

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

**Εκτίμηση του φωτοπροστατευτικού δυναμικού των  
ανθοκυανινών στο φυτό *Berberis cretica* μέσω της  
μελέτης φθορισμού χλωροφύλλης *in vivo***



ΧΑΡΙΚΛΕΙΑ ΚΥΡΙΑΚΙΔΟΥ  
ΑΘΗΝΑ 2014



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γεώργιος Λιακόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής (Επιβλέπων)

Γεώργιος Καραμπουρνιώτης, Καθηγητής (Μέλος)

Στυλιανή Χωριανοπούλου, Λέκτορας (Μέλος)



## Περιεχόμενα

|   |    |
|---|----|
| Περιεχόμενα.....  | 5  |
| Πρόλογος.....   | 7  |
| I. Εισαγωγή.....  | 9  |
| I.1. Γενικά στοιχεία .....  | 9  |
| I.1.1. Η απορρόφηση του φωτός από τους φωτοσυνθετικούς ιστούς – οπτικές ιδιότητες των φύλλων, φάσματα απορρόφησης, σκέδασης, περατότητας.....   | 10 |
| I.2. Οργάνωση και λειτουργία των χλωροπλαστών .....   | 13 |
| I.2.1. Λεπτή δομή και βιοχημικοί παράγοντες των χλωροπλαστών .....  | 13 |
| I.2.2. Οργάνωση των φωτοσυστημάτων στις χλωροπλαστικές μεμβράνες .....  | 16 |
| I.3. Φωτοσυνθετική λειτουργία.....  | 17 |
| I.3.1. Οι φωτεινές αντιδράσεις .....  | 17 |
| I.3.1.1. Φωτοσυλλογή .....  | 18 |
| I.3.1.2. Φωτοχημική ροή ηλεκτρονίων και παραγωγή χημικής ενέργειας.....   | 19 |
| I.3.2. Οι σκοτεινές αντιδράσεις.....  | 22 |
| I.3.2.1. Ο κύκλος της αφομοίωσης του διοξειδίου του άνθρακα .....   | 22 |
| I.3.2.2. Παραλλαγές στη βιοχημική οδό φωτοσυνθετικής ενσωμάτωσης του άνθρακα (C3, C4 και CAM φωτοσύνθεση).....  | 24 |
| I.3.3. Καταπόνηση της φωτοσυνθετικής συσκευής από υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας, φωτοαναστολή και φωτοπροστασία.....   | 27 |
| I.3.3.1. Οπτικά φράγματα των φύλλων, παρουσία ανθοκυανιούχων κυττάρων κι επιπτώσεις στις οπτικές ιδιότητες των φύλλων.....  | 29 |
| I.3.3.2. Εναλλακτικές οδοί απόσβεσης της ενέργειας της φωτεινής ακτινοβολίας στο επίπεδο της φωτοσυλλογής (αποδιέγερση χλωροφύλλης, κύκλος των ξανθοφυλλών (qE), κατάσταση τριπλότητας, απόσβεση μέσω ενεργού φωτοαναστολής (qI)) ..... | 32 |
| I.3.3.2.1. Ο κύκλος των ξανθοφυλλών .....   | 35 |
| I.3.3.3. Εναλλακτικές βιοχημικές οδοί χρήσης της φωτοσυνθετικής ενέργειας (χλωροπλαστική αναπνοή, φωτοαναπνοή, οδός Mehler) .....   | 37 |
| II. Σκοπός της εργασίας.....  | 41 |
| III. Υλικά και Μέθοδοι .....  | 43 |
| III.1. Φυτικό υλικό και συνθήκες καλλιέργειας.....  | 43 |
| III.2. Εγκλιματισμός των φυτών σε διαφορετικά φωτεινά καθεστώτα.....  | 43 |
| III.3. Μελέτη συσσώρευσης ανθοκυανινών μετά από αλλαγή του φωτεινού καθεστώτος .....  | 43 |
| III.4. Ανάλυση φωτοσυνθετικών χρωστικών .....   | 44 |
| III.5. Μετρήσεις αδρών οπτικών ιδιοτήτων των φύλλων .....   | 45 |
| III.6. Πειράματα φθορισμομετρίας χλωροφύλλης .....  | 45 |
| III.6.1. Μετρήσεις στιγμιαίων παραμέτρων σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού.....   | 45 |
| III.6.2. Μετρήσεις καμπυλών επαγωγής και χαλάρωσης στο σκοτάδι .....  | 46 |
| III.6.2.1. Μετρήσεις θεμελιώδους φωτοχημικής ικανότητας του PS II .....   | 46 |
| III.6.2.2. Καταγραφή της καμπύλης βραδείας κινητικής επαγωγής φωτοσύνθεσης.....   | 46 |
| III.6.2.3. Καταγραφή της καμπύλης βραδείας κινητικής χαλάρωσης στο σκοτάδι σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες .....   | 46 |
| III.6.2.4. Ανάλυση της καμπύλης βραδείας κινητικής επαγωγής φωτοσύνθεσης και υπολογισμός παραμέτρων απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης στο φως.....  | 47 |
| III.6.2.5. Ανάλυση της καμπύλης βραδείας κινητικής χαλάρωσης και υπολογισμός παραμέτρων απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης. ....   | 49 |

|   |    |
|---|----|
| IV. Αποτελέσματα .....  | 51 |
| IV.1. Πείραμα με φυτά πεδίου .....  | 51 |
| IV.1.1. Μέτρηση φωτοχημικών παραμέτρων του PSII μέσω φθορισμού χλωροφύλλης σε πράσινες και ανθοκυανικές περιοχές του ελάσματος σε δύο διαφορετικές εντάσεις ακτινοβολίας. ....                              | 51 |
| IV.2. Πείραμα φυτών σε φυτοδοχεία υπό δύο διαφορετικά καθεστώτα.....  | 53 |
| IV.2.1. Μελέτη συσσώρευσης ανθοκυανινών σε πράσινα φύλλα μετά την έκθεσή τους στο πλήρες ηλιακό φως. ....   | 53 |
| IV.2.2. Μελέτη αδρών οπτικών ιδιοτήτων πράσινων και ανθοκυανικών φύλλων. ....   | 54 |
| IV.2.3. Μέτρηση φωτοχημικών παραμέτρων επαγωγής και χαλάρωσης φθορισμού χλωροφύλλης σε πράσινα και ανθοκυανικά φύλλα σε τέσσερις διαφορετικές εντάσεις και δύο διαφορετικές ποιότητες ακτινοβολίας. ....    | 56 |
| IV.2.4. Μέτρηση της σύστασης των χρωστικών και λειτουργίας του κύκλου των ξανθοφυλλών σε πράσινα και ανθοκυανικά φύλλα εγκλιματισμένα στο ήμισυ της πλήρους έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας σύστασης. .... | 60 |
| V. Συζήτηση.....  | 63 |
| VI. Βιβλιογραφία.....   | 67 |

## **Πρόλογος**

Η εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, ένα εξαιρετο εργαστηριακό περιβάλλον όπου αποκόμισα ιδιαίτερες γνώσεις, με την αμέριστη συνδρομή των καθηγητών και του λοιπού επιστημονικού προσωπικού.

Με αφορμή την ολοκλήρωση αυτής της εμπειρίας, θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω πρώτα απ' όλους τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γεώργιο Λιακόπουλο για την επίβλεψη και τη διόρθωση της εργασίας μου, αλλά κυρίως για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη που μου παρείχε σε όλα τα στάδια της μελέτης μου και σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπισα, καθώς και για το φιλικό περιβάλλον που δημιούργησε με αποτέλεσμα η κάθε μέρα στον εργαστηριακό χώρο να είναι ευχάριστη.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή και Διευθυντή του εργαστηρίου κ. Γεώργιο Καραμπουρνιώτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ένταξή μου στην ομάδα του εργαστηρίου, για την συμμετοχή του στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή και την προσεκτική διόρθωση της μελέτης μου και τέλος για την φιλική του συμπεριφορά.

Στο μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής, τη Λέκτορα κα. Στυλιανή Χωριανοπούλου θα ήθελα να εκφράσω την εκτίμηση και τις ευχαριστίες μου για τη συμμετοχή της στην επιτροπή καθώς και για την διόρθωση της εργασίας μου.

Το ίδιο έντονα θέλω να ευχαριστήσω τους υπόλοιπους συνεργάτες του εργαστηρίου για την απέραντη βοήθειά τους στην πραγματοποίηση των πειραματικών διαδικασιών, αλλά και για την πολύτιμη παρέα τους και αγάπη προς το πρόσωπό μου.

