμανσης η ενέργεια που απορροφάται χρησιμοποιείται πλέον αποδοτικά από τη φωτοσυνθετική συσκευή.

5β. Τα χαρακτηριστικά φωτοπροστασίας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φύλλων του αμπελιού

Οι Bertamini and Nedunchezhian (2003a) αναφέρουν ότι τα νεαρά φύλλα του αμπελιού εμφανίζονται περισσότερο επιρρεπή στην φωτοοξειδωση και ως εκ τούτου προστατεύονται σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με τα ώριμα. Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν πως αν και τα νεαρά φύλλα περιέχουν 50% λιγότερη χλωροφύλλη συγκριτικά με τα ώριμα, ο λόγος Ch1a/Ch1b έχει ήδη διαμορφώσει την τελική του τιμή γεγονός που υποδηλώνει πως η φωτοσυνθετική συσκευή είναι ανεπτυγμένη. Ως εκ τούτου το ποσό της ενέργειας που απορροφάται ανά μονάδα χλωροφύλλης είναι υψηλότερο στα νεαρά συγκριτικά με τα ώριμα φύλλα. Αν το παραπάνω συνδυαστεί με την χαμηλότερη φωτοσυνθετική ικανότητα των νεαρών φύλλων συγκριτικά με τα ώριμα, δείχνει πως η ανάγκη για αποσβεστικούς μηχανισμούς στα νεαρά φύλλα είναι μεγαλύτερη.

Στα νεαρά φύλλα φαίνεται πως λειτουργεί ένας ρυθμιστικός μηχανισμός για την απορρόφηση ακτινοβολίας με σκοπό την αποφυγή βλαβών στα φωτοσυνθετικά κέντρα. Ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει την απενεργοποίηση των ενεργών κέντρων μέσω της πρωτεΐνης 33 kDa του συμπλόκου φωτόλυσης του νερού, αλλά όχι καταστροφή της πρωτεΐνης D1 του PSII (Bertamini and Nedunchezian, 2003a). Σε γενικές γραμμές φαίνεται πως οι φωτοπροστατευτικοί μηχανισμοί των ώριμων φύλλων στο φυτό του αμπελιού είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί σε συνθήκες αγρού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της πιθανότητας φωτοπαρεμπόδισης ακόμα και υπό συνθήκες έντονης υδατικής καταπόνησης (Flexas et al., 1998).

Σε επίπεδο οργάνου τα δομικά χαρακτηριστικά που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία συμβάλλουν στην αποφυγή της καταπόνησης από υψηλές εντάσεις ορατής ακτινοβολίας είναι οι ανθοκυανίνες (Manetas et al., 2002; Manetas, et al., 2003) και το τρίχωμα (Karabourniotis et al., 1999; Manetas, 2003). Οι Karabourniotis et al. (1999) εξετάζοντας τρεις ποικιλίες αμπελιού κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους αναφέρουν πως η παρουσία των παραπάνω χαρακτηριστικών στις αντίστοιχες ποικιλίες είναι εντονότερη στα νεαρά αναπτυξιακά στάδια. Σύμφωνα με τους παραπάνω ερευνητές, το γεγονός αυτό ενδεχομένως να σχετίζεται, μεταξύ άλλων, και με την προστασία των νεαρών φύλλων από τις υψηλές εντάσεις ορατής και υπεριώδους ακτινοβολίας. Τα συμπεράσματα αυτά προέκυψαν από μελέτες των χαρακτηριστικών περατότητας των φύλλων σε ακτινοβολία διάφορων μηκών κύματος.

Σκοπός της Εργασίας

ΣΕ

Σύμφωνα με παλαιότερη εργασία της ερευνητική μας ομάδας (Karabourniotis et al., 1999), η ύπαρξη τριχώματος στα νεαρά φύλλα ορισμένων ποικιλιών αμπέλου προσφέρει προστασία όχι μόνο έναντι της υπερϊώδους αλλά και έναντι των υψηλών εντάσεων ορατής ακτινοβολίας. Μετρήσεις με μικροαισθητήρες οπτικών ινών έδειξαν ότι το στρώμα των τριχών των νεαρών φύλλων συγκρατεί ένα σημαντικό ποσοστό της προσπίπτουσας ακτινοβολίας με αποτέλεσμα οι ιστοί του μεσοφύλλου να δέχονται σημαντικά χαμηλότερες εντάσεις ορατής ακτινοβολίας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά διατυπώθηκε η υπόθεση εργασίας βάσει της οποίας οι διαφορετικές οπτικές ιδιότητες των επιφανειακών ιστών διαφορετικών ποικιλιών αμπέλου διαμορφώνουν διαφορετικό φωτεινό καθεστώς στο μεσόφυλλο και ως εκ τούτου οι μηχανισμοί απόσβεσης της περίσσειας ενέργειας των φωτοχημικών κέντρων λειτουργούν με διαφορετική ένταση ή / και διαθέτουν διαφορετικές δεξαμενές των υπεύθυνων χρωστικών. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν τρεις ποικιλίες αμπέλου οι οποίες παρουσιάζουν έντονες διαφορές στις οπτικές ιδιότητες των νεαρών τους φύλλων, η Σουλτανίνα (με λεία και άτριχα φύλλα χωρίς ανθοκυανίνες), το Σιρίκι (με λεία, άτριχα φύλλα και υψηλό περιεχόμενο σε ανθοκυανίνες) και το Αθήρι (φύλλα με τρίχωμα χωρίς ανθοκυανίνες).

1. Φυτικό Υλικό και Πειραματικό Σχέδιο

Το πείραμα διεξήχθη στον πειραματικό αμπελώνα του Εργαστηρίου Αμπελουργίας του ΓΠΑ. Επιλέχθηκαν τρεις ποικιλίες αμπέλου (*Vitis vinifera* L) με διακριτά μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των φύλλων τους, η Σουλτανίνα (με λεία και άτριχα φύλλα χωρίς ανθοκυανίνες), Σιρίκι (με λεία, άτριχα φύλλα και υψηλό περιεχόμενο σε ανθοκυανίνες) και Αθήρι (φύλλα με τρίχωμα χωρίς ανθοκυανίνες). Για κάθε ποικιλία επιλέχθηκαν οκτώ υγιή και ομοιόμορφα πρέμνα. Σε κάθε πρέμνο σημάνθηκαν 3–4 βλαστοί στο σημείο που αντιστοιχούσε στο φύλλο πέμπτου κόμβου από την κορυφή της νέας βλάστησης.

2. Δειγματοληψίες

Για τις ανάγκες των πειραματικών μετρήσεων διακρίθηκαν δύο πειραματικές κατηγορίες. Η πειραματική κατηγορία Α αφορούσε σε πέντε πρέμνα με τέσσερις σημασμένους βλαστούς ανά πρέμνο και χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις των βιοχημικών και φυσιολογικών παραμέτρων που αφορούσαν στη φωτοσυνθετική λειτουργία. Η πειραματική κατηγορία Β αφορούσε σε τρία πρέμνα με τρεις σημασμένους βλαστούς ανά πρέμνο και χρησιμοποιήθηκε για τις μορφολογικές μετρήσεις και τις μετρήσεις ανθοκυανινών.

Οι δειγματοληψίες διεξήχθησαν στο διάστημα 13–21 Μαΐου 2003.

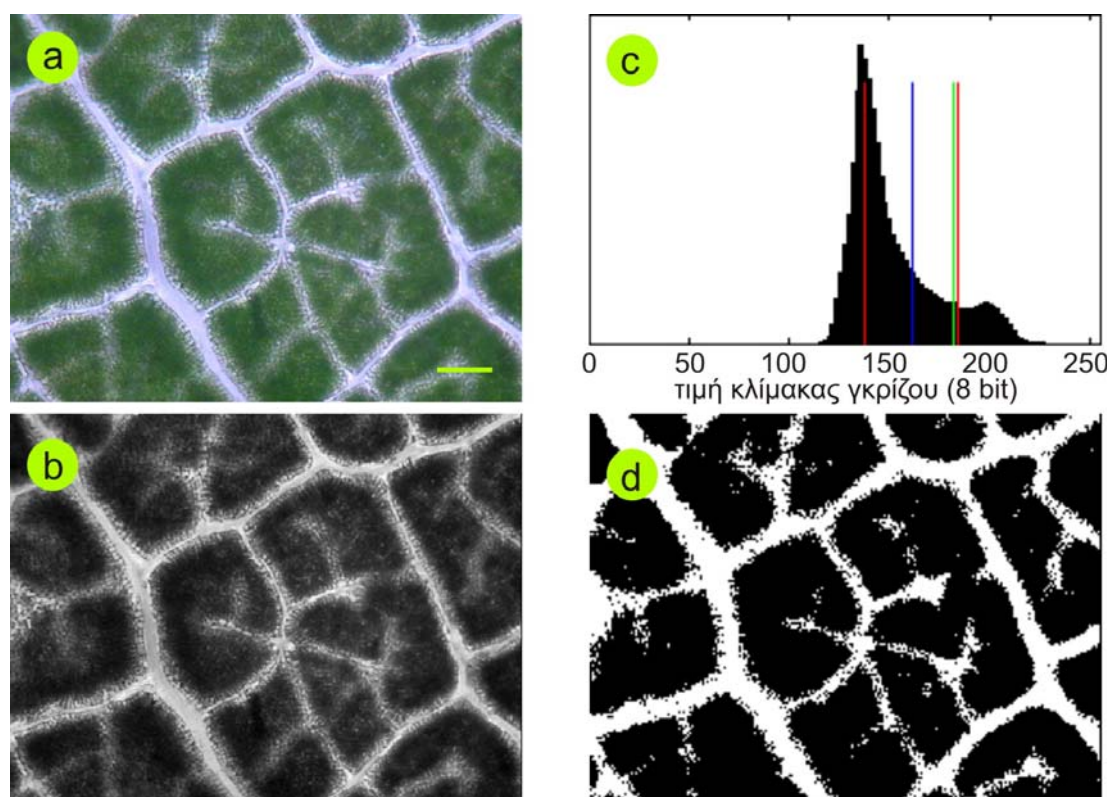
3. Μορφολογικές Παράμετροι

3α. Μετρήση Πάχους Φύλλου και Ειδικής Φυλλικής Επιφάνειας

Για τη μέτρηση του πάχους των φύλλων έγιναν τμήσεις με το χέρι σε νωπά φύλλα και παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο (Zeiss AxioLab (Carl Zeiss, Jena, Germany)). Για τη μέτρηση της ειδικής φυλλικής επιφάνειας (SLA) τα φύλλα φωτογραφήθηκαν νωπά ώστε να μετρηθεί η επιφάνεια του ελάσματος και στη συνέχεια μετά από αφυδάτωση στους 80° C για 48 ώρες και παραμονή σε ξηραντήρα για 24 ώρες μετρήθηκε το ξηρό βάρος.

3β. Μέτρηση Ποσοστού Διαφανών Περιοχών του Ελάσματος

Για την μέτρηση του ποσοστού των διαφανών περιοχών ελήφθησαν φωτογραφίες του ελάσματος άθικτων φύλλων. Για το σκοπό αυτό, δίσκοι φύλλων τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα και φωτίστηκαν από την αποαξονική επιφάνεια. Οι μικροφωτογραφίες καταγράφηκαν σε ψηφιακή φωτογραφική μηχανή τύπου CyberShot DSC-S75 (SONY Corporation, Japan) και αποθηκεύτηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή σε ψηφιακή μορφή. Η διάκριση των διαφανών περιοχών που αντιστοιχούν στους κολεούς των ηθμαγγειωδών δεσμίδων του φύλλου από τα χλωροφυλλούχα διαμερίσματα του



Εικόνα 6. Ενδεικτική αλληλουχία ανάλυσης εικόνας για τον υπολογισμό του ποσοστού των διαφανών περιοχών του φύλλου **a**. Αρχική μικροφωτογραφία φύλλου αμπελιού με διελαύνον φως **b**. Η ίδια μικροφωτογραφία μετά από τη μετατροπή της σε εικόνα γκριζας κλίμακας 256 αποχρώσεων **c**. Το ιστόγραμμα συχνότητας των τιμών έντασης των εικονοστοιχείων. Στο διάγραμμα με κόκκινη γραμμή επισημειώνονται τα δύο μέγιστα (το πρώτο αντιστοιχεί στα εικονοστοιχεία που συνιστούν τις περιοχές του μεσοφύλλου οι οποίες αποτελούνται από χλωροφυλλούχο παρέγχυμα ενώ το δεύτερο στα εικονοστοιχεία που συνιστούν τις διαφανείς περιοχές). Με πράσινη γραμμή επισημειώνεται το ελάχιστο του ιστογράμματος ενώ με μπλε γραμμή ο αριθμητικός μέσος των δύο μεγίστων ο οποίος επιλέγεται ως τιμή διαχωρισμού. **d**. Η τελική δυαδική εικόνα μετά την επεξεργασία. Το ποσοστό των διαφανών περιοχών επί του συνόλου της φυλλικής επιφάνειας στη συγκεκριμένη εικόνα είναι 28%. Κλίμακα 100 μm .