Κλείνοντας θέλω να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου για την αστείρευτη αγάπη και οικονομική υποστήριξη που μου παρείχαν.





## I. Εισαγωγή

### I.1. Γενικά στοιχεία

Η διατήρηση όλων των μορφών ζωής στον πλανήτη απαιτεί την αδιάκοπη ανακύκλωση ανόργανων στοιχείων και τη συνεχή ροή ενέργειας διαμέσου των τροφικών αλυσίδων. Η ενέργεια που χρησιμοποιείται από τους ζώντες οργανισμούς αποτελεί ένα είδος τροποποιημένης ηλιακής ενέργειας, η οποία δεσμεύεται από τα φωτοαυτότροφα είδη και αφομοιώνεται μέσω της φωτοσύνθεσης (Δροσόπουλος, 1998).

Φωτοσύνθεση είναι η διαδικασία μέσω της οποίας οι φωτοαυτότροφοι οργανισμοί συνθέτουν οργανικές ενώσεις υψηλού ενεργειακού περιεχομένου από ανόργανα συστατικά, εκμεταλλευόμενοι τη φωτεινή ακτινοβολία (Δροσόπουλος, 1998; Αϊβαλάκις, κ.ά., 2005). Απαραίτητη προϋπόθεση για τη διεξαγωγή της φωτοσύνθεσης είναι η παρουσία φωτός κατάλληλων μηκών κύματος, δηλαδή φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας (Photosynthetically Active Radiation, *PAR*), που περιλαμβάνει μήκη κύματος από 400 έως 700nm (Taiz και Zeiger, 2006). Η κύρια χημική αντίδραση της φωτοσύνθεσης συνοψίζεται ως εξής:



Συνεπώς, με τη συμμετοχή της ηλιακής ακτινοβολίας, δεσμεύεται το ατμοσφαιρικό διοξείδιο του άνθρακα ώστε ν' αναχθεί στο ενεργειακό επίπεδο των υδατανθράκων, ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιείται διάσπαση του νερού και εκλύεται μοριακό οξυγόνο. Πρόκειται για μία αντίδραση ισχυρά ενδεργονική, καθώς απαιτείται σημαντική δαπάνη ενέργειας για να σχηματιστεί ένα mol εξόζης (Αϊβαλάκις, κ.ά., 2005). Οι υδατάνθρακες που προκύπτουν διαθέτουν υψηλότερα ποσά ενέργειας από τα αρχικά υποστρώματα της αντίδρασης και χρησιμοποιούνται τόσο άμεσα από τους αυτότροφους οργανισμούς για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών τους, όσο και έμμεσα από τους υπόλοιπους οργανισμούς με την κατανάλωση των προηγούμενων (Δροσόπουλος, 1998).

Στα ανώτερα φυτά, η φωτοσύνθεση επιτελείται στους περισσότερο δραστήριους φωτοσυνθετικούς ιστούς, τα φύλλα και πιο ειδικά στο μεσόφυλλο, που διαθέτει τα πλέον εξειδικευμένα οργανίδια για την απορρόφηση του φωτός, τους χλωροπλάστες. Οι χλωροπλάστες είναι πλούσιοι σε χλωροφύλλες, πράσινες χρωστικές, ειδικές στην απορρόφηση της ηλιακής ακτινοβολίας, και σε αυτούς πραγματοποιείται το σύνολο των φωτοχημικών και βιοχημικών σταδίων της φωτοσύνθεσης (Δροσόπουλος, 1998).

Το σύνολο των αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης μπορεί να διακριθεί σε δύο φάσεις. Κατά την πρώτη φάση, διενεργούνται οι φωτεινές αντιδράσεις, για την πραγμάτωση των οποίων είναι απαραίτητη η παρουσία φωτός. Πραγματοποιούνται στις εσωτερικές μεμβράνες των χλωροπλάστων, τα θυλακοειδή, και περιλαμβάνουν την απορρόφηση του φωτός και τη

## Εισαγωγή

μετατροπή της ενέργειας της ηλιακής ακτινοβολίας σε χημική ενέργεια υπό τη μορφή υψηλού ενεργειακού περιεχομένου σταθερών χημικών ενώσεων, του NADPH και του ATP. Παράλληλα, φωτολύονται μόρια νερού παράγοντας ηλεκτρόνια και πρωτόνια αλλά και μοριακό οξυγόνο ως παραπροϊόν. Κατά τη δεύτερη φάση, τη βιοσυνθετική, η ενέργεια που έχει μετατραπεί προηγουμένως σε NADPH και ATP, χρησιμοποιείται για την αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα και για τη σύνθεση οργανικών ενώσεων. Οι βιοχημικές αυτές αντιδράσεις, διαδραματίζονται στο στρώμα των χλωροπλαστών και επειδή δεν απαιτούν άμεσα την παρουσία φωτός, συνολικά είναι γνωστές ως σκοτεινές αντιδράσεις. Η όλη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, διεξάγεται με τη μέγιστη απόδοση σε επίπεδο οργάνου, χάρη στα χαρακτηριστικά και τους φυσιολογικούς μηχανισμούς που διαθέτουν τα φύλλα (Αϊβαλάκης, κ.ά., 2005).

### ***1.1.1. Η απορρόφηση του φωτός από τους φωτοσυνθετικούς ιστούς – οπτικές ιδιότητες των φύλλων, φάσματα απορρόφησης, σκέδασης, περατότητας***

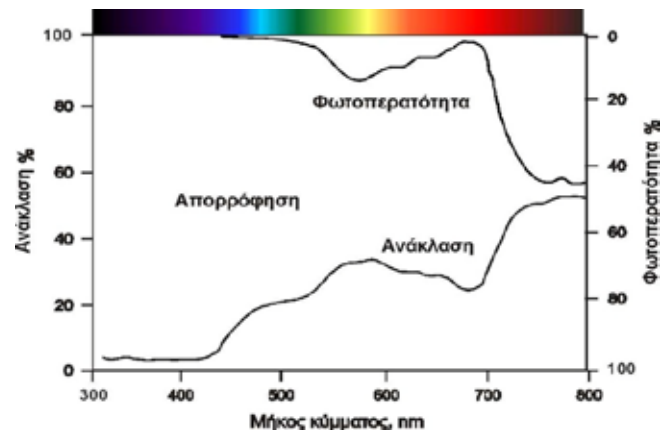
Οι φυτικοί ιστοί είναι πολύπλοκα, ανομοιογενή οπτικά συστήματα, οι ιδιότητες των οποίων εξαρτώνται από τα ανατομικά χαρακτηριστικά και την περιεκτικότητα σε χρωστικές διαφόρων ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων τους. Συγκεκριμένα, οι μοναδικές οπτικές ιδιότητες των φυλλικών ιστών σε συνδυασμό με τη συμπεριφορά του φωτός μέσα στο φύλλο, είναι σε σημαντικό βαθμό υπεύθυνες για την υψηλή αποτελεσματικότητα με την οποία τα φύλλα απορροφούν και χρησιμοποιούν την ηλιακή ενέργεια (Merzlyak *et al.*, 2008). Από τη συνολική ενέργεια που φτάνει στη Γη, μόνο το 5% θα μετατραπεί σε υδατάνθρακες, διότι μόνο ένα μικρό ποσοστό της αντιστοιχεί σε μήκη κύματος που είναι αξιοποιήσιμα από τα φυτά, από φωτοσυνθετική άποψη (400-700 nm, PAR), αλλά κι επειδή τμήμα της ακτινοβολίας χάνεται με τη μορφή θερμότητας ή φθορισμού μέσα στο φύλλο. Καθώς λοιπόν, το φως προσπίπτει στην επιφάνεια των φυτικών δομών, περίπου 80-90% απορροφάται από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό ανακλάται, σκεδάζεται ή διαπερνά τον ιστό (Taiz και Zeiger, 2006). Στην ανάκλαση συμβάλλει τόσο η επιδερμίδα και το ενδιάμεσο στρώμα αέρα (κατοπτρική ανάκλαση) όσο και το μεσόφυλλο μέσω ανάκλασης από κύτταρα, που βρίσκονται στα εσωτερικά στρώματα (διάχυτη ανάκλαση). Η ανακλαστικότητα της επιφάνειας ενός φύλλου, επίσης, μπορεί να επάγεται από δομικά χαρακτηριστικά, όπως το τρίχωμα και οι επιφανειακοί κηροί. Οι τρίχες μεταβάλλουν δραματικά τις ιδιότητες της επιφάνειας στην οποία προσπίπτει το φως και οι κηροί προκαλούν αύξηση της εξωτερικής επιφάνειας με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ανάκλαση και η σκέδαση στο ορατό φάσμα. Επιπροσθέτως, οι οπτικές ιδιότητες των φύλλων εξαρτώνται και από τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του φωτός, καθώς το προσπίπτον φως μπορεί να είναι είτε ευθύγραμμο, όπως το φως από την άμεση ηλιακή ακτινοβολία, είτε διάχυτο, όπως το φως που σκεδάζεται από τα σύννεφα ή από άλλα φυτά (Vogelmann, 1993).