ελάσματος έγινε με τη βοήθεια προγράμματος ψηφιακής ανάλυσης εικόνας το οποίο αναπτύχθηκε σε περιβάλλον MatLab 60088 (Mathworks Inc, USA), (Nikolopoulos *et al*, 2002). Σύμφωνα με την παραπάνω μεθοδολογία, οι ψηφιακές μικροφωτογραφίες (εικόνα 6a) μετατρέπονται σε μορφή γκριζας κλίμακας βάθους 8-bit (εικόνα 1b) και εξάγεται το ιστόγραμμα των συχνοτήτων των εντάσεων των εικονοστοιχείων (εικόνα 6c). Ακολούθως εφαρμόζεται αλγόριθμος ο οποίος έχει ως εξαγόμενο την τιμή της έντασης για κάθε ένα από τα δύο μέγιστα του ιστογράμματος (εικόνα 6c). Ως σημείο διαχωρισμού των εντάσεων των εικονοστοιχείων για τη μετατροπή της εικόνας σε δυαδική μορφή (εικόνα 6d) επιλέγεται ο αριθμητικός μέσος των δύο μεγίστων (εικόνα 6c). Τέλος μετράται το ποσοστό των διαφανών περιοχών ως προς τη συνολική επιφάνεια της εικόνας (εικόνα 6).

4. Βιοχημικές και Φυσιολογικές Παράμετροι

4α. Μέτρηση Ανθοκυανινών

Για τη μέτρηση του περιεχομένου σε ανθοκυανίνες ελήφθησαν δίσκοι φύλλων και λειοτριβήθηκαν με υγρό άζωτο έως λεπτής σκόνης. Στη συνέχεια έγινε εκχύλιση σε 1% HCl σε μεθανόλη (3 ml) με τη βοήθεια άμμου εκχύλισης σε γουδί. Το εκχύλισμα καθαρίστηκε από τα στερεά υπολείμματα με φυγοκέντρηση ($2570 \times g$, 5 λεπτά). Όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν στους 6° C. Στη συνέχεια παραλήφθηκε το υπερκείμενο και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 530 και 657 nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης τύπου Shimadzu UV-Vis 160A (Shimadzu Co, Tokyo, Japan). Από την απορρόφηση των ανθοκυανινών αφαιρέθηκε η συμβολή των χλωροφυλλών και η διορθωμένη απορρόφηση μετατράπηκε σε συγκέντρωση χρησιμοποιώντας τον τυπικό συντελεστή μοριακής απόσβεσης της κυανιδίνης ($34,7 \text{ AU mM}^{-1}$) κατά Murray and Hackett (1991).

4β. Ανάλυση Φωτοσυνθετικών και Φωτοπροστατευτικών Χρωστικών και παράμετροι λειτουργίας κύκλου ξανθοφυλλών

Για την ανάλυση φωτοσυνθετικών (χλωροφυλλών) και φωτοπροστατευτικών (καροτενοειδών) χρωστικών διεξήχθησαν δύο ειδών δειγματοληψίες ώστε να εκτιμηθούν οι παράμετροι λειτουργίας του κύκλου των ξανθοφυλλών (Kyriarissis *et al.*, 2000). Η πρώτη δειγματοληψία διεξήχθη πριν την ανατολή του ήλιου (05³⁰-07⁰⁰), ενώ η δεύτερη δειγματοληψία το μεσημέρι

(11³⁰–13⁰⁰). Και στις δύο περιπτώσεις ελήφθησαν δίσκοι φύλλων και εμβαπτίστηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο μέχρι τη μεταφορά τους σε κατάψυξη (–80° C), όπου και παρέμειναν έως να χρησιμοποιηθούν για τη χρωματογραφική ανάλυση. Τα δείγματα λειοτριβήθηκαν με υγρό άζωτο έως λεπτής σκόνης και εκκυλίστηκαν σε μεθανόλη με ίχνη CaCO₃ (2 ml) με τη βοήθεια άμμου εκκύλισης σε γουδί. Το εκκύλισμα καθαρίστηκε από τα στερεά υπολείμματα με φυγοκέντρηση (2570 × g, 5 λεπτά). Όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν στους 6° C με φως ασφαλείας. Το υπερκείμενο επεξεργάστηκε με φίλτρο μεμβράνης MN Chromafil GF-PET 20/25 (Macherey–Nagel, Düren, Germany) και φυλάχθηκε στους –30° C. Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Darko *et al*, 2000 (εικόνα 7). Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) αποτελείται από τριαδική αναλογική αντλία χαμηλής πίεσης LG–980–02, αντλία PU–980 και ανιχνευτή υπεριώδους–ορατού UV–970 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan). Ο διαχωρισμός έγινε σε αναλυτική στήλη Zorbax Stablebond SB-C₁₈ (5 μm; 250 × 4,6 mm; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) συνδεδεμένη εν σειρά με προστήλη APEX ODS (5 μm; 1 cm × 4,6 mm; Jones Chromatography Limited, Mid Glamorgan, UK). Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με βαλβίδα εισαγωγής 7725i (Reodyne, Rohnherth Park, CA, USA) μέσω διαδρομής χωρητικότητας 20 μl. Η αναλυτική στήλη διατηρούταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 ± 2° C) κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Η απαέρωση της κινητής φάσης έγινε με διαβίβαση ηλίου. Τα μίγματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την κινητή φάση ήταν: A MeCN, B MeOH και C MeCl₂. Το πρόγραμμα έκλουσης είχε ως εξής: αρχικές συνθήκες (A:B:C, 85:15:0, v/v/v), ισοκρατικό για 10 λεπτά, μετάβαση (γραμμική) προς (63:17:20) σε 5 λεπτά, ισοκρατικό για 7 λεπτά, μετάβαση προς (37:18:45) σε 3 λεπτά, ισοκρατικό για 5 λεπτά, μετάβαση προς την αρχική σύσταση σε 20 λεπτά. Η ροή της κινητής φάσης ήταν 1 ml min⁻¹ και η ανίχνευση έγινε στα 437 nm. Η ταυτοποίηση των κορυφών έκλουσης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια φασμάτων απορρόφησης (370–800 nm) με τη βοήθεια του ανιχνευτή μετά από πειράματα παύσης ροής και σε αναφορά με τους πρωτότυπους συντελεστές χωρητικότητας (Darko *et al*, 2000).

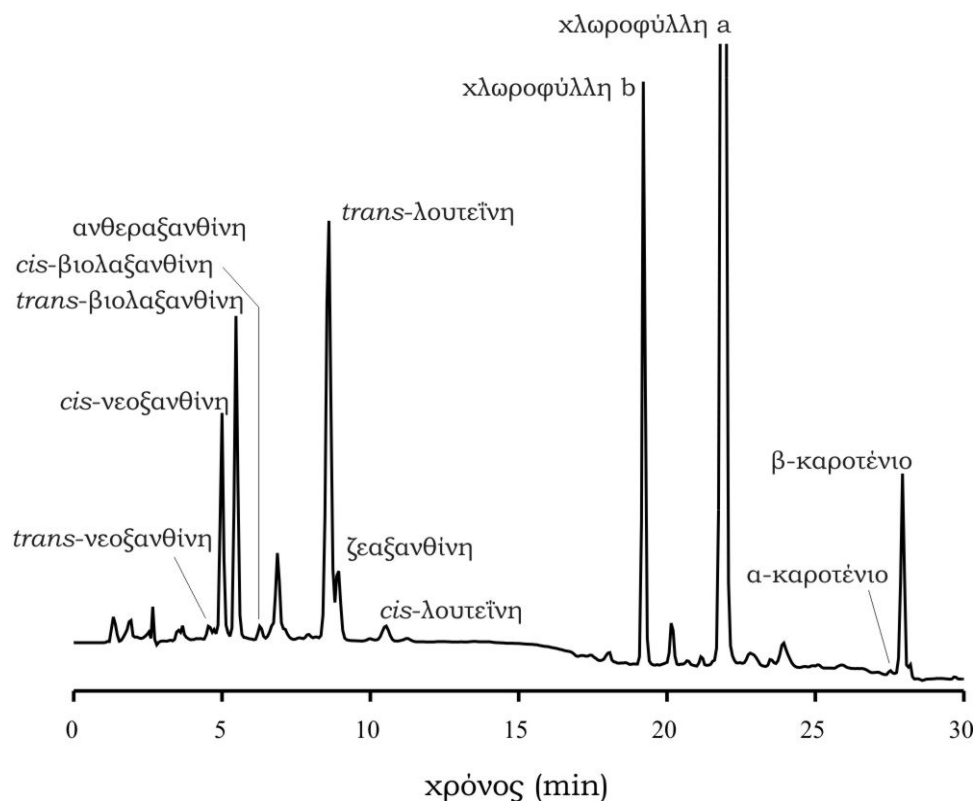
4γ. Μετρήσεις Φωτοσύνθεσης και Συναφών Παραμέτρων

Οι μετρήσεις της φωτοσύνθεσης διεξήχθησαν στο διάστημα 14–21 Μαΐου κατά τις πρωινές ώρες 8–12 πμ ηλιόλουστων ημερών με φυσικό φωτισμό έντασης 1500 μmol φωτονίων m⁻² s⁻¹, θερμοκρασία αέρα 30° C, σχετική

υγρασία αέρα 30% και ατμοσφαιρική συγκέντρωση διοξειδίου 420 ppm. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το φορητό όργανο μέτρησης φωτοσύνθεσης LI-6400 (Li-COR, Lincoln, NE, USA).

4δ. Μέτρηση Παραμέτρου F_v/F_m

Οι μετρήσεις της παραμέτρου F_v/F_m διεξήχθησαν κατά τις βραδινές ώρες 22⁰⁰–24⁰⁰ με φθορισμόμετρο τύπου FIM 1500 (ADC Ltd, UK). Η διαδικασία της μέτρησης περιελάμβανε αρχικά προσαρμογή των φύλλων στο σκοτάδι για 30 λεπτά και ακολούθως ακτινοβολία για 5 s με ένταση ακτινοβολίας 1050 μmol φωτονίων $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (κόκκινο φως 650 nm). Η διαμόρφωση των παραπάνω τιμών καθορίστηκε με προκαταρκτικά πειράματα. Η παράμετρος F_v/F_m σχετίζεται με τη μη φωτοχημική απόσβεση της ενέργειας διέγερσης των μορίων της χλωροφύλλης, η οποία μετράται ως εκπεμπόμενος φθορισμός. Η ακτινοβολία διέγερσης χορηγείται αιφνίδια μετά από ορισμένο χρόνο παραμονής των φύλλων στο σκοτάδι. Με τον τρόπο αυτό όλοι οι πρωταρχικοί δέκτες του φωτοσυστήματος II είναι πλήρως οξειδωμένοι. Στη



Εικόνα 7. Ευδεικτική χρωματογραφική ανάλυση φωτοσυνθετικών και φωτοπροστατευτικών χρωστικών από φύλλο αμπελιού. Το συγκεκριμένο δείγμα προέρχεται από φύλλα 10^{ου} κόμβου της ποικιλίας ‘Σιρίκι’ μεσημβρινής δειγματοληψίας.

συνέχεια, η αιφνίδια ακτινοβολήση, προκαλεί μια αρχική εκπομπή φθορισμού που αντιστοιχεί στο αρχικό φθορισμό (F_0) της φωτοσυνθετικής συσκευής και στη συνέχεια και εφ' όσον η ένταση του διεγείροντας φωτός αντιστοιχεί σε επίπεδα κορεσμού, ο αρχικός φθορισμός ανέρχεται σε ένα μέγιστο επίπεδο (F_m), που συμπίπτει με την πλήρη αναγωγή όλων των αποθεμάτων του πρωταρχικού δέκτη Q_A . Στο σημείο αυτό η φωτοχημική ικανότητα θεωρείται μηδέν. Η διαφορά μεγίστου και αρχικού φθορισμού ονομάζεται μεταβλητός φθορισμός (F_v). Ο λόγος του μεταβλητού προς το μέγιστο φθορισμό (F_v / F_m) αποτελεί έναν δείκτη της φωτοχημικής ικανότητας των φύλλων. Σύμφωνα με τους Adams *et al.* (1990) η παράμετρος αυτή σχετίζεται γραμμικά με την φωτοχημική ικανότητα του φωτοσυστήματος II. Οι τιμές της παραμέτρου αυτής σχετίζονται με τη φυσιολογική κατάσταση των φωτοχημικών κέντρων όσον αφορά στη μεταφορά ενέργειας από τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό αντίδρασης.

A ποτελέσματα



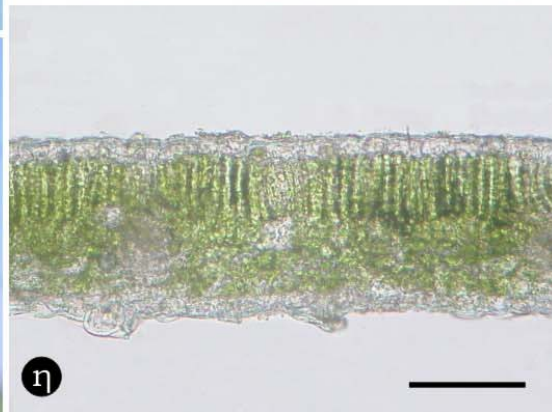
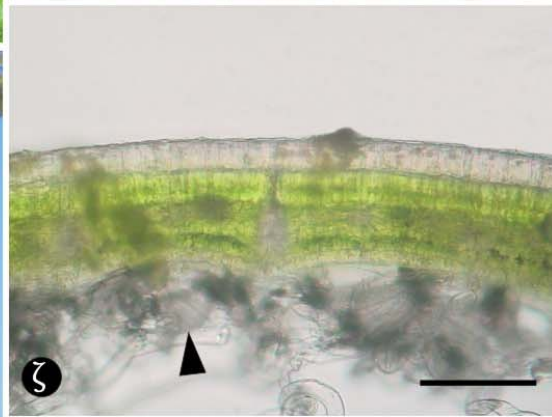
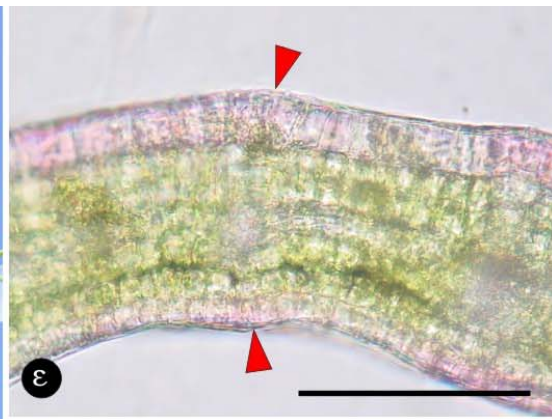
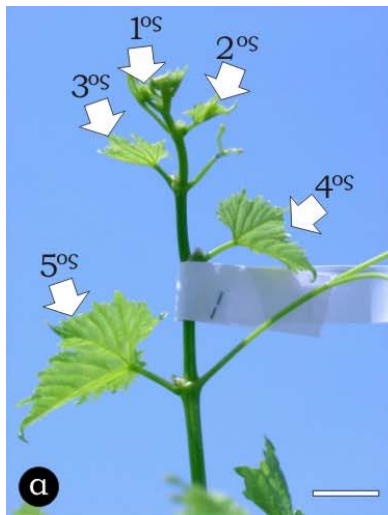
1. Μορφολογικές Παράμετροι

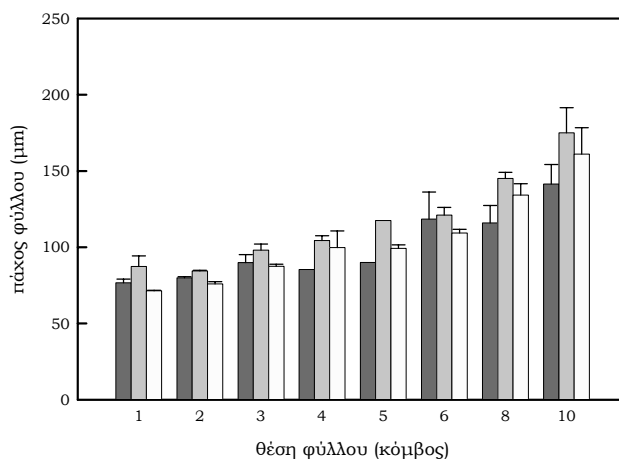
Η μελέτη των τριών ποικιλιών έδειξε την παρουσία διακριτών μορφολογικών χαρακτηριστικών για κάθε ποικιλία. Η ποικιλία Σουλτανίνα εμφανίζει λεία και πράσινα φύλλα σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια (εικόνα 1α,β). Η ποικιλία Σιρίκι παρουσιάζει λεία φύλλα με αυξημένη συγκέντρωση ανθοκυανινών στα κύτταρα της προσαξονικής και αποαξονικής επιδερμίδας (εικόνα 8γ,ε). Τέλος η ποικιλία Αθήρι εμφανίζει τριχωτά φύλλα, ιδιαίτερα στα νεαρά αναπτυξιακά στάδια, χωρίς ανθοκυανίνες (εικόνα 8δ, στ-ζ). Αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο η παρουσία των ανθοκυανινών (βλ επίσης ενότητα 2) όσο και του τριχώματος είναι ιδιαίτερα αισθητή στα νεαρά στάδια ανάπτυξης ενώ τόσο η πυκνότητα τριχώματος όσο και η συγκέντρωση των ανθοκυανινών μειώνονται όσο πλησιάζουμε στην ολοκλήρωση της ανάπτυξης των φύλλων (φύλλα 8^{ου}-10^{ου} κόμβου).

Στην εικόνα 9 παρουσιάζεται η πορεία αύξησης του πάχους του ελάσματος των φύλλων συναρτήσει της θέσης των φύλλων στο βλαστό. Η θέση στο βλαστό ως κόμβος, μετρώντας από την κορυφή προς τη βάση του βλαστού (βασιπέταλα), δίνει μια εκτίμηση της ηλικίας των φύλλων. Από μετρήσεις της επιφάνειας προβολής του ελάσματος (δεν παρουσιάζονται) προκύπτει ότι τα φύλλα του 8^{ου}-10^{ου} κόμβου βρίσκονται κοντά στην ολοκλήρωση της έκπτυξης του ελάσματος. Ωστόσο, όπως φαίνεται και από την εικόνα 9, το πάχος του φύλλου και των τριών ποικιλιών συνεχίζει να αυξάνεται. Η συμπεριφορά αυτή ενδεχομένως να σχετίζεται με αύξηση της συμμετοχής σκληρογλυματικών ιστών στη βιομάζα του φύλλου. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να απεικονιστεί μελετώντας την αλλαγή του δείκτη σκληροφυλλίας (ή δείκτη ειδικής φυλλικής επιφάνειας) που παρουσιάζεται στην εικόνα 10. Η πτώση της τιμής του δείκτη στα φύλλα μετά τον 8^ο κόμβο υποδηλώνει ότι η εναπόθεση ξηρής μάζας συνεχίζεται με μεγαλύτερο ρυθμό από αυτόν της αύξησης της επιφάνειας του ελάσματος (αντίθετα με ότι συμβαίνει στα μικρότερα στάδια ανάπτυξης). Από τα δεδομένα της εικόνας 10 προκύπτει ότι η ποικιλία με τα εντονότερα ξηρομορφικά χαρακτηριστικά είναι η ποικιλία Αθήρι. Το αποτέλεσμα αυτό ενδεχομένως οφείλεται στην παρουσία τριχώματος αντίθετα με τις υπόλοιπες δύο ποικιλίες. Ωστόσο, ο λόγος της διαφοράς στην τιμή του δείκτη ειδικής φυλλικής

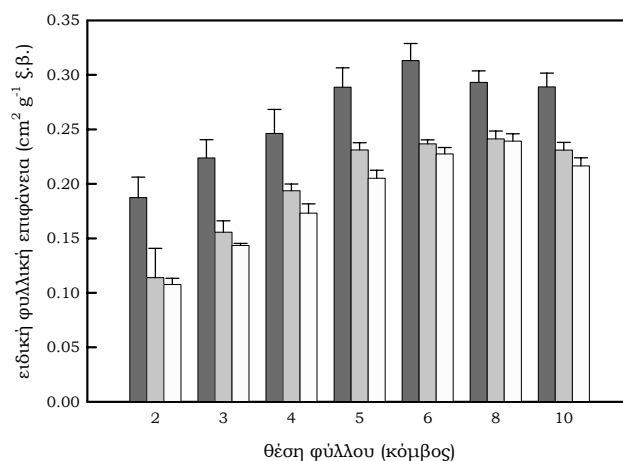
επιφάνειας μεταξύ των ποικιλιών Σουλτανίνα και Σιρίκι δεν είναι άμεσα αναγνωρίσιμος, τουλάχιστον από τα μορφολογικά στοιχεία των φύλλων. Στην εικόνα 11 παρουσιάζεται το ποσοστό κάλυψης των διαφανών περιοχών στο έλασμα των φύλλων των τριών ποικιλιών στα διάφορα στάδια ανάπτυξης. Το ανατομικό αυτό χαρακτηριστικό σχετίζεται με τον εμπλουτισμό των εσωτερικών χλωροφυλλούχων στρώσεων του μεσοφύλλου με φωτεινή ακτινοβολία. Έχει αποδειχθεί ότι ο εμπλουτισμός των εσωτερικών στρώσεων με φωτεινή ακτινοβολία απαιτείται για την αντιστάθμιση της φωτοπενίας στα σημεία αυτά, λόγω αύξησης του πάχους του ελάσματος. Στην παρούσα εργασία επιβεβαιώνεται ότι στο αμπέλι, το αυξημένο πάχος του ελάσματος στην ποικιλία Σιρίκι (εικόνα 9) συνοδεύεται από ανάλογη αύξηση του ποσοστού των διαφανών περιοχών (εικόνα 11) και το γεγονός αυτό διαπιστώνεται σχεδόν σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια.

Εικόνα 8. (επόμενη σελίδα). Φύλλα των τριών ποικιλιών αμπέλου της παρούσας εργασίας **α.** κορυφή νεαρής βλάστησης της ποικιλίας Σουλτανίνα όπου σημειώνονται ενδεικτικά τα φύλλα μέχρι και τον 5^ο κόμβο, **β.** νεαρό φύλλο ποικιλίας Σουλτανίνα, **γ.** ποικιλίας Σιρίκι, **δ.** ποικιλίας Αθήρι, **ε.** μικροφωτογραφία από εγκάρσια τομή φύλλου 4^{ου} κόμβου της ποικιλίας Σιρίκι όπου διακρίνονται τα επιδερμικά κύτταρα με αυξημένη συγκέντρωση αυθοκυανινών (κόκκινες κεφαλές βελών), **στ, ζ** και **η.** μικροφωτογραφίες από εγκάρσιες τομές φύλλων 2^{ου}, 5^{ου} και 10^{ου} κόμβου αντιστοίχα της ποικιλίας Αθήρι όπου διακρίνεται το στρώμα του τριχώματος (μαύρες κεφαλές βελών) Κλίμακα (α) 1 cm, (ε-η) 100 μm

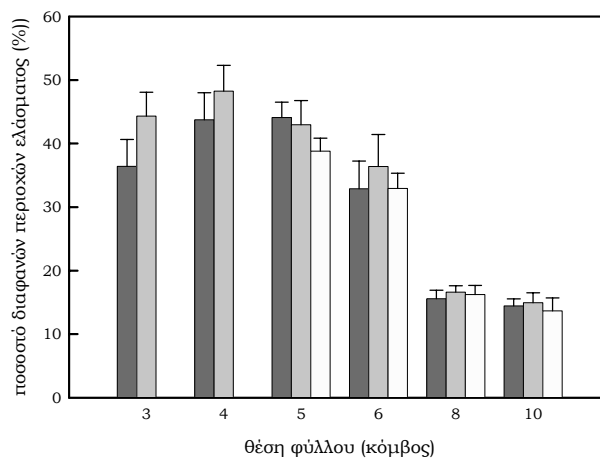




Εικόνα 9. Το πάχος του ελάσματος στα φύλλα των τριών ποικιλιών αμπέλου συναρτήσκει της θέσης τους στο βλαστό. Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων (\pm τυπικό σφάλμα του μέσου) ■:cv. Σουλτανίνα, ■: cv. Σιρίκι, □: cv. Αθήρι



Εικόνα 10. Η ειδική φυλλική επιφάνεια στα φύλλα των τριών ποικιλιών αμπέλου συναρτήσκει της θέσης τους στο βλαστό. Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων (\pm τυπικό σφάλμα του μέσου) ■: ποικ Σουλτανίνα, ■: ποικ Σιρίκι, □: ποικ Αθήρι