Η αρχιτεκτονική κατασκευή των φύλλων στοχεύει στην όσο το δυνατόν αποτελεσματικότερη απορρόφηση της φωτεινής ακτινοβολίας, γι' αυτό και τα περισσότερα φύλλα είναι λεπτά, ώστε όλα τα φωτοσυνθετικά κύτταρα να δέχονται ικανή ένταση φωτεινής ακτινοβολίας (Αϊβαλάκης κ.α., 2005). Τα επιδερμικά κύτταρα είναι διαφανή στο ορατό φως και ελαφρώς κυρτά, δρώντας σαν φακοί εστίασης και μπορούν να εστιάσουν την φωτεινή ακτινοβολία σε τέτοιο βαθμό, ώστε η ένταση της ακτινοβολίας που φτάνει τοπικά στους χλωροπλάστες να είναι υψηλότερη της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στο έλασμα του φύλλου (Vogelmann *et al.*, 1996). Κάτω από την επιδερμίδα εντοπίζεται ο φωτοσυνθετικός ιστός που διακρίνεται τυπικά στο πασσαλώδες και σπογγώδες παρέγχυμα. Τα κύτταρα του πασσαλώδους παρεγχύματος (συνήθως μία έως τρεις στοιβάδες) έχουν κυλινδρικό σχήμα, πολυάριθμους χλωροπλάστες, είναι διευθετημένα με το μεγάλο τους άξονα κάθετο στην επιδερμίδα και εμφανίζουν μικρούς μεν, αλλά άφθονους μεταξύ τους μεσοκυττάριους χώρους. Η ύπαρξη αλληπάλληλων στοιβάδων του πασσαλώδους παρεγχύματος σε συνδυασμό με την μεγάλη απορροφητικότητα των κυττάρων αυτών έχουν ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της έντασης της ακτινοβολίας που φτάνει στις εσωτερικές στοιβάδες αλλά και στο σπογγώδες παρέγχυμα. Μια τέτοια αρχιτεκτονική γεννά το ερώτημα, του κατά πόσον είναι σκόπιμο για ένα φυτό να δαπανά ενέργεια για την ανάπτυξη επιπλέον κυτταρικών στοιβάδων, αφού φαίνεται πως λόγω φωτοπενίας δεν αξιοποιούνται κατά το βέλτιστο βαθμό για την αύξηση του φωτοσυνθετικού έργου σε επίπεδο φύλλου. Ωστόσο, η κατανομή της χλωροφύλλης στις διάφορες στοιβάδες δεν είναι ομοιόμορφη με αποτέλεσμα την ύπαρξη περιοχών οι οποίες δεν απορροφούν ισχυρά και περιοχών (όπου εντοπίζονται οι χλωροπλάστες) στις οποίες η απορρόφηση είναι ισχυρή λόγω υψηλής συγκέντρωσης χλωροφυλλών. Η ανισοκατανομή αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της απορροφητικότητας του φύλλου (ειδικά για φασματικές περιοχές οι οποίες εμφανίζουν έντονη απορρόφηση) συγκριτικά με την απορρόφηση όμοιας συγκέντρωσης ομοιογενούς διαλύματος. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται φαινόμενο φίλτρου (sieve effect) και προφανώς έχει ως αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό των εσωτερικών στρωμάτων του φωτοσυνθετικού παρεγχύματος με φως (Terashima *et al.*, 2009). Στο σημείο αυτό πρέπει να επισημανθεί πως το φαινόμενο φίλτρου είναι πολύ ασθενέστερο στην περίπτωση των ανθοκυανινών των επιδερμικών ή φωτοσυνθετικών κυττάρων καθώς η κατανομή τους είναι περισσότερο ομοιόμορφη στα κύτταρα καθώς περιέχονται στα ευμεγέθη χυμοτόπια των παρεγχυματικών κυττάρων. Το προσπίπτον φως, επίσης, μπορεί να διαδοθεί στο εσωτερικό του μεσοφύλλου διαμέσου των κεντρικών χυμοτοπιών και των αέριων μεσοκυττάριων χώρων του πασσαλώδους παρεγχύματος. Επομένως, λόγω των παραπάνω φαινομένων, περισσότερο φως από αυτό που αναμένεται καταφέρνει να φτάνει στο εσωτερικό του φύλλου, χάρη στις ιδιαίτερες οπτικές ιδιότητες του πασσαλώδους παρεγχύματος (Taiz και Zeiger, 2006). Το σπογγώδες παρέγχυμα, απαρτίζεται από κύτταρα ακανόνιστου σχήματος και μεγάλους μεσοκυττάριους χώρους. Οι μεγάλοι μεσοκυττάριοι χώροι αυξάνουν τις επιφάνειες ανάκλασης, σκέδασης και διάθλασης του

## Εισαγωγή

φωτός, με αποτέλεσμα το φως να διαδίδεται μέσω πολλαπλών διαδρομών στο εσωτερικό του παρεγχύματος και μέρος αυτού να επιστρέφει στο πασσαλώδες παρέγχυμα, γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα απορρόφησής του και ομογενοποιεί το φωτεινό μικροπεριβάλλον στο εσωτερικό του φύλλου (Vogelmann *et al.*, 1996). Επίσης, το πασσαλώδες παρέγχυμα φαίνεται ότι προκαλεί μικρότερη σκέδαση της φωτεινής ακτινοβολίας συγκριτικά με το σπογγώδες παρέγχυμα. Σε μελέτες όπου εξετάστηκε η διείσδυση ευθύγραμμης και διάχυτης φωτεινής ακτινοβολίας σε φύλλα με ή χωρίς πασσαλώδες παρέγχυμα, βρέθηκε ότι το ευθύγραμμο φως διεισδύει βαθύτερα στα φύλλα που διαθέτουν πασσαλώδη κύτταρα σε σχέση με αυτά που δεν διαθέτουν. Αντίθετα, το πρότυπο διείσδυσης για το διάχυτο φως ήταν το ίδιο και για τα δύο είδη φύλλων. Η ιδιότητα αυτή είναι σημαντική για μεγάλου πάχους φύλλα που εκτίθενται σε άμεσο ηλιακό φως, καθώς η ισχυρή διείσδυση του φωτός στα κατώτερα στρώματα συμβάλλει στην ομοιομορφία του φωτεινού μικροπεριβάλλοντος (Vogelmann, 1993).

Σε ένα τυπικό φύλλο, το ποσοστό της ακτινοβολίας που διέρχεται ή ανακλάται δεν είναι ίδιο ως ποσοστό σε όλες τις φασματικές περιοχές της φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας, προφανώς λόγω της παρουσίας των χλωροφυλλών, κατά κύριο λόγο, αλλά και των υπόλοιπων χρωστικών, κυρίως των καροτενοειδών (Manetas, 2006). Το διερχόμενο και ανακλώμενο φως είναι συγκριτικά περισσότερο στην πράσινη περιοχή μεταξύ 500 και 600 nm, γεγονός στο οποίο οφείλεται και το πράσινο χρώμα των φωτοσυνθετικών ιστών (*εικόνα 1*). Σε γενικές γραμμές, οι χλωροφύλλες απορροφούν μέγιστα κυρίως στην ερυθρή περιοχή του ορατού φάσματος και σε μικρότερο βαθμό στην κυανή, με αποτέλεσμα η ανακλαστικότητα στα συγκεκριμένα μήκη κύματος να είναι μικρή λόγω της ισχυρής απορρόφησής τους. Αντίθετα, τα καροτενοειδή και τα φλαβονοειδή (κυρίως οι ανθοκυανίνες) απορροφούν σε μικρότερα μήκη κύματος, και συγκεκριμένα στην κυανή και πράσινη περιοχή του φάσματος (Merzlyak *et al.*, 2008). Με βάση τα παραπάνω, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η ηλιακή ακτινοβολία που αντιστοιχεί στην ερυθρή και κυανή περιοχή του φάσματος απορροφάται ισχυρά από τους χλωροπλάστες της προσαξονικής επιδερμίδας, ενώ τα φωτόνια της πράσινης φασματικής περιοχής διεισδύουν σε μεγάλο ποσοστό στο εσωτερικό του φύλλου και απορροφώνται από τις χρωστικές των χλωροπλάστων των κυττάρων που βρίσκονται πλησιέστερα προς την αποαξονική πλευρά του ελάσματος, διευκολύνοντας έτσι την αφομοίωση του CO<sub>2</sub> και στα κατώτερα στρώματα του φύλλου (Sun *et al.*, 1998; Terashima *et al.*, 2009).