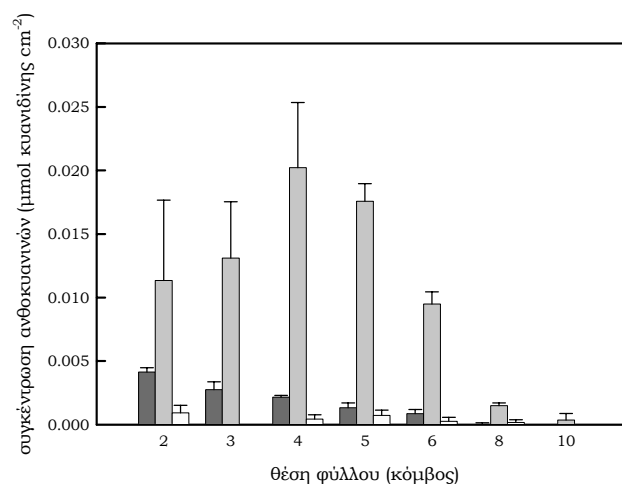


Εικόνα 11. Το ποσοστό των διαφανών περιοχών του ελάσματος στα φύλλα των τριών ποικιλιών αμπέλου συναρτηθεί της θέσης τους στο βλαστό. Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων (\pm τυπικό σφάλμα του μέσου) ■: cv. Σουλτανίνα, ▒: cv. Σιρίκι, ░: cv. Αθήρι

2. Βιοχημικές και Φυσιολογικές Παράμετροι

2α. Συγκέντρωση Ανθοκυανινών

Στην εικόνα 12 απεικονίζεται ποσοτικά η διαφορά στην παρουσία ανθοκυανινών μεταξύ των τριών ποικιλιών. Η ποικιλία Σιρίκι χαρακτηρίζεται

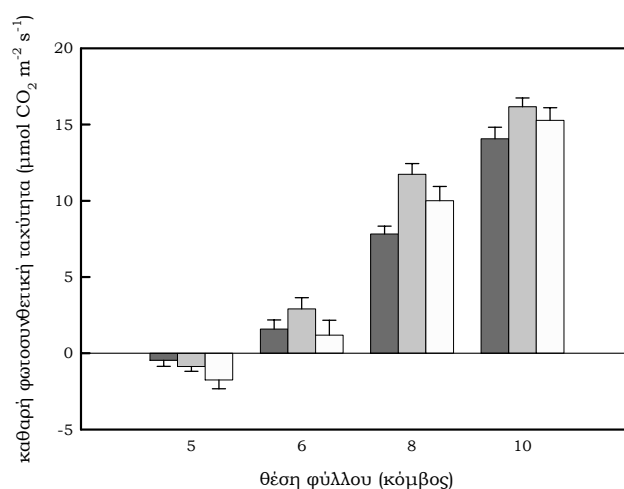


Εικόνα 12. Συγκέντρωση ανθοκυανινών ανά μονάδα επιφάνειας ελάσματος στα φύλλα των τριών ποικιλιών αμπέλου συναρτηθεί της θέσης τους στο βλαστό. Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων (\pm τυπικό σφάλμα του μέσου) ■: cv. Σουλτανίνα, ▒: cv. Σιρίκι, ░: cv. Αθήρι

από την έντονη παρουσία ανθοκυανινών ιδιαίτερα στα νεαρά και ενδιάμεσα στάδια ανάπτυξης. Αξιοσημείωτη είναι η περιορισμένη παρουσία ανθοκυανινών στα νεαρά στάδια ανάπτυξης των φύλλων της ποικιλίας Σουλτανίνα και η παντελής έλλειψη των ουσιών αυτών στα φύλλα της ποικιλίας Αθήρι.

2β. Παράμετροι Φωτοσυνθετικής Λειτουργίας

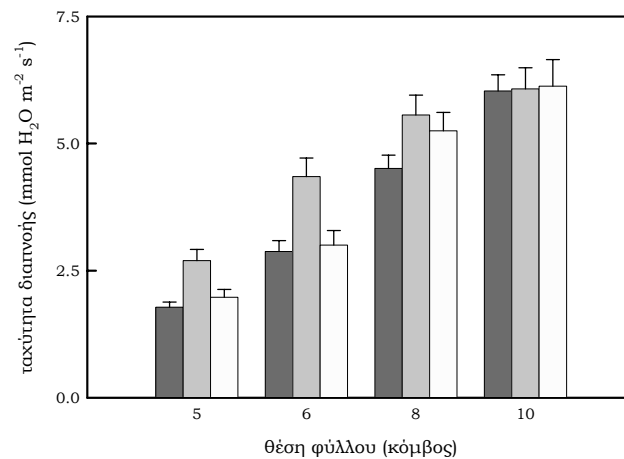
Στην εικόνα 13 απεικονίζεται η φωτοσυνθετική ταχύτητα (ως ρυθμός αφομοίωσης του διοξειδίου του άνθρακα) σε τέσσερις κόμβους των τριών ποικιλιών, στους κόμβους 5,6,8,10. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο καθαρός φωτοσυνθετικός ρυθμός παίρνει θετικές τιμές στον έκτο κόμβο και βαίνει αυξανόμενος και στις τρεις ποικιλίες. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η ποικιλία Σιρίκι εμφανίζει την υψηλότερη φωτοσυνθετική ταχύτητα σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο μετά από αυτό των φύλλων του 5^{ου} κόμβου. Οι διαφορές είναι ιδιαίτερα αισθητές στα νεαρά φύλλα του 6^{ου} κόμβου όπου ο καθαρός φωτοσυνθετικός ρυθμός στην ποικιλία Σιρίκι είναι κατά 83% και 145% υψηλότερος συγκριτικά με αυτόν στην ποικιλία Σουλτανίνα και Αθήρι αντίστοιχα (εικόνα 13). Οι διαφορές στον φωτοσυνθετικό ρυθμό εξομαλύνονται στα φύλλα του 10^{ου} κόμβου.



Εικόνα 13. Η ταχύτητα καθαρής φωτοσυνθετικής αφομοίωσης CO₂ στα φύλλα των τριών ποικιλιών αμπέλου συναρτηθεί της θέσης τους στο βλαστό. Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο 15 επαναλήψεων (\pm τυπικό σφάλμα του μέσου) ■:cv. Σουλτανίνα, ▒: cv. Σιρίκι, □: cv. Αθήρι

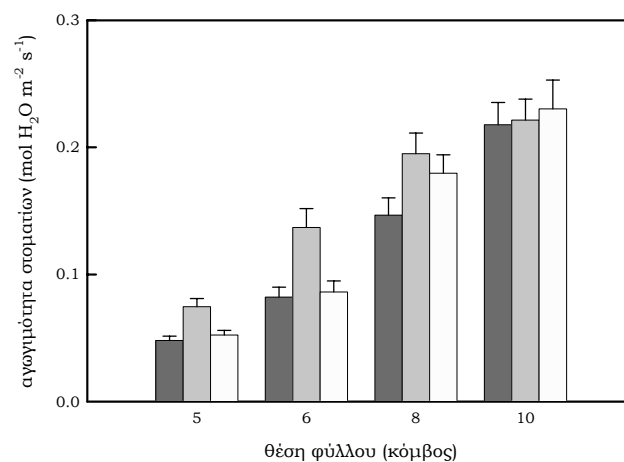
2γ. Ταχύτητα διαπνοής

Στην εικόνα 14 απεικονίζεται η ταχύτητα διαπνοής των φύλλων σε συνάρτηση με την θέση τους στον βλαστό. Παρατηρείται αύξηση της ταχύτητας διαπνοής όσο προχωρά η ανάπτυξη των φύλλων και στις τρεις ποικιλίες, με την



Εικόνα 14. Ταχύτητα διαπνοής στα φύλλα των τριών ποικιλιών αμπέλου συναρτήσει της θέσης τους στο βλαστό. Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο 15 επαναλήψεων (\neq τυπικό σφάλμα του μέσου) ■: cv. Σουλτανίνα, ■: cv. Σιρίκι, □: cv. Αθήρι

ποικιλία Σιρίκι να εμφανίζει τις υψηλότερες τιμές. Είναι αξιοσημείωτη η διαφορά στις τιμές της ταχύτητας διαπνοής μεταξύ της ποικιλίας Σιρίκι συγκριτικά με τις δύο άλλες ποικιλίες ιδιαίτερα στον 6^ο κόμβο. Στα φύλλα του



Εικόνα 15. Αγωγιμότητα στομάτων στα φύλλα των τριών ποικιλιών αμπέλου συναρτήσει της θέσης τους στο βλαστό. Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο 15 επαναλήψεων (\neq τυπικό σφάλμα του μέσου) ■: cv. Σουλτανίνα, ■: cv. Σιρίκι, □: cv. Αθήρι

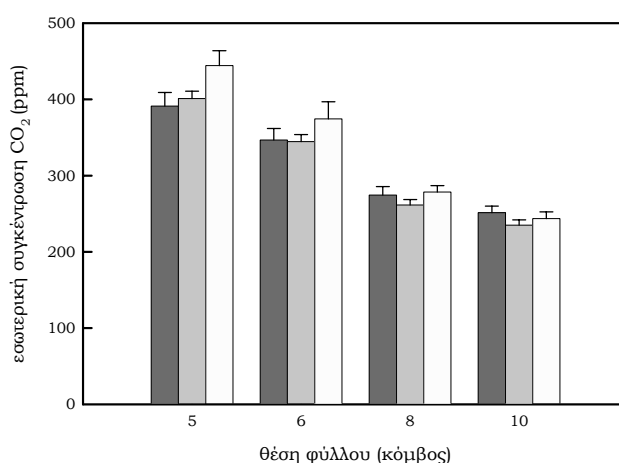
δέκατου κόμβου δεν παρατηρούνται αξιοσημείωτες διαφορές ανάμεσα στις ποικιλίες.

2δ. Αγωγιμότητα στοματίων

Οι τιμές της αγωγιμότητας των στομάτων παρουσίασαν ανάλογη εικόνα με αυτές της διαπνοής (εικόνα 15). Και στις τρεις ποικιλίες οι τιμές της αγωγιμότητας των στομάτων βαίνουν αυξανόμενες έως το αναπτυξιακό στάδιο του 10^{ου} κόμβου. Μέχρι το στάδιο του 10^{ου} κόμβου η αγωγιμότητα των στομάτων είναι υψηλότερη στην ποικιλία Σιρίκι. Στον δέκατο κόμβο δεν παρατηρούνται αξιοσημείωτες διαφορές ανάμεσα στις ποικιλίες.

2ε. Εσωτερική συγκέντρωση CO₂

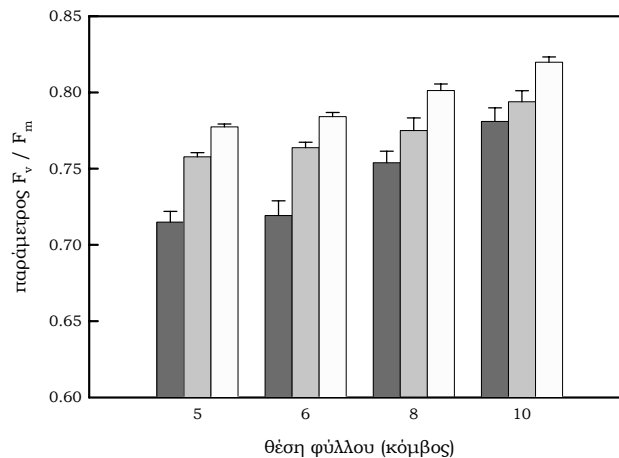
Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των φύλλων μειώνεται η συγκέντρωση του διοξειδίου του άνθρακα στον υποστοματικό χώρο και στις τρεις ποικιλίες (εικόνα 16). Οι διαφορές ανάμεσα στις ποικιλίες εντοπίζονται στα νεαρά στάδια ανάπτυξης και συγκεκριμένα στην ποικιλία Αθήρι η οποία εμφανίζει υψηλότερες τιμές. Επιπρόσθετα, στα φύλλα του 5^{ου} κόμβου της ποικιλίας Αθήρι η συγκέντρωση του εσωτερικού διοξειδίου του άνθρακα είναι πολύ υψηλότερη της ατμοσφαιρικής γεγονός που υποδηλώνει την υψηλότερη συγκριτικά με τις υπόλοιπες δύο ποικιλίες ταχύτητα αναπνοής των κυττάρων του μεσοφύλλου.