Εικόνα 1. Φάσματα απορρόφησης, ανάκλασης και περατότητας ενός τυπικού πράσινου φύλλου.

## 1.2. Οργάνωση και λειτουργία των χλωροπλαστών

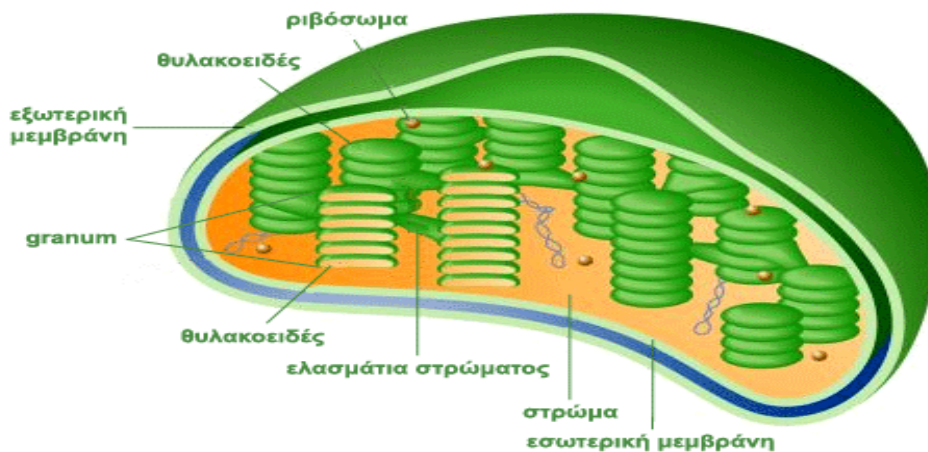
### 1.2.1. Λεπτή δομή και βιοχημικοί παράγοντες των χλωροπλαστών

Τα φωτοσυνθετικά κύτταρα των ανώτερων φυτών είναι πλούσια σε υποκυτταρικά οργανίδια, που καλούνται χλωροπλάστες (εικόνα 2). Αυτά τα δισκοειδή πλαστίδια, διαμέτρου 3-10 μm, προέρχονται από μικρές και άχρωμες πρόδρομες μορφές, τα προπλαστίδια. Σε ένα τυπικό φωτοσυνθετικό κύτταρο του μεσόφυλλου, είναι δυνατό να περιέχονται 20-60 χλωροπλάστες, καταλαμβάνοντας έτσι περίπου το 8% του συνολικού κυτταρικού όγκου. Κάθε χλωροπλάστης περιβάλλεται από ένα συμπαγές σύστημα μίας διπλής εξωτερικής μεμβράνης, το φάκελο, που ελέγχει τη διακίνηση ουσιών από το χλωροπλάστη στο κυτταρόπλασμα και αντίστροφα (Δροσόπουλος, 1998; Αιβαλάκις, κ.ά., 2005). Στο εσωτερικό του φακέλου περικλείεται το στρώμα, ένα άμορφο ζελατινώδες υλικό, που φιλοξενεί τα ένζυμα που απαιτούνται για τη μετατροπή του διοξειδίου του άνθρακα σε υδατάνθρακες, κατά τη διάρκεια των σκοτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης. Στο στρώμα, επίσης, αναπτύσσεται ένα εκτεταμένο δίκτυο ελασματοειδών μεμβρανών, τα θυλακοειδή, τα οποία κατά τόπους διατάσσονται σε πυκνούς σωρούς, σχηματίζοντας τα θυλακοειδή των grana. Κάθε μοναδιαίο στοιχείο αυτών των σχηματισμών καλείται granum, ενώ μεταξύ των δύο μεμβρανών κάθε θυλακοειδούς υπάρχει μία κοιλότητα που ονομάζεται μικροχώρος, και περιέχει νερό και διαλυμένα άλατα που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φωτοσύνθεση και ιδιαίτερα στη σύνθεση του ATP (Δροσόπουλος, 1998). Στα θυλακοειδή λαμβάνουν χώρα οι φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης, καθώς εκεί εντοπίζονται όλα τα μόρια της χλωροφύλλης και των λοιπών φωτοσυνθετικών χρωστικών (Αιβαλάκις, κ.α., 2005). Οι χλωροπλάστες διαθέτουν δικό τους DNA, RNA και ριβοσώματα, οπότε μπορούν να συνθέσουν αυτόνομα ένα ποσοστό από τις πρωτεΐνες τους (Taiz και Zeiger, 2006; Αιβαλάκις, κ.ά., 2005).

Στους χλωροπλάστες, και συγκεκριμένα στη διπλοστοιβάδα των λιπιδίων των θυλακοειδών, βρίσκονται βυθισμένα λιπόφιλα μόρια χρωστικών που σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες, οδηγώντας έτσι στη δημιουργία των φωτοσυστημάτων I και II. Οι πρωτεΐνες

## Εισαγωγή

καταλύουν τις ενζυμικές αντιδράσεις και προσδίδουν μηχανική αντοχή στις μεμβράνες (Δροσόπουλος, 1998). Τα μόρια των χρωστικών αποκαλούνται φωτοσυνθετικές χρωστικές καθώς διαδραματίζουν αποφασιστικό ρόλο στην επιτέλεση της φωτοσυνθετικής διαδικασίας, είτε απορροφώντας φωτόνια, είτε προστατεύοντας τη φωτοσυνθετική συσκευή. Ανάλογα με τη δομή και το ρόλο τους, οι φωτοσυνθετικές χρωστικές των ανώτερων φυτών διακρίνονται σε χλωροφύλλες (κύριες ή βοηθητικές) και σε καροτενοειδή (βοηθητικές ή φωτοπροστατευτικές χρωστικές).

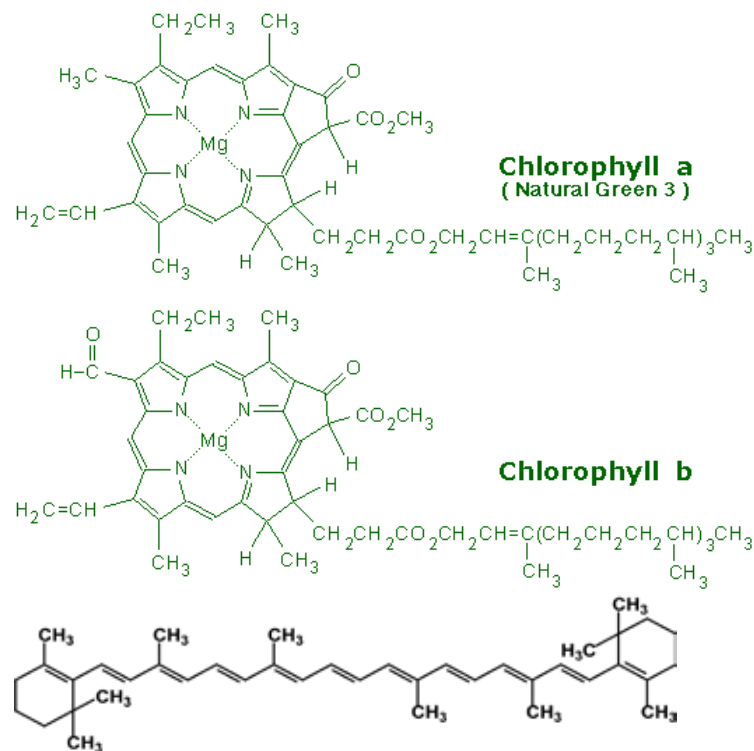


Εικόνα 2. Τρισδιάστατη απεικόνιση χλωροπλάστη. Διακρίνεται το σύστημα των διπλών μεμβρανών και των μεμβρανικών διατάξεων των θυλακοειδών του στρώματος και των grana.