Εικόνα 16. Συγκέντρωση CO₂ στον υποστοματικό θάλαμο στα φύλλα των τριών ποικιλιών αμπέλου συναρτήσει της θέσης τους στο βλαστό. Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο 15 επαναλήψεων (\pm τυπικό σφάλμα του μέσου) ■: cv. Σουλτανίνα, ■: cv. Σιρίκι, □: cv. Αθήρι

2στ. Παράμετρος F_v / F_m

Στην εικόνα 17 παρουσιάζεται η παράμετρος του μεταβλητού προς τον μέγιστο φθορισμό (F_v / F_m) σε συνάρτηση με την θέση των φύλλων στον βλαστό. Αυξανόμενου του αναπτυξιακού σταδίου του φύλλου οι τιμές της παραμέτρου αυξάνονται και στις τρεις ποικιλίες και προσεγγίζουν τις φυσιολογικές τιμές της

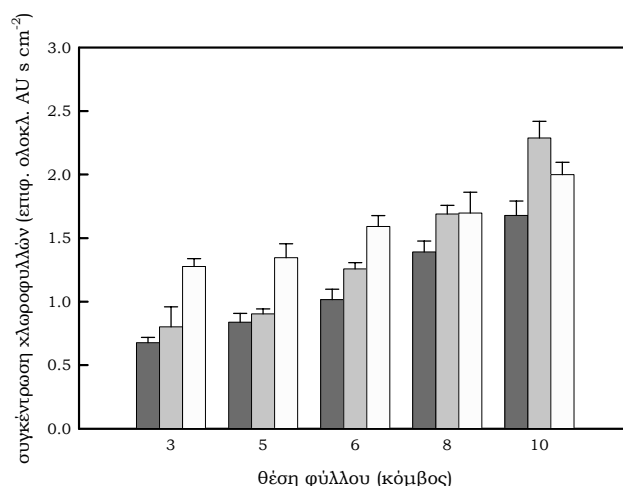


Εικόνα 17. Τιμές της παραμέτρου F_v / F_m στα φύλλα των τριών ποικιλιών αμπέλου συναρτήσει της θέσης τους στο βλαστό. Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο 15 επαναλήψεων (\pm τυπικό σφάλμα του μέσου) ■: cv. Σουλτανίνα, ■: cv. Σιρίκι, □: cv. Αθήρι

παραμέτρου στα φύλλα του 10^{ου} κόμβου. Είναι αξιοσημείωτο ότι σε όλους τους κόμβους η ποικιλία Αθήρι παρουσιάζει τις μεγαλύτερες τιμές, ακολουθεί η ποικιλία Σιρίκι ενώ η ποικιλία Σουλτανίνα παρουσιάζει τις μικρότερες τιμές. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι στα φύλλα της ποικιλίας Σουλτανίνα παρατηρήθηκαν ιδιαίτερα χαμηλές τιμές της παραμέτρου F_v / F_m στα αναπτυξιακά στάδια του 5^{ου} και 6^{ου} κόμβου.

2ζ. Συγκέντρωση χλωροφυλλών

Στην εικόνα 18 απεικονίζεται η συγκέντρωση των χλωροφυλλών a και b ανά μονάδα επιφάνειας ελάσματος σε συνάρτηση με την θέση των φύλλων στον βλαστό. Η συγκέντρωση βαίνει αυξανόμενη, αυξανόμενου του αναπτυξιακού σταδίου των φύλλων και στις τρεις ποικιλίες. Στους μικρότερους κόμβους η ποικιλία Αθήρι παρουσιάζει αισθητά υψηλότερη συγκέντρωση χλωροφυλλών έναντι των άλλων ποικιλιών, ενώ στα τελικά αναπτυξιακά στάδια η υψηλότερη συγκέντρωση μετρήθηκε στην ποικιλία Σιρίκι.



Εικόνα 18. Συγκέντρωση χλωροφυλλών (a και b) ανά μονάδα επιφάνειας ελάσματος στα φύλλα των τριών ποικιλιών αμπέλου συναρτήσει της θέσης τους στο βλαστό. Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο 10 επαναλήψεων (\pm τυπικό σφάλμα του μέσου) ■: cv. Σουλτανίνα, ▒: cv. Σιράκι, □: cv. Αθήρι

2η. Παράμετροι του Φωτοπροστατευτικού Μηχανισμού του Κύκλου των Ξανθοφυλλών

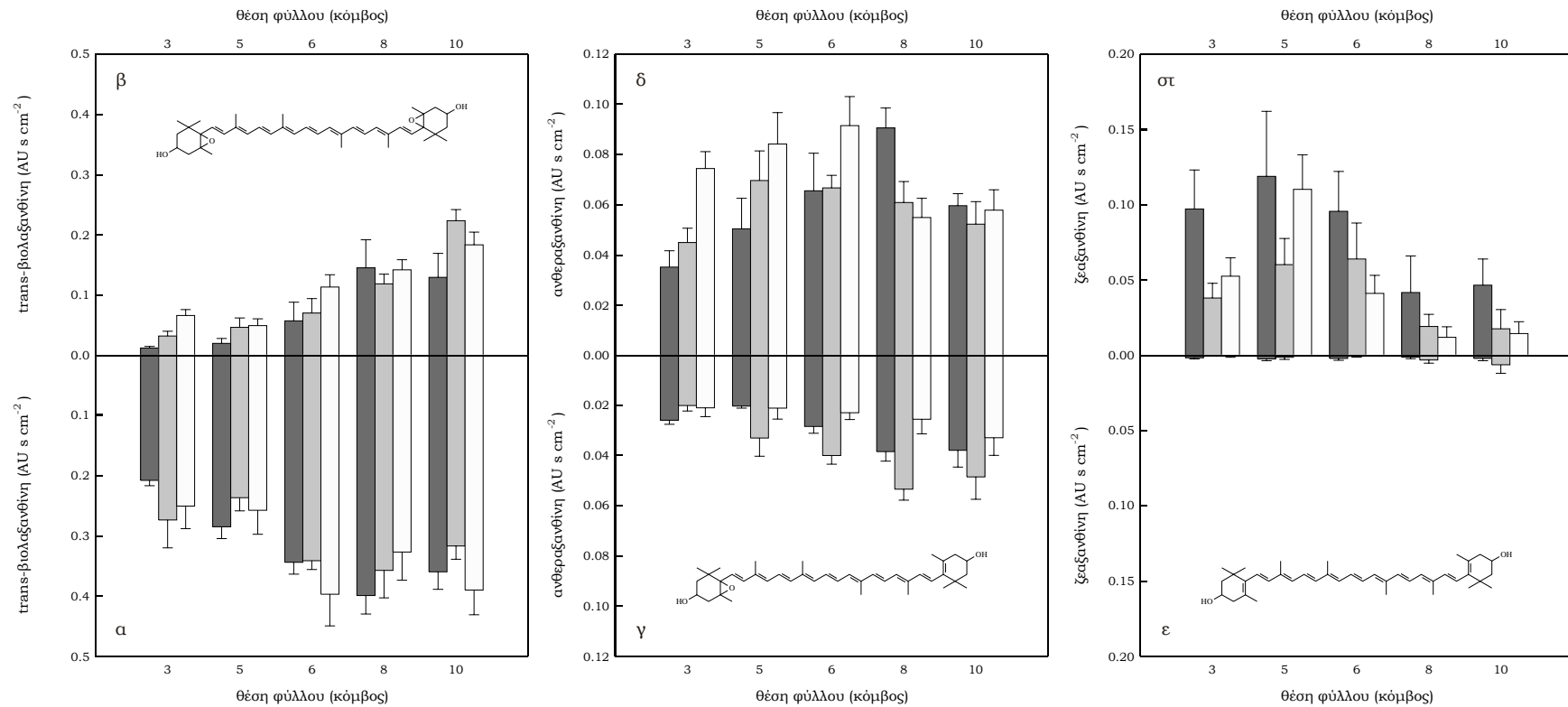
Στην εικόνα 19 παρουσιάζεται η συγκέντρωση ανά μονάδα επιφάνειας ελάσματος των συστατικών του κύκλου των ξανθοφυλλών για τα φύλλα των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων των τριών ποικιλιών. Η συγκέντρωση του οξειδωμένου παραγώγου του κύκλου (trans-βιολαξανθίνη, εικόνα 19α) πριν την ανατολή του ηλίου παρουσιάζει τάσεις αύξησης αυξανόμενης της ηλικίας των φύλλων ανεξαρτήτως ποικιλίας. Το φαινόμενο αυτό παρουσιάζεται εντονότερο κατά τη διάρκεια της μεσημβρίας (εικόνα 19β). Το ανηγμένο παράγωγο παρουσιάζει αντίθετη τάση στη διάρκεια της μεσημβρίας ενώ τα επίπεδά του εμφανίζονται εξαιρετικά χαμηλά κατά την αυγή (εικόνα 19ε). Το ενδιάμεσο παράγωγο του κύκλου παρουσιάζει τάση αύξησης κατά την μεσημβρία αυξανόμενου του αναπτυξιακού σταδίου έως και το στάδιο του 8^{ου} κόμβου και στη συνέχεια τάση μείωσης (εικόνα 19δ). Κατά την αυγή η συγκέντρωση παρουσιάζει τάση αύξησης αυξανόμενου του σταδίου ανάπτυξης (εικόνα 19γ). Όσον αφορά στη σύγκριση των συγκεντρώσεων των τριών παραγώγων μεταξύ των ποικιλιών η Σουλτανίνα εμφανίζεται να υπολείπεται σε συγκέντρωση ανθεραξανθίνης και βιολαξανθίνης και να υπερέχει σε συγκέντρωση ζεαξανθίνης έναντι των άλλων δύο ποικιλιών ανεξαρτήτως αναπτυξιακού σταδίου. Τη χρονική στιγμή πριν την ανατολή του ηλίου η συγκέντρωση της ζεαξανθίνης είναι ελάχιστη σε κάθε περίπτωση. Το ενδιάμεσο παράγωγο του

κύκλου (ανθεραξανθίνη, εικόνες 19γ και δ) εμφανίζει υψηλότερες συγκεντρώσεις τις μεσημβρινές ώρες καθώς ο κύκλος βρίσκεται σε πλήρη λειτουργία (εικόνα 19δ).

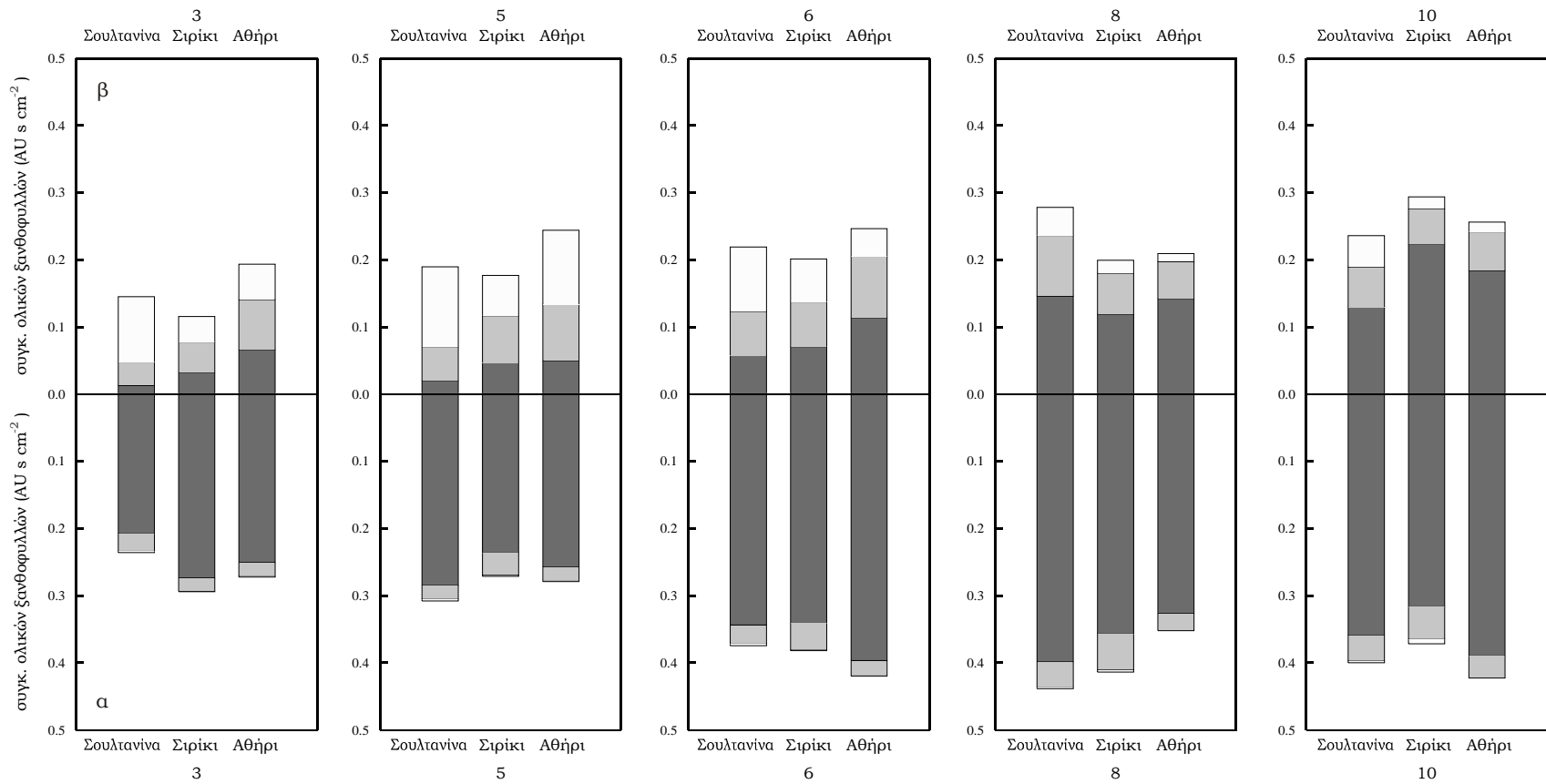
Στην εικόνα 20 παρουσιάζεται αθροιστικά η συγκέντρωση των τριών συστατικών του κύκλου των ξανθοφυλλών εκφρασμένη ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου των τριών ποικιλιών συναρτήσει του αναπτυξιακού σταδίου των φύλλων για τη χρονική στιγμή πριν την ανατολή του ηλίου (εικόνα 20α) και το μεσημέρι (εικόνα 20β). Η τιμή αυτή αντιπροσωπεύει το μέγεθος της δεξαμενής του κύκλου ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου. Κατά τις μεσημβρινές ώρες η ολική συγκέντρωση των τριών συστατικών του κύκλου των ξανθοφυλλών παραμένει σχετικά σταθερή ανεξάρτητα ποικιλίας και αναπτυξιακού σταδίου του φύλλου. Την χρονική στιγμή πριν την ανατολή του ηλίου, παρατηρούνται σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικών ξανθοφυλλών σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια όλων των ποικιλιών, συγκριτικά με τις μεσημεριανές ώρες, με ανατροπή της αναλογίας μεταξύ των τριών παραγώγων και συντριπτική υπεροχή, όπως αναμένεται, του οξειδωμένου παραγώγου της βιολαξανθίνης. Λόγω μη λειτουργίας του κύκλου πριν την ανατολή του ηλίου, τόσο σε επίπεδο αναπτυξιακού σταδίου, όσο και σε επίπεδο ποικιλίας το κλάσμα της trans-βιολαξανθίνης εμφανίζεται εξαιρετικά μεγάλο ενώ το κλάσμα της ζεαξανθίνης είναι μηδενικό. Επιπρόσθετα η συγκέντρωση του ενδιάμεσου παραγώγου δηλαδή της ανθεραξανθίνης κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα συγκριτικά με το μεσημέρι.

Για να διαπιστώσουμε αν υπάρχουν διαφορές στην ποσότητα των καρτενοειδών του κύκλου αναφορικά με την συγκέντρωση χλωροφυλλών εξετάσαμε τη συγκέντρωση των συστατικών του κύκλου ανά μονάδα χλωροφύλλης (εικόνα 21). Η τιμή αυτή αντιπροσωπεύει το μέγεθος της δεξαμενής του κύκλου ανά μονάδα χλωροφύλλης. Από την παράμετρο αυτή μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι η ανάγκη για φωτοπροστασία μέσω του κύκλου των ξανθοφυλλών ανά μονάδα χλωροφύλλης βαίνει μειούμενη καθώς κινούμαστε από την ποικιλία Σουλτανίνα προς την ποικιλία Αθήρι. Η τάση αυτή εμφανίζεται σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια με εξαίρεση τα φύλλα του 10^{ου} κόμβου όπου ωστόσο οι διαφορές είναι γενικά μικρές (εικόνα 21). Επιπροσθέτως τα νεαρά φύλλα ανεξαρτήτως ποικιλίας εμφανίζουν αυξημένες ανάγκες φωτοπροστασίας. Είναι αξιοσημείωτο πως οι υψηλότερες τιμές εμφανίζονται στον 5^ο ή 6^ο κόμβο ενώ είναι ελάχιστες στα φύλλα του 10^{ου} κόμβου σε όλες τις ποικιλίες (εικόνα 21).

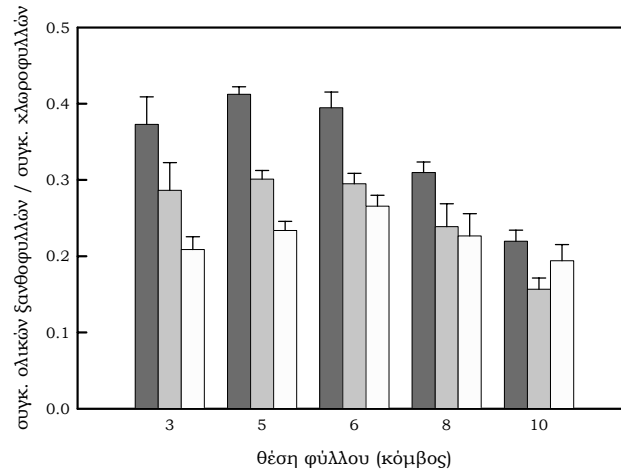
Για να απεικονίσουμε την ένταση λειτουργίας του κύκλου των ξανθοφυλλών στα φύλλα των τριών ποικιλιών κατά τα διάφορα αναπτυξιακά στάδια υπολογίσαμε το συντελεστή μετατροπής (εικόνα 22). Ο συντελεστής αυτός υπολογίζεται ως το κλάσμα των ανηγμένων παραγώγων του κύκλου (ανθεραξανθίνη και ζεαξανθίνη) ως προς τη συνολική δεξαμενή και αντιπροσωπεύει την ένταση λειτουργίας του κύκλου. Στην χρονική στιγμή πριν την ανατολή του ηλίου η τιμές του συντελεστή μετατροπής είναι χαμηλές, γεγονός που υποδηλώνει την κατάσταση ηρεμίας του μηχανισμού φωτοπροστασίας. Κατά τη μεσημβρία παρατηρήθηκαν ιδιαίτερα υψηλές τιμές ανάλογα τόσο με το στάδιο ανάπτυξης όσο και την ποικιλία. Όπως φαίνεται στην εικόνα 22, ανεξαρτήτως σταδίου ανάπτυξης, η ποικιλία Σουλτανίνα παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές του συντελεστή ενώ ακολούθησε η ποικιλία Σιρίκι για τα περισσότερα στάδια ανάπτυξης. Ανά στάδιο ανάπτυξης παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές του συντελεστή στα νεαρά στάδια (3^{ου} και 5^{ου} κόμβου) ενώ χαμηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν από το στάδιο του 6^{ου} κόμβου και εξής.



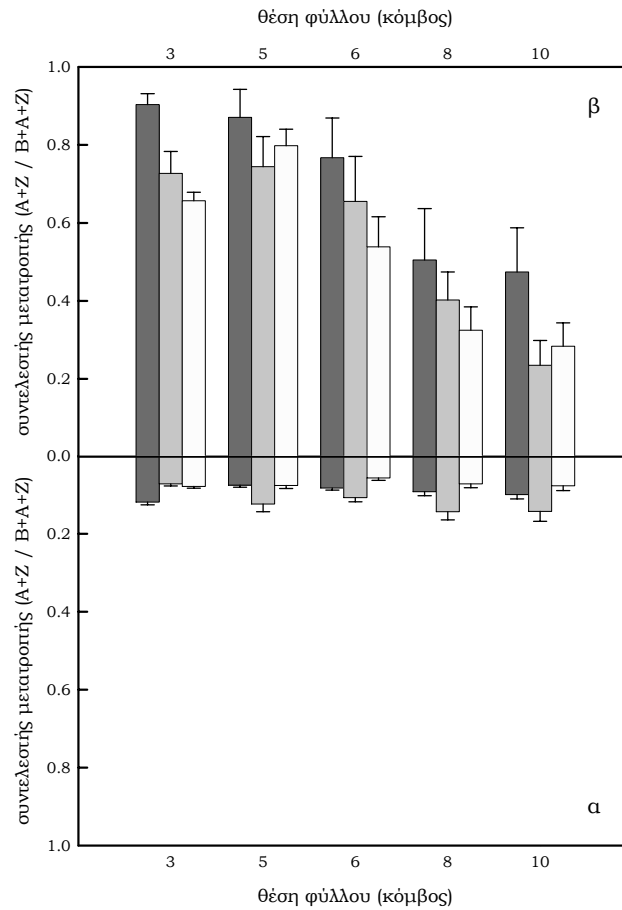
Εικόνα 19. Συγκέντρωση, ανά μονάδα επιφάνειας ελάσματος, των τριών καροτενοειδών του κύκλου των ξανθοφυλλών στα φύλλα των τριών ποικιλιών αμπέλου συναρτήσει της θέσης τους στο βλαστό. α, γ και ε: πριν την ανατολή του ήλιου, β, δ και στ: μεσημέρι α και β: trans-βιολαξανθίνη, γ και δ: ανθεραξανθίνη, ε και στ: ζεαξανθίνη. Οι ράβδοι αντιπροσωπείουν στο μέσο όρο πέντε επαναλήψεων (\neq τυπικό σφάλμα του μέσου) ■: cv. Σουλτανίνα, ■: cv. Σιρίκι, □: cv. Αθήρι



Εικόνα 20. Διαγράμματα σωρού των τριών καροτενοειδών του κύκλου των ξανθοφυλλών στα φύλλα των τριών ποικιλιών αμπέλου συναρτήσει της θέσης τους στο βλαστό. α: πριν την ανατολή του ήλιου, β: μεσημέρι ■: trans-βιολαξανθίνη, ▒: ανθεραξανθίνη, □: ζεαξανθίνη



Εικόνα 21. Το μέγεθος δεξαμενής των καροτενοειδών του κύκλου των ξανθοφυλλών ως προς το περιεχόμενο σε χλωροφύλλες στα φύλλα των τριών ποικιλιών αμπέλου πριν την ανατολή του ηλίου. Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο πέντε επαναλήψεων (\neq τυπικό σφάλμα του μέσου) ■: cv. Σουλτανίνα, ■: cv. Σιρίκι, □: cv. Αθήρι



Εικόνα 22. Ο συντελεστής μετατροπής των καροτενοειδών του κύκλου των ξανθοφυλλών ως προς το περιεχόμενο σε κλωροφύλλες στα φύλλα των τριών ποικιλιών αμπέλου συναρτήσει της θέσης τους στο βλαστό. α: πριν την ανατολή του ηλίου, β: μεσημέρι. Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο πέντε επαναλήψεων (\pm τυπικό σφάλμα του μέσου) ■: cv. Σουλτανίνα, ▒: cv. Σιράκι, □: cv. Αθήρι

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας μπορούν να συνερμηνευτούν με εκείνα προηγούμενης εργασίας της ερευνητικής μας ομάδας (Karabourniotis et al., 1999), σύμφωνα με την οποία η ύπαρξη τριχώματος στα νεαρά φύλλα της ποικιλίας Αθήρι έχει ως αποτέλεσμα ένα ποσοστό μόνο της ορατής ακτινοβολίας (μετρημένη ως μονοχρωματική ακτινοβολία μήκους κύματος 430 nm) να διεισδύει στην περιοχή του μεσοφύλλου των φύλλων αυτών. Κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει στα νεαρά φύλλα της ποικιλίας Σουλτανίνα, το μεσόφυλλο των οποίων δέχεται το σύνολο σχεδόν της ορατής προσπίπτουσας ακτινοβολίας (Karabourniotis et al., 1999). Ωστόσο, την ίδια συμπεριφορά με την ποικιλία Σουλτανίνα έδειξε και η ποικιλία Φράουλα (με ανθοκυανίνες, ανάλογη της ποικιλίας Σιρίκι της παρούσης εργασίας), παρόλο που τα νεαρά φύλλα της οποίας διαθέτουν ανθοκυανίνες στους επιφανειακούς ιστούς (Karabourniotis et al., 1999). Η ανακολουθία αυτή θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι στις μετρήσεις της παραπάνω εργασίας δεν χρησιμοποιήθηκαν μήκη κύματος τυπικά των μεγίστων απορρόφησης των ανθοκυανινών (500–550 nm) αλλά αντίθετα μπλε μονοχρωματική ακτινοβολία (430 nm) η οποία τοποθετείται στο ελάχιστο του φάσματος απορρόφησης των παραπάνω μορίων (Karabourniotis et al., 1999; Strack and Wray, 1989). Ωστόσο άλλες εργασίες αναφέρουν ότι η παρουσία ανθοκυανινών στους επιδερμικούς ιστούς των φύλλων συμβάλλει στη μείωση της έντασης της φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας στους εσωτερικούς χλωροφυλλούχους ιστούς συμβάλλοντας στην επικράτηση συνθηκών σκιάς για τα φύλλα αυτά και τελικά συμβάλλοντας και στην φωτοπροστασία (Merzlyak and Chivkunova, 2000; Manetas et al., 2002; Steyn et al., 2002; Manetas et al., 2003).