Οι χλωροφύλλες είναι οι χρωστικές που προσδίδουν στους χλωροπλάστες και τελικώς στα φύλλα, το χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα. Το μόριό τους αποτελείται από ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο τμήμα. Το υδρόφιλο τμήμα απαρτίζεται από έναν πορφυρινικό δακτύλιο, που είναι προϊόν της συνένωσης τεσσάρων πυρολικών δακτυλίων με δεσμούς άνθρακα-άνθρακα. Μεταξύ των πυρολικών δακτυλίων III και IV παρεμβάλλεται ένας πέμπτος δακτύλιος κυκλοπεντανόνης και στο κέντρο του πορφυρινικού δακτυλίου βρίσκεται ένα ιόν μαγνησίου, που σχηματίζει ιοντικούς δεσμούς με τα άζωτα των πυρολικών δακτυλίων που τον απαρτίζουν. Σε περίπτωση απόσπασης του ατόμου του μαγνησίου από τον πορφυρινικό δακτύλιο, προκύπτει το μόριο της φαιοφυτίνης, που είναι συστατικό της φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Ο πορφυρινικός δακτύλιος αποτελεί τη χρωμοφόρο ομάδα του μορίου της χλωροφύλλης, δηλαδή είναι υπεύθυνος για την απορρόφηση των φωτονίων. Το υδρόφοβο τμήμα του μορίου της χλωροφύλλης είναι η φυτόλη, που θεωρείται η "ουρά" του μορίου και συνδέεται με τον πορφυρινικό δακτύλιο μέσω του IV πυρολικού δακτυλίου. Καθώς τα μόρια των χλωροφυλλών παρεμβάλλονται μεταξύ των πρωτεϊνών και των λιπιδίων στη μεμβράνη του χλωροπλάστη, το υδρόφιλο μέρος συνδέεται με τις πρωτεΐνες, ενώ το υδρόφοβο εκτείνεται μέσα στο στρώμα των λιπιδίων (Δροσόπουλος, 1998). Στους χλωροπλάστες των ανώτερων φυτών παρατηρούνται δύο είδη χλωροφυλλών, η χλωροφύλλη a και η χλωροφύλλη b, που διαφέρουν ως προς τον υποκαταστάτη του πυρολικού δακτυλίου

II (εικόνα 3,α). Τα φάσματα απορρόφησης των χλωροφυλλών παρουσιάζουν μέγιστα στην κυανή και ερυθρή περιοχή του ορατού φάσματος (Αιβαλάκης, κ.ά., 2005).

Τα καροτενοειδή είναι κίτρινες ή πορτοκαλόχρωμες χρωστικές κι απαντώνται σε όλα τα φωτοσυνθετικά κύτταρα. Χαρακτηρίζονται δομικά ως τετρατερπένια και το μόριό τους αποτελείται από μία ευθύγραμμη αλυσίδα (C<sub>40</sub>) που εμφανίζει εναλλαγή απλών και διπλών δεσμών (εικόνα 3,β). Διακρίνονται είτε σε υδρογονάνθρακες (καροτένια) είτε σε οξυγονωμένα παράγωγα αυτών (ξανθοφύλλες). Τα καροτενοειδή βρίσκονται πολύ κοντά στις χλωροφύλλες πάνω στις μεμβράνες των χλωροπλαστών κι έχει βρεθεί πως απορροφούν σε χαμηλότερα μήκη κύματος, δηλαδή φωτόνια υψηλότερης ενέργειας σε σχέση με τη χλωροφύλλη α. Με τον τρόπο αυτό, αυξάνουν το εύρος του ηλιακού φάσματος που είναι διαθέσιμο για φωτοσύνθεση και επιπλέον, προστατεύουν τις πράσινες χρωστικές από τον κίνδυνο φωτοοξειδωσης σε περίσσεια φωτός (Μανέτας, 2005). Βασικοί εκπρόσωποι της ομάδας των καροτενοειδών είναι το α- και β-καροτένιο, η λουτεΐνη, η βιολαξανθίνη κ.ά.



Εικόνα 3. Συντακτικός τύπος των δύο παραλλαγών του μορίου της χλωροφύλλης των ανώτερων φυτών και ενός τυπικού καροτενοειδούς.

Στις μεμβράνες των χλωροπλαστών των ανώτερων φυτών, υπάρχουν επίσης και άλλες πρωτεΐνες, κινόνες και ιόντα. Οι πλαστοκινόνες, για παράδειγμα, είναι τα αφθονότερα ενδιάμεσα μόρια μεταφοράς ηλεκτρονίων των χλωροπλαστών. Στις μεμβράνες των θυλακοειδών εντοπίζεται και το σύμπλοκο του κυτοχρώματος b<sub>6</sub>f, που θεωρείται ο σημαντικότερος ενδιάμεσος φορέας για τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το φωτοσύστημα I στο II. Τέλος, στο στρώμα των χλωροπλαστών απαντούν DNA, RNA, ριβοσώματα και ένζυμα (Δροσόπουλος, 1998).

## Εισαγωγή

### *1.2.2. Οργάνωση των φωτοσυστημάτων στις χλωροπλαστικές μεμβράνες*

Για να ολοκληρωθούν οι φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης και να μετατραπεί το τμήμα της ηλιακής ακτινοβολίας που απορροφήθηκε από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές σε χημική ενέργεια, απαιτείται η συνεργασία δύο φωτοσυστημάτων, του φωτοσυστήματος I (PS I) και του φωτοσυστήματος II (PS II). Πρόκειται για μεγαλομοριακά σύμπλοκα πρωτεϊνών με κύριες και βοηθητικές χρωστικές, τα οποία εντοπίζονται στις μεμβράνες των θυλακοειδών και λειτουργούν σε σειρά, με το PS II να προηγείται του PS I στη φωτοχημική αλυσίδα ροής των ηλεκτρονίων. Συνεπώς έχουν διαφορετικούς ρόλους παρά το γεγονός ότι δρουν συνεργιστικά. Κάθε φωτοσύστημα διαθέτει ένα φωτοχημικό κέντρο αντίδρασης, δηλαδή ένα διαμεμβρανικό σύμπλοκο πρωτεϊνών, όπου συμβαίνει ο διαχωρισμός φορτίου, στο οποίο μάλιστα εδράζεται ένα μόριο χλωροφύλλης *a* που εμφανίζει χαρακτηριστικό μέγιστο απορρόφησης της ακτινοβολίας. Το κέντρο αντίδρασης του PS I ονομάζεται P700 λόγω του μέγιστου απορρόφησης της Chl *a* στα 700nm, ενώ του PS II ονομάζεται αντίστοιχα P680. Κάθε κέντρο αντίδρασης περιλαμβάνει μία αντένα φωτοσυλλογής ή φωτοσυλλεκτική κεραία (Αϊβαλάκις, κ.ά., 2005). Οι φωτοσυλλεκτικές αντένες περιέχουν, εκτός της χλωροφύλλης *a*, και δύο άλλους τύπους φωτοσυνθετικών χρωστικών, τη χλωροφύλλη *b* και τα καροτενοειδή, λειτουργώντας έτσι ως χοάνες που κατευθύνουν την ενέργεια των απορροφούμενων φωτονίων στο κέντρο αντίδρασης. Οι χρωστικές αυτές σχηματίζουν σύμπλοκα με δομικές πρωτεΐνες των φωτοσυλλεκτικών κεραιών, δίνοντας γένεση στα φωτοσυλλεκτικά σύμπλοκα LHCI και LHCII, που συνδέονται με τα PS I και PS II αντίστοιχα, και αποτελούν υπερ-αντένες που ρυθμίζουν την είσοδο της ενέργειας στα φωτοσυστήματα (Μανέτας, 2005).

Το κέντρο αντίδρασης του PS II μαζί με τις χλωροφύλλες της φωτοσυνθετικής κεραίας και τις συζευγμένες πρωτεΐνες μεταφοράς ηλεκτρονίων συναντώνται κατά κύριο λόγο στα θυλακοειδή των grana, ενώ οι αντίστοιχες δομές του PS I, καθώς και το ένζυμο ATP-συνθετάση που καταλύει τη μετατροπή του ADP προς ATP, εδράζονται σχεδόν αποκλειστικά στα θυλακοειδή του στρώματος και στις παρυφές των θυλακοειδών των grana. Το κυτοχρωμικό σύμπλοκο *b<sub>6</sub>f*, που συνδέει τα δύο φωτοσυστήματα, είναι ομοιογενώς καταναμημένο σε όλα τα θυλακοειδή, χωρίζοντας έτσι σε αρκετή απόσταση τα PS I και PS II. Αυτός ο διαχωρισμός έχει ως αποτέλεσμα, ένας ή περισσότεροι φορείς ηλεκτρονίων που λειτουργούν ως συζεύκτες μεταξύ των δύο φωτοσυστημάτων, να διαχέονται από την περιοχή των grana στην περιοχή του στρώματος, όπου τα ηλεκτρόνια παραδίδονται στο φωτοσύστημα. Αυτοί οι φορείς ηλεκτρονίων είναι η πλαστοκυανίνη (PC) και η πλαστοκινόννη (PQ). Το ίδιο θα πρέπει να συμβεί και με τα πρωτόνια που παράγονται κατά την οξειδωση του νερού στο PS II, δηλαδή να διαχέονται στην περιοχή του στρώματος, όπου συντίθεται το ATP (Taiz και Zeiger, 2006).

Ο λειτουργικός ρόλος της μεγάλης απόστασης ανάμεσα στα δύο φωτοσυστήματα δεν έχει αποσαφηνιστεί εντελώς. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι εξυπηρετεί τη ρύθμιση και την εξισορρόπηση της εισροής φωτεινής ενέργειας, ώστε κάθε φωτοσύστημα να δέχεται τον ίδιο

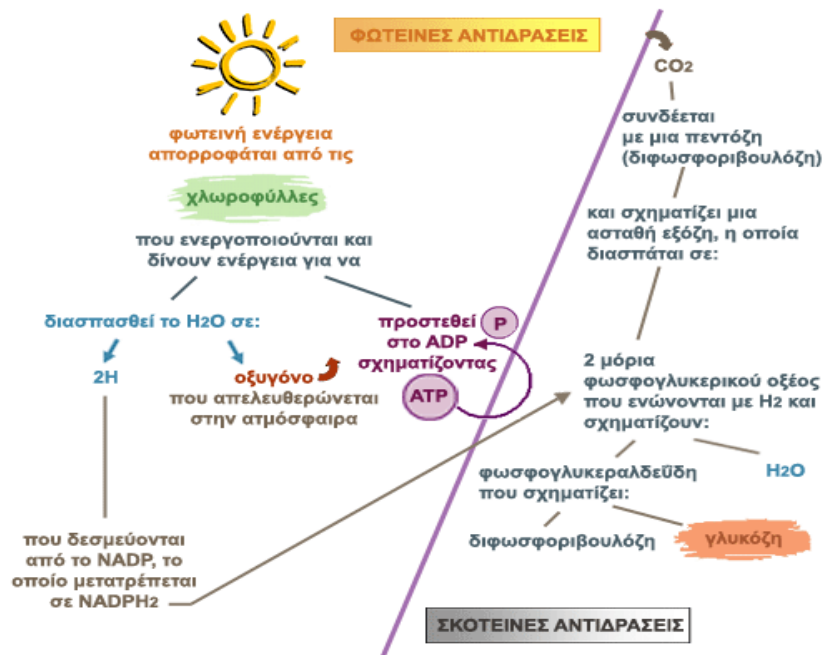


αριθμό φωτονίων κατά τη μη κυκλική ροή ηλεκτρονίων. Σε περίπτωση που η εισροή ενέργειας δεν είναι εξισορροπημένη, τίθεται κίνδυνος καταστροφής της φωτοσυνθετικής συσκευής. Μία άλλη εξήγηση, είναι ότι αυτός ο διαχωρισμός διευκολύνει την κυκλική ροή ηλεκτρονίων, κατά τη διάρκεια της οποίας παράγεται μόνο ATP (Μανέτας, 2005). Επιπροσθέτως, ο χωρικός διαχωρισμός των δύο φωτοσυστημάτων υποδηλώνει πως δεν απαιτείται μία αυστηρή στοιχειομετρία ένα προς ένα μεταξύ τους, αλλά με βάση ορισμένες μετρήσεις, φαίνεται ότι υπάρχει περίσσεια του PS II στους χλωροπλάστες. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η αναλογία του PS II προς το PS I είναι περίπου 1.5 : 1, ωστόσο, όταν τα φυτά αναπτύσσονται υπό διαφορετικές συνθήκες φωτός, είναι δυνατό ο παραπάνω λόγος να αλλάξει (Δροσόπουλος, 1998).

### 1.3. Φωτοσυνθετική λειτουργία

#### 1.3.1. Οι φωτεινές αντιδράσεις

Οι φωτεινές αντιδράσεις αποτελούν το ένα από τα δύο στάδια της φωτοσύνθεσης και λαμβάνουν χώρα στις μεμβράνες των θυλακοειδών, με απαραίτητη προϋπόθεση την ύπαρξη φωτός. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, πραγματοποιούνται σημαντικά γεγονότα, που στοχεύουν στη συλλογή της φωτονιακής ενέργειας και τη μετατροπή της σε χημική.



Εικόνα 4. Οι φωτεινές και οι σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης.

Συνοπτικά λοιπόν, μόρια χλωροφύλλης, δεσμεύουν φωτεινή ενέργεια και διεγείρονται, καθώς κάποια από τα ηλεκτρόνιά τους αλλάζουν στιβάδα, την οποία χρησιμοποιούν για την προώθηση της φωτοχημικής ροής ηλεκτρονίων μέσω μιας σειράς οξειδοαναγωγικών ζευγών. Στη συνέχεια αποδιεγείρονται και η ενέργεια που αποδίδεται κατά την αποδιέγερσή τους προκαλεί τον ιονισμό άλλων μορίων χλωροφύλλης. Μέρος της ενέργειας που παράγεται από

## Εισαγωγή

τις διαδικασίες αυτές, προκαλεί τη διάσπαση μορίων νερού σε υδρογόνο και οξυγόνο, μία διαδικασία που ονομάζεται φωτόλυση. Παράλληλα δημιουργείται μία διαφορά ηλεκτροχημικού δυναμικού πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης των θυλακοειδών, η απόσβεση της οποίας παρέχει την απαιτούμενη ενέργεια για το σχηματισμό ATP από ADP. Το οξυγόνο που παράγεται από τη φωτόλυση του νερού ελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα, ενώ το υδρογόνο δεσμεύεται από μόρια του συνενζύμου NADP, τα οποία μετατρέπονται σε NADPH. Το ATP και το NADPH, που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια των φωτεινών αντιδράσεων, απελευθερώνονται στο στρώμα των χλωροπλαστών, ώστε να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση των υδατανθράκων, κατά τη διενέργεια των σκοτεινών αντιδράσεων (εικόνα 4).

### 1.3.1.1. Φωτοσυλλογή

Η εκκίνηση των φωτεινών αντιδράσεων πραγματοποιείται με τη συλλογή του φωτός, η οποία με τη σειρά της απαιτεί την ύπαρξη ενός φωτοσυλλεκτικού μηχανισμού, που απαρτίζεται από πολυάριθμα σύμπλοκα πρωτεϊνών με φωτοσυνθετικές χρωστικές, κύριες και βοηθητικές (χλωροφύλλες a και b και καροτενοειδή), που είναι γνωστά ως σύμπλοκα φωτοσυλλογής. Ο φωτοσυλλεκτικός μηχανισμός βρίσκεται σε στενή σύνδεση με τα φωτοχημικά κέντρα των φωτοσυστημάτων PS I και PS II. Τα μόρια των φωτοσυνθετικών χρωστικών, κατά κύριο λόγο, λειτουργούν ως μία κεραία συλλογής φωτεινής ενέργειας (Taiz και Zeiger, 2006).

Το σύνολο των φωτοχημικών αντιδράσεων προκαλείται από τα διεγερμένα μόρια των φωτοσυνθετικών χρωστικών (Δροσόπουλος, 1998). Μάλιστα, οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή απορροφούν φωτόνια, διεγείρονται και μεταφέρουν τη διέγερση προς τα κέντρα αντίδρασης. Πιο ειδικά, κατά την απορρόφηση φωτονίων κατάλληλου μήκους κύματος, τα μόρια των φωτοσυνθετικών χρωστικών διεγείρονται λόγω ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων και μεταπίπτουν σε μία κατάσταση υψηλότερου ενεργειακού περιεχομένου. Η διαφορά ενέργειας μεταξύ των δύο ενεργειακών σταθμών αντικατοπτρίζει την ενέργεια του απορροφούμενου φωτονίου (Δροσόπουλος, 1998). Ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις μπορούν να συμβούν σε περισσότερες από μία ενεργειακές στάθμες, γι' αυτό και το μόριο της χλωροφύλλης μπορεί να απορροφά φωτόνια σε δύο φασματικές περιοχές, στην ερυθρή και στην κυανή, κάτι που δικαιολογεί την εμφάνιση δύο μεγίστων στα φάσματα απορρόφησής τους (Αϊβαλάκης, κ.ά., 2005). Η ενέργεια διέγερσης μεταφέρεται μέσω ενός μηχανισμού που καλείται κατά "Forster μεταφορά ενέργειας συντονισμού" από μόριο σε μόριο μέχρι να καταλήξει στο κέντρο αντίδρασης και είναι πολύ πιθανό να μεσολαβήσει ένας μεγάλος αριθμός μεταφορών διέγερσης από μόριο σε μόριο. Η μεταφορά της ενέργειας δεν ακολουθεί τυχαία διαδρομή, αλλά μεταφέρεται προς μόρια χλωροφύλλης που έχουν φάσματα απορρόφησης ίσου ή μεγαλύτερου μήκους κύματος (Κατινάκης, 2004).