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδηλώνουν ότι τα επιφανειακά οπτικά φράγματα (είτε ως τριχώμα είτε ως αυξημένη συγκέντρωση ανθοκυανινών στους επιδερμικούς ιστούς) προκαλούν μείωση της διεισδυτικότητας της φωτεινής ακτινοβολίας και ως εκ' τούτου συμβάλλουν στη φωτοπροστασία συνεργιστικά με το βιοχημικό προστατευτικό μηχανισμό του κύκλου των ξανθοφυλλών.

Στην παρούσα εργασία δείχθηκε ότι τα νεαρά φύλλα των ποικιλιών Αθήρι και Σιρίκι διαθέτουν σαφώς υψηλότερες τιμές της παραμέτρου F_v/F_m ,

έναντι αυτών της ποικιλίας Σουλτανίνα, γεγονός που υποδηλώνει ότι είτε στα φύλλα της ποικιλίας Σουλτανίνα η οργάνωση της φωτοσυνθετικής συσκευής καθυστερεί είτε ότι τα νεαρά φύλλα της ποικιλίας αυτής εμφανίζουν συμπτώματα καταπόνησης του PSII σε μεγαλύτερη ένταση από ότι τα νεαρά φύλλα των άλλων ποικιλιών. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδηλώνουν ότι κατά πάσα πιθανότητα η δεύτερη εκδοχή ευθύνεται για τις παρατηρούμενες διαφορές στην τιμή της παραμέτρου F_v / F_m . Ο φωτοπροστατευτικός ρόλος του τριχώματος έχει αποδοθεί τόσο στην παρεμπόδιση εισόδου της υπεριώδους όσο και της ορατής ακτινοβολίας (Karabourniotis et al., 1992; Karabourniotis and Fasseas, 1996; Karabourniotis and Bornman, 1999; Karabourniotis et al., 1999; Manetas, 2003). Πρόσφατα, οι Morales et al. (2002) έδειξαν ότι η ύπαρξη τριχώματος στην αριά (*Quercus ilex*) συμβάλλει στη βελτίωση της φωτοχημικής ικανότητας του PS II συγκριτικά με το πουρνάρι (*Quercus coccifera*) του οποίου τα φύλλα δεν διαθέτουν τρίχωμα.

Όπως τονίστηκε στην εισαγωγή ο κύκλος των ξανθοφυλλών αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό φωτοπροστασίας παρέχοντας τη δυνατότητα μη φωτοχημικής απόσβεσης της περίσσειας ενέργειας σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού. Συνεπώς, μέσω της μελέτης των χαρακτηριστικών του κύκλου καθίσταται δυνατή η εκτίμηση του ρόλου των οπτικών ιδιοτήτων των φύλλων ως προς την προστασία της φωτοσυνθετικής συσκευής. Η λειτουργία του μηχανισμού μπορεί να εκτιμηθεί από τη συνιστώσα δύο παραμέτρων. Η πρώτη αφορά στον υπολογισμό της συγκέντρωσης των καρτενοειδών του κύκλου (μέγεθος δεξαμενής) ενώ η δεύτερη στον υπολογισμό του ρυθμού μετατροπής των οξειδωμένων προς τις ανηγμένες μορφές του κύκλου (ένταση λειτουργίας του κύκλου). Γενικά πιστεύεται πως τόσο το μέγεθος της δεξαμενής των συστατικών όσο και η ένταση λειτουργίας του κύκλου σχετίζονται τόσο με τις επικρατούσες συνθήκες φωτός όσο και με το φωτεινό καθεστώς στο οποίο έχουν εγκλιματιστεί τα φύλλα (Demming-Adams et al., 1995; Ortoizze and Düring, 2001). Στην παρούσα εργασία, το μέγεθος της δεξαμενής των καρτενοειδών του κύκλου ως προς την επιφάνεια των φύλλων δεν εμφάνισε σημαντικές διαφορές μεταξύ των ποικιλιών γεγονός που υποδηλώνει ότι σε κάθε περίπτωση τα φύλλα είναι εγκλιματισμένα σε συνθήκες υψηλών εντάσεων ακτινοβολίας. Ωστόσο όταν το μέγεθος της δεξαμενής εκφράστηκε ως προς το περιεχόμενο σε χλωροφύλλες των φύλλων, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ποικιλιών κυρίως κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των

φύλλων. Μεγαλύτερες τιμές εμφανίστηκαν στα φύλλα της ποικιλίας Σουλτανίνα ακολουθούμενη από την ποικιλία Σιρίκι ενώ η ποικιλία Αθήρι εμφάνισε τις μικρότερες τιμές του λόγου. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι η παραπάνω έκφραση με βάση το περιεχόμενο σε χλωροφύλλη ενδεχομένως αντικατοπτρίζει πληρέστερα την *in vivo* κατάσταση καθώς εκφράζει τις ανάγκες για φωτοπροστασία σε σχέση με το στάδιο οργάνωσης και πιθανόν το μέγεθος της αντένας φωτοσυλλογής. Οι Kyriarissis et al. (1995) έδειξαν ότι στο φυτό *Flomis fruticosa* η παράμετρος του μεγέθους της δεξαμενής των καροτενοειδών του κύκλου ως προς το περιεχόμενο σε χλωροφύλλες αποτελεί δείκτη που σχετίζεται με το βαθμό καταπόνησης του φυτού λόγω έλλειψης υγρασίας και συνεπώς με τις ανάγκες για φωτοπροστασία. Στην παρούσα εργασία, διαφορές μεταξύ των ποικιλιών καταγράφηκαν και για τον συντελεστή μετατροπής των καροτενοειδών, παράμετρος η οποία υποδηλώνει την ένταση λειτουργίας του κύκλου των ξανθοφυλλών. Η ποικιλία Σουλτανίνα εμφάνισε την υψηλότερη τιμή, ακολουθούμενη από τις ποικιλίες Σιρίκι και Αθήρι. Τα παραπάνω αποτελέσματα συνηγορούν στο ότι η ύπαρξη τριχώματος ή ανθοκυανινών στα φύλλα του αμπελιού μειώνει τις ανάγκες για φωτοπροστασία μέσω του βιοχημικού μηχανισμού του κύκλου των ξανθοφυλλών. Οι Morales et al., (2002) αναφέρουν ότι στην αριά, η παρουσία τριχώματος συμβάλλει στην φωτοπροστασία των φύλλων. Σύμφωνα με τους παραπάνω ερευνητές, στο πουρνάρι (τα φύλλα του οποίου δεν διαθέτουν τριχώμα) αναπτύσσεται υψηλότερο μέγεθος δεξαμενής των καροτενοειδών του κύκλου των ξανθοφυλλών ενώ και ο συντελεστής μετατροπής είναι επίσης πολύ μεγαλύτερος. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν ληφθεί και για τα πρόσκαιρα τριχωτά νεαρά φύλλα του πλατάνου όπου η παρουσία τριχώματος έχει ως αποτέλεσμα σημαντικά μειωμένη συγκέντρωση της δεξαμενής ξανθοφυλλών αλλά επιπλέον και μειωμένη ικανότητα των νεαρών φύλλων, συγκριτικά με τα ώριμα, να κινητοποιήσουν τον κύκλο σε μεγάλη έκταση (Bisba et al., 1997). Σύμφωνα με τα παραπάνω, στα νεαρά φύλλα του πλατάνου η παρουσία του τριχώματος παίζει ουσιώδη ρόλο στη φωτοπροστασία ενώ η απουσία του θα μπορούσε να έχει σημαντικές συνέπειες στη θωράκιση των φύλλων αυτών. Αντίθετα, στην παρούσα εργασία, τα νεαρά φύλλα της ποικιλίας Αθήρι παρόλο που καλύπτονται από πυκνό στρώμα τριχώματος (Karabourniotis et al., 1999) παρουσίασαν υψηλές συγκεντρώσεις των καροτενοειδών του κύκλου των ξανθοφυλλών και υψηλό συντελεστή μετατροπής (υψηλό βαθμό κινητοποίησης του κύκλου), μικρότερο από αυτόν των νεαρών φύλλων της ποικιλίας

Σουλτανίνα, αλλά οπωσδήποτε υψηλότερο αυτού των ώριμων φύλλων της ίδιας ποικιλίας. Ανάλογη συμπεριφορά με την ποικιλία Αθήρι διαπιστώθηκε και για την ποικιλία Σιρίκι. Λαβαίνοντας υπόψη τα παραπάνω θα μπορούσαμε να πιθανολογήσουμε για το υψηλό φωτοπροστατευτικό δυναμικό τόσο του φυτού του αμπελιού όσο και ειδικότερα των δύο ποικιλιών Σιρίκι και Αθήρι συγκριτικά με άλλα φυτά. Συμπερασματικά λοιπόν, από τα δεδομένα της παρούσας εργασίας προκύπτει ότι η ποικιλία Σουλτανίνα η οποία δεν διαθέτει τρίχωμα ή ανθοκυανίνες στα φύλλα των αντίστοιχων αναπτυξιακών σταδίων, αντίθετα με τις άλλες δυο ποικιλίες αναγκάζεται να κινητοποιήσει το μηχανισμό της απόσβεσης της περίσσειας ενέργειας μέσω του κύκλου των ξανθοφυλλών σε μεγαλύτερη ένταση. Παρόλα αυτά φαίνεται ότι τα νεαρά φύλλα της ποικιλίας αυτής καταπονούνται περισσότερο από τις υψηλές εντάσεις φωτισμού. Η στρατηγική η οποία τελικώς εμφανίζεται σε κάθε ποικιλία όσον αφορά τη φωτοπροστασία έχει πιθανώς σχέση και με την ανθεκτικότητά της έναντι βιοτικών ή / και αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης. Για παράδειγμα είναι πολύ πιθανό η ποικιλία Αθήρι να είναι ανθεκτικότερη έναντι ενός συνδυασμού παραγόντων καταπόνησης όπως π.χ. υψηλών εντάσεων φωτεινής ακτινοβολίας και έλλειψης νερού έναντι της ποικιλίας Σουλτανίνα. Τα δεδομένα επίσης δείχνουν ότι η ανάπτυξη τριχώματος ή έγχρωμης επιδερμίδας παρέχουν προστασία έναντι των υψηλών εντάσεων φωτεινής ακτινοβολίας, ωστόσο φαίνεται ότι απαιτούν ένα επιπλέον κόστος κατασκευής. Η Σουλτανίνα, ιδιαίτερα κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των φύλλων της εμφανίζει υψηλότερες τιμές του δείκτη φυλλικής επιφάνειας (εικόνα 10) και χαμηλότερους ρυθμούς αναπνοής έναντι των άλλων δύο ποικιλιών.

Τα δεδομένα της εργασίας αυτής συμφωνούν με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (Grammatikopoulos et al., 1994) στο ότι το τρίχωμα δεν συμβάλλει ιδιαίτερα στον περιορισμό των διαπνευστικών απωλειών, δεδομένου ότι η ποικιλία Αθήρι που διαθέτει τρίχωμα δεν εμφάνισε σημαντικές διαφορές στον ρυθμό διαπνοής έναντι των άλλων δύο ποικιλιών. Επίσης τα δεδομένα μας συμφωνούν με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας ότι ένα τυπικό φύλλο εμφανίζει θετικό ισοζύγιο άνθρακα (και επομένως μετατρέπεται από καταναλωτή σε παραγωγό) όταν η επιφάνειά του φτάσει το 60% περίπου της επιφάνειας ενός ώριμου φύλλου.

B βλιογραφία



- Adams, W.W.III, Demmig-Adams, B., Winter, K. and Schreiber, U. 1990. The ratio of variable to maximum chlorophyll fluorescence from photosystem II, measured in leaves at ambient temperature and at 77°K, as an indicator of the photon yield of photosynthesis. *Planta*, 180: 166-174
- Anderson, J.M., Park, Y.-I., Chow, W.S. 1997. Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in nature. *Physiologia Plantarum*, 100: 214-223
- Andersson, B. and Barber, J. 1996. Mechanisms of photodamage and protein degradation during photoinhibition of photosystem II. In: N.R. Baker (ed) *Photosynthesis and the environment*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp 101-121
- Aro, E.-M., Virgin, I. and Andersson, B. 1993. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1143: 113-134
- Barber, J. 1994. Molecular basis of the vulnerability of photosystem II to damage by light. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 201-208
- Bartley, G.E. and Scolnik, P.A. 1995. Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction and human health. *Plant Cell*, 7: 1027-1038
- Bauer, J., Hiltbrunner, A. and Kessler, F. 2001. Molecular biology of chloroplast biogenesis: gene expression, protein import and intraorganellar sorting. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 420-433
- Bertamini, M. and Nedunchezian, N. 2003a. Photoinhibition of photosynthesis in mature and young leaves of grapevine (*Vitis Vinifera* L.). *Plant Science*, 164: 635-644
- Bertamini, M. and Nedunchezian, N. 2003b. Photosynthetic functioning of individual grapevine leaves (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir) during ontogeny in the field. *Vitis*, 1: 13-17

- Bisba, A., Petropoulou, Y. and Manetas, Y. 1997 The transiently pubescent young leaves of plane (*Platanus orientalis*) are deficient in photodissipative capacity. *Physiologia Plantarum*, 101: 373-378
- Biswal, B. and Biswal, U.C. 1999. Photosynthesis under stress: stress signals and adaptive response of chloroplasts. In: M. Pessaraki (ed), Handbook of plant and crop stress, New York: Marcel Dekker, pp. 315-336
- Bukhov, N.G., Kopecky, J., Pfundel, E.E., Klughammer, C. and Heber, U. 2001. A few molecules of zeaxanthin per reaction center of photosystem II permit effective thermal dissipation of light energy in photosystem II of a poikilohydric moss. *Planta*, 212: 739-748
- Choudhury, N.K., Aslam, M. and Huffaker, R.C. 1994. Photochemical activities in wheat chloroplasts incubated under irradiation and possible protection by zeaxanthin. *Photosynthetica*, 30: 397-405
- Choudhury, N.K., Choe, H.T. and Huffaker, R.C. 1993. Ascorbate induced zeaxanthin formation in wheat leaves and photoprotection of pigment and photochemical activities during aging of chloroplasts in light. *Journal of Plant Physiology*, 141: 551-556
- Choquet, Y. and Vallon, O. 2000. Synthesis, assembly and degradation of thylakoid membrane proteins. *Biochimie*, 82: 615-634
- Choudhury, N.K. and Behera, R.K. 2001. Photoinhibition of photosynthesis: Role of carotenoids in photoprotection of chloroplast constituents. *Photosynthetica*, 39: 481-488
- Cogdell, R.J. and Frank, H.A. 1987. How carotenoids function in photosynthetic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 895: 63-79
- Critchley, C. and Russel, A. W. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in vivo: The role of protein turnover in photosystem II. *Physiologia Plantarum*, 92: 188-196
- Darko, E., Schoefs, B. and Lemoine, Y. 2000. Improved liquid chromatographic method for the analysis of photosynthetic pigments of higher plants. *Journal of Chromatography A*, 876: 111-116

- Demmig-Adams, B. 1990. Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1020: 1-24
- Demmig-Adams, B. and Adams, W.W. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, 1: 21-26
- Demming-Adams, B., Adams III, W.W., Logan, B.A. and Verhoeven, A.S. 1995. Xanthophyll cycle-dependent energy dissipation and flexible photosystem II efficiency in plants acclimated to light stress. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 249-260
- Eskling, M., Arvidsson, P.-O. and Akerlund, H.-E. 1997. The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiologia Plantarum*, 100: 806-816
- Fankhauser, C. and Chory, J. 1997. Light control of plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13: 203-229
- Flexas, J., Escalona, J.M. and Medrano, H. 1998. Down-regulation of photosynthesis by drought under field conditions in grapevine leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*. 25: 893-900
- Gilmore, A.M. 1997. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiologia Plantarum*, 99: 197-209
- Gilmore, A.M., Shinkarev, V.P., Hazlett, T.L. and Govindjee 1998. Quantitative analysis of the effects of intrathylakoid pH and xanthophyll cycle pigments on chlorophyll a fluorescence lifetime distribution and intensity in thylakoids. *Biochemistry*, 37: 13582-13593
- Gilmore, A.M. 2001. Xanthophyll cycle-dependent non-photochemical quenching in photosystem II: mechanistic insights gained from *Arabidopsis thaliana* L. mutants that lack violaxanthin deepoxidase activity and / or lutein. *Photosynthesis Research*, 67: 89-101
- Gilmore, A.M. and Govindjee 1999. How higher plants respond to excess light: Energy dissipation in photosystem II. In: G.S. Singhal, G. Renger, S.K. Sopory, K.-D. Irrang, Govindjee (eds), Concepts in photobiology:

- Photosynthesis and photomorphogenesis, New Delhi: Narosa Publishing House, pp. 513-548
- Gilmore, A.M. and Yamamoto H.Y. 2001. Time resolution of the antheraxanthin- and pH-dependent chlorophyll a fluorescence components with photosystem II energy dissipation in *Mantoniella squamata*. *Photochemistry and Photobiology*, 74: 291-302
- Gould, K.S., Neill, S.O. and Vogelmann, T.C. 2002. A unified explanation for anthocyanins in leaves? *Advances in Botanical Research*, 37: 167-192
- Grudziński, W., Matula, M., Siewiesiuk, J., Kernen, P., Krupa, Z. and Gruszecki, W.I. 2001. Effect of 13-cis violaxanthin on organization of light harvesting complex II in monomolecular layers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1503: 291-302
- Hall, D.O. and Rao, K.K. 1999. Photosynthesis. Cambridge: Cambridge University Press
- Horton, P., Ruban, A.V. and Young, A.J. 1999. Regulation of the structure and function of the light-harvesting complexes of photosystem II by the xanthophyll cycle. In: H.A. Frank, A.J. Young, G. Britton, R.J. Cogdell (eds), *The photochemistry of carotenoids*, Vol. 8, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 271-291
- Jegerschöld, C., Virgin, I. and Styring, S. 1990. Light-dependent degradation of the D1 protein in photosystem II is accelerated after inhibition of the water splitting reaction. *Biochemistry*, 29: 6179-6186
- Karabourniotis, G., Papadopoulos, K., Papamarkou, M. and Manetas, Y. 1992. Ultraviolet-B radiation absorbing capacity of leaf hairs. *Physiologia Plantarum*, 86: 414-418.
- Karabourniotis, G. and Fasseas, C. 1996. The dense indumentum with its polyphenol content may replace the protective role of the epidermis in some young xeromorphic leaves. *Canadian Journal of Botany*, 74: 347-351
- Karabourniotis, G. and Bornman, J.F. 1999. Penetration of UV-A, UV-B and blue light through the leaf trichome layers of two xeromorphic plants, olive and oak, measured by optical fibre microprobes. *Physiologia Plantarum*, 105: 655-661

- Karabourniotis, G., Bornman, J.F. and Liakoura, V. 1999. Different leaf surface characteristics of three grape cultivars affect leaf optical properties as measured with fibre optics: possible implication in stress tolerance. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26: 47-53
- Kyparissis, A., Drilias, P. and Manetas, Y. 2000. Seasonal fluctuations in photoprotective (xanthophyll cycle) and photoselective (chlorophylls) capacity in eight Mediterranean plant species belonging to two different growth forms. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27: 265-272
- Lawlor, D.W. 2001. Photosynthesis. Oxford: Bios Scientific Publishers
- Manetas, Y. 2003. The importance of being hairy: the adverse effects of hair removal on stem photosynthesis of *Verbascum speciosum* are due to solar UV-B radiation. *New Phytologist*, 158: 503-508
- Manetas, Y., Drinia, A. and Petropoulou, Y. 2002. High contents of anthocyanins in young leaves are correlated with low pools of xanthophyll cycle components and low risk of photoinhibition. *Photosynthetica*, 40: 349-354
- Manetas, Y., Petropoulou, Y., Psaras, G.K. and Drinia, A. 2003. Exposed red (anthocyanic) leaves of *Quercus coccifera* display shade characteristics. *Functional Plant Biology*, 30: 265-270
- Mattoo, A.K., Hoffman-Falk, H., Marder, J.B. and Edelman, M. 1984. Regulation of protein metabolism: coupling of photosynthetic electron transport to in vivo degradation of the rapidly metabolized 32-kilodalton protein of the chloroplast membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 81: 1380-1384
- Maxwell, D.P., Falk, S. and Huner, N.P.A. 1995. Photosystem II excitation pressure and development of resistance to photoinhibition. I. Light-harvesting complex II abundance and zeaxanthin content in *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiology*, 107: 687-694
- Merzlyak, M.N. and Chivkunova, O.B. 2000. Light-stress-induced pigment changes and evidence for anthocyanin photoprotection in apples. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, 55: 155-163

- Minkov, I.N., Janoubjan, G.T., Denev, I.D. and Toneva, V.T. 1999. Photooxidative stress in higher plants. In: M. Pessarakli (ed), Handbook of plant and crop stress, New York: Marcel Dekker, pp. 499-525
- Miyazawa, S-I., Makino, A. and Terashima, I. 2003. Changes in mesophyll anatomy and sink-source relationships during leaf development in *Quercus glauca*, an evergreen tree showing delayed leaf greening. *Plant, Cell and Environment*, 26(5): 745-755
- Morales, F., Abadía, A., Abadía, J., Montserrat, G. and Gil-Pelergín, E. 2002. Trichomes and photosynthetic pigment composition changes: Responses of *Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp. and *Quercus coccifera* L. to Mediterranean stress conditions. *Trees*, 16: 504-510
- Murray, J.R. and Hackett, W.P. 1991. Dihydroflavonol reductase-activity in relation to differential anthocyanin accumulation in juvenile and mature phase *Hedera helix* L. *Plant Physiology*, 97: 343-351
- Nikolopoulos, D., Liakopoulos, G., Drossopoulos, I. and Karabourniotis, G. 2002. The relationship between anatomy and photosynthetic performance of heterobaric leaves. *Plant Physiology*, 129: 235-243
- Ortoidze, T. and Düring, H. 2001. Light utilization and thermal dissipation in light- and shade-adapted leaves of *Vitis* genotypes. *Vitis*, 40: 131-136
- Owens, T.G., Shreve, A.P. and Albrecht, A.C. 1992. Dynamics and mechanisms of singlet energy transfer between carotenoids and chlorophylls: Light harvesting and non-photochemical fluorescence quenching. In: N. Murata (ed), Research in photosynthesis, Vol. 1, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 179-186
- Prášil, O., Adir, N. and Ohad, I. 1992. Dynamic of photosystem II: mechanism of photoinhibition and recovery processes. In: J. Barber (ed), The photosystems: Structure, function and molecular biology, Amsterdam: Elsevier, pp. 293-348
- Pyke, K., Marrison, J.L. and Leech, R.M. 1991. Temporal and spatial development of the cells of the expanding first leaf of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 42: 1407-1416

- Reisman, S. and Ohad, I. 1986. Light-dependent degradation of the thylakoid 32 kDa QB-protein in isolated chloroplast membranes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 849: 51-61
- Searle, G., Brody, S. and Hoek, A.v. 1990. Evidence for the formation of a chlorophyll a/zeaxanthin complex in lecithin liposomes from fluorescence decay kinetics. *Photochemistry and Photobiology*, 52: 401-407
- Siefermann-Harms, D. 1985. Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 811: 325-355
- Sonoike, K., Terashima, I., Iwaki, M. and Itoh, S. 1994. Destruction of photosystem I iron-sulfur centers in leaves of *Cucumis sativus* L. by weak illumination at chilling temperatures. *FEBS Letters*, 362: 235-238
- Steyn, W.J., Wand, S.J.E., Holcroft, D.M. and Jacobs, G. 2002. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist*, 155: 349-361.
- Strack, D. and Wray, V. 1989. Anthocyanins. In: J.B. Harborne (ed), *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 1 Phenolics, San Diego: Academic Press, pp. 325-356
- Thompson, L.K. and Brudvig, G.W. 1988. Cytochrome b-559 may function to protect photosystem II from photoinhibition. *Biochemistry*, 27: 6653-6658
- Turgeon, R. 1989. The sink-source transition in leaves. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 119-138
- Van Lijsebettens, M. and Clarke, J. 1998. Leaf development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36: 47-60*1
- Vass, I., Styring, S., Hundal, T., Koivuniemi, A., Aro, E.-M. and Andersson, B. 1992. The reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II - stable reduced QA species promote chlorophyll triplet formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 89: 1408-1412
- Young, A.J., Philip, D., Frank, H.A., Ruban, A.V. and Horton, P. 1997. The xanthophyll cycle and carotenoid mediated dissipation of excess

excitation energy in photosynthesis. *Pure and Applied Chemistry*, 69:
2125-2130

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

Δροσόπουλος Ι. 1998. Φυσιολογία Φυτών. Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Καραμπουρνιώτης, Γ. 2003. Φυσιολογία Καταπονήσεων των Φυτών. Αθήνα:
Εκδόσεις Έμβρυο