Για να είναι, επομένως, η φωτοσυλλογή επιτυχής θα πρέπει να εξασφαλιστεί η μεταφορά της διέγερσης από τα μόρια των χρωστικών αποκλειστικά προς τα κέντρα αντίδρασης. Αυτό

επιτυγχάνεται με μία στρατηγική δύο παραμέτρων. Αρχικά, οι φωτοσυνθετικές χρωστικές είναι κατάλληλα τοποθετημένες, με βάση τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά διέγερσής τους, δίνοντας τη δυνατότητα απορρόφησης ακόμα και των φωτονίων που δεν απορροφώνται αποδοτικά από τα μόρια της χλωροφύλλης *a* των φωτοχημικών κέντρων αντίδρασης. Συγκεκριμένα, οι χρωστικές είναι τοποθετημένες με την εξής ακολουθία: καροτενοειδή, χλωροφύλλη *b*, χλωροφύλλη *a* και κέντρο αντίδρασης (Αϊβαλάκις, κ.ά., 2005). Η δεύτερη παράμετρος αφορά στις θερμικές απώλειες κατά τη μεταφορά της διέγερσης. Έχει διαπιστωθεί πως κατά τη μεταφορά της διέγερσης από μόριο σε μόριο χρωστικής, ένα ποσοστό της ενέργειας (περίπου 10%) χάνεται υπό τη μορφή θερμότητας (Αϊβαλάκις, κ.ά., 2005). Η ύπαρξη αυτών των ενεργειακών απωλειών σε κάθε βήμα μεταφοράς της διέγερσης προκαλεί ελάττωση της ενέργειας και αποτρέπει έτσι τη ροή της προς την αντίθετη κατεύθυνση, διότι θα έπρεπε να ανατροφοδοτηθεί ο μηχανισμός με τη θερμότητα που χάθηκε, κάτι που είναι αδύνατο από τη στιγμή που η κατεύθυνση θα ήταν από μία χρωστική χαμηλότερης ενέργειας προς μία χρωστική υψηλότερης ενέργειας. Στην ουσία, το σύστημα θυσιάζει κάποια ενέργεια από κάθε κβάντο φωτός έτσι ώστε σχεδόν όλα τα κβάντα να παγιδευτούν από το κέντρο της αντίδρασης. Αυτό το αποτέλεσμα παρέχει στην ενεργοβόρα διαδικασία παγίδευσης φωτονίων ένα βαθμό κατευθυντικότητας ή μη αναστρεψιμότητας, που κάνει την παράδοση της διέγερσης στο κέντρο αντίδρασης πιο αποτελεσματική (Taiz και Zeiger, 2006).

### **1.3.1.2. Φωτοχημική ροή ηλεκτρονίων και παραγωγή χημικής ενέργειας**

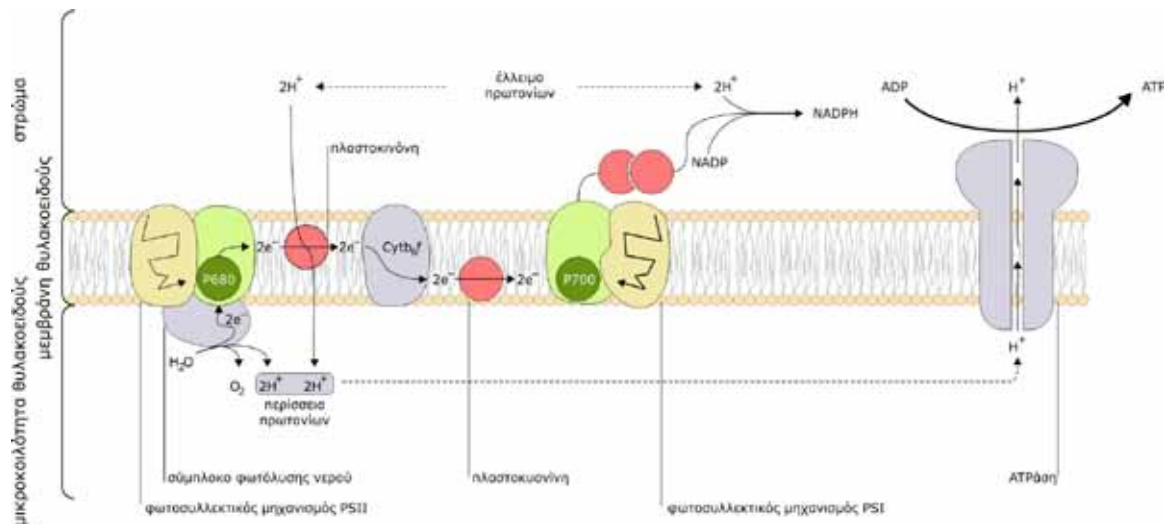
Μετά τη συλλογή της ηλιακής ενέργειας, λαμβάνουν χώρα οι διαδικασίες χρησιμοποίησης της για την παραγωγή χημικής ενέργειας, με κύριο στόχο την απομάκρυνση ηλεκτρονίων από το νερό, που οδηγεί στην παραγωγή NADPH και τη δημιουργία μίας βαθμιδωτής πρωτονίων, που καταλήγει στην σύνθεση του ATP. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιούνται από τέσσερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα: το φωτοσύστημα II (PS II), το σύμπλοκο κυτοχρώματος  $b_6f$ , το φωτοσύστημα I (PS I) και την ATP-συνθετάση. Οι θέσεις και ο προσανατολισμός τους είναι αυστηρά καθορισμένες πάνω στις μεμβράνες των θυλακοειδών, έτσι ώστε το νερό να οξειδώνεται σε  $O_2$  στην εσωτερική κοιλότητα του θυλακοειδούς (lumen), το  $NADP^+$  να ανάγεται σε NADPH στην πλευρά της μεμβράνης προς το στρώμα και το ATP να ελευθερώνεται στο στρώμα, ενώ τα πρωτόνια κινούνται απ' την εσωτερική κοιλότητα προς το στρώμα (Taiz και Zeiger, 2006) (εικόνα 5). Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το PS II μέσω αλληπάλληλων οξειδώσεων και αναγωγών προς το ενεργό κέντρο του PS I, με σημαντικότερο ενδιάμεσο φορέα το σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων  $b_6f$  (Αϊβαλάκις, κ.ά., 2005).

Όταν ένα φωτόνιο απορροφάται από τα φωτοσυλλεκτικά σύμπλοκα, η ενέργειά του οδηγείται μέσω των μορίων χλωροφύλλης του PS I ή του PS II στα αντίστοιχα φωτοχημικά κέντρα αντίδρασης P700 ή P680. Πιο ειδικά, η ροή ηλεκτρονίων ξεκινά με την άφιξη της ενέργειας διέγερσης στο μόριο P680 της χλωροφύλλης του κέντρου αντίδρασης του PS II, η οποία διεγείρεται σε υψηλότερη ενεργειακή στάθμη ( $P^*680$ ) λόγω της προώθησης ενός

## Εισαγωγή

ηλεκτρονίου από ένα συμπληρωμένο τροχιακό ελάχιστης ενέργειας σ' ένα ασυμπλήρωτο τροχιακό υψηλότερης ενέργειας. Το ηλεκτρόνιο στο ανώτερο τροχιακό είναι χαλαρά συνδεδεμένο με τη χλωροφύλλη και εύκολα μπορεί ν' αποσπαστεί αν βρεθεί κοντά του ένα μόριο-δέκτης ηλεκτρονίων (Δροσόπουλος, 1998). Αυτή η διαδικασία συνίσταται στο λεγόμενο διαχωρισμό φορτίου, οπότε και ένα ηλεκτρόνιο μεταφέρεται από την P\*680 στη φαιοφυτίνη (Phe), με αποτέλεσμα η P\*680 να οξειδώνεται και η Phe να ανάγεται. Εν συνεχεία, το ηλεκτρόνιο μεταβιβάζεται από τη Phe σ' έναν ευκίνητο λιποδιαλυτό φορέα, την πλαστοκινόνη (PQ), που συνδέεται προσωρινά με την πρωτεΐνη D1 του κέντρου αντίδρασης και τελικά ανάγεται σε πλαστοκινόλη (PQH<sub>2</sub>). Η τελευταία απελευθερώνεται από το κέντρο αντίδρασης και μετακινείται προς το θυλακοειδές του στρώματος, δίνοντας τα ηλεκτρόνιά της στο σύμπλοκο κυτοχρωμάτων b<sub>6</sub>f. Από εκεί τα ηλεκτρόνια περνούν σε μία χαλκοπρωτεΐνη, την πλαστοκυανίνη (PC), που διαχέεται ελεύθερα προς τον ελεύθερο χώρο του θυλακοειδούς (Δροσόπουλος, 1998).

Το PS II στην οξειδωμένη του κατάσταση είναι ισχυρά αναγωγικό, προκαλώντας οξείδωση του νερού και παράγοντας πρωτόνια, ηλεκτρόνια και οξυγόνο (Αϊβαλάκις, κ.ά., 2005). Η διάσπαση των μορίων του νερού ονομάζεται φωτόλυση του νερού και καταλύεται από το σύμπλοκο φωτόλυσης του νερού, ένα μικρό πρωτεϊνικό σύμπλοκο στενά συνδεδεμένο με το κέντρο αντίδρασης του PS II και προσανατολισμένο προς τη μεριά του μικροχώρου. Τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν από τη φωτόλυση του νερού επαναφέρουν το PS II στη βασική του κατάσταση, επιτρέποντας έτσι στη διαδικασία να επαναληφθεί, ενώ τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν από την οξείδωση του PS II μεταφέρονται στο PS I ,διαμέσου της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Τα πρωτόνια που προκύπτουν από τη φωτόλυση του νερού παραμένουν εντός του ενδοθυλακοειδούς χώρου δημιουργώντας μία διαφορά pH μεταξύ αυτού και του στρώματος, ενώ το O<sub>2</sub> που παράγεται διαχέεται εκτός του χλωροπλάστη. Η παραγωγή ενός μορίου O<sub>2</sub> απαιτεί την προώθηση τεσσάρων ηλεκτρονίων, δηλαδή την οξείδωση δύο μορίων νερού. Συνεπώς, θεωρητικά, απαιτείται η απορρόφηση τεσσάρων φωτονίων που οδηγεί στη φωτοχημική ροή τεσσάρων ηλεκτρονίων και στη συσσώρευση τεσσάρων πρωτονίων (Κατινάκης, 2004).



Εικόνα 5. Η ροή των ηλεκτρονίων και πρωτονίων μέσω των τεσσάρων βασικών πρωτεϊνικών συμπλόκων κατά τη λειτουργία των φωτεινών αντιδράσεων.

Ταυτόχρονα με τις φωτοχημικές αντιδράσεις που διεξάγονται προς την πλευρά του PS II, παρόμοια διαδικασία εκτυλίσσεται στο PS I. Η απορρόφηση ενός φωτονίου από τα μόρια των χρωστικών του φωτοσυλλεκτικού μηχανισμού του PS I, προκαλεί διέγερση και διαχωρισμό φορτίου στο P700. Μέρος από τα ηλεκτρόνια του οξειδωμένου PS I μεταφέρονται στη φερρεδοξίνη, μία διαλυτή στο στρώμα σιδηροπρωτεΐνη, η οποία κατ' αυτόν τον τρόπο ανάγεται. Έπειτα, οξειδώνεται με τη βοήθεια του ενζύμου οξειδοοδουκτάση της φερρεδοξίνης-NADP<sup>+</sup> και ανάγει το NADP<sup>+</sup> σε NADPH (Δροσόπουλος, 1998). Τα υπόλοιπα ηλεκτρόνια μεταφέρονται μέσω της πλαστοκυανίνης πάλι στο PS I, το οποίο προσλαμβάνοντας και τα ηλεκτρόνια που προέρχονται από το PS II, επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση. Συνεπώς, η ροή ηλεκτρονίων μεταξύ των δύο φωτοσυστημάτων οδηγεί στη μεταφορά ηλεκτρονίων από το νερό στο NADP<sup>+</sup> παράγοντας ταυτόχρονα μια διαβάθμιση ηλεκτροχημικού δυναμικού και pH μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης των θυλακοειδών. Αυτή η διαβάθμιση αποτελεί την κινητήρια δύναμη για τη σύνθεση του ATP (Taiz και Zeiger, 2006). Η σύνθεση του ATP πραγματοποιείται λόγω μίας αντίστροφης-αυθόρμητης εκροής πρωτονίων από το μικροχώρο προς το στρώμα, που τείνει να εξισορροπήσει τη διαφορά pH που έχει δημιουργηθεί. Η μεμβράνη των θυλακοειδών είναι αδιαπέραστη στα πρωτόνια, οπότε η εκροή συμβαίνει μέσω ειδικών πρωτεϊνικών καναλιών, γνωστά ως διαμεμβρανικά σύμπλοκα της ATP-συνθετάσης. Η ροή των πρωτονίων παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για τη φωσφορυλίωση του ADP προς ATP.

Η παραγωγή ATP στους χλωροπλάστες με τη βοήθεια της ηλιακής ενέργειας είναι γνωστή ως φωτοφωσφορυλίωση, ενώ η συνεχής ροή ηλεκτρονίων από τη φωτόλυση του νερού μέσω των φωτοσυστημάτων I και II προς τον τελικό αποδέκτη NADP<sup>+</sup> με αποτέλεσμα τη σύνθεση NADPH και ATP, είναι γνωστή ως μη κυκλική μεταφορά ηλεκτρονίων ή μη κυκλική φωτοφωσφορυλίωση. Ωστόσο, το PS I έχει τη δυνατότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων

## Εισαγωγή

ανεξάρτητα από το PS II ως αποτέλεσμα της ύπαρξής τους σε διαφορετικές περιοχές της μεμβράνης των θυλακοειδών. Πρόκειται για μία κυκλική πορεία μεταξύ φερρεδοξίνης, πλαστοκινόνης, συμπλόκου κυτοχρωμάτων  $b_6f$ , πλαστοκυανίνης και χλωροφύλλης P700, γνωστή ως κυκλική μεταφορά ηλεκτρονίων ή κυκλική φωτοφωσφορυλίωση (Δροσόπουλος, 1998). Στην περίπτωση αυτή, τα ηλεκτρόνια αντί ν' ακολουθήσουν γραμμική πορεία με τελικό αποδέκτη το  $NADP^+$ , επανέρχονται στο οξειδωμένο P700, με αποτέλεσμα να μην παράγεται NADPH αλλά να δημιουργείται ηλεκτροχημικό δυναμικό μέσω του οποίου μπορεί να συντεθεί αποκλειστικά ATP.

### 1.3.2. Οι σκοτεινές αντιδράσεις

Μετά την ολοκλήρωση των φωτεινών αντιδράσεων, τα πλούσια ενεργειακά προϊόντα τους, το ATP και το NADPH, χρησιμοποιούνται σε πολυάριθμες βιοχημικές αντιδράσεις, για την πραγματοποίηση των οποίων απαιτείται η κατανάλωση ενέργειας. Σημαντικό τμήμα της ενέργειας αυτών των σωμάτων καταναλώνεται για τη δέσμευση του ατμοσφαιρικού  $CO_2$  και την αναγωγή του στο επίπεδο των υδατανθράκων (φωτοσυνθετική αφομοίωση του  $CO_2$ ), και κατ' επέκταση για την παραγωγή βιομάζας (Αϊβαλάκις, κ.ά., 2005). Η μετατροπή του  $CO_2$  σε υδατάνθρακες συμβαίνει μέσω μίας σειράς αντιδράσεων που καταλύονται από ένζυμα, ευρισκόμενα στο στρώμα των χλωροπλαστών. Αυτές οι αντιδράσεις είναι γνωστές ως *σκοτεινές αντιδράσεις* της φωτοσύνθεσης, με την έννοια ότι η ολοκλήρωσή τους δεν εξαρτάται άμεσα από την παρουσία φωτός, με αποτέλεσμα να μπορούν να διεξαχθούν και να ολοκληρωθούν και στο σκοτάδι, υπό την προϋπόθεση πως είναι διαθέσιμα τα ATP και NADPH (εικόνα 4). Ωστόσο αυτός ο ορισμός δεν είναι ακριβής διότι μερικά ένζυμα του κύκλου της αναγωγής του άνθρακα ενεργοποιούνται από το φως, ενώ υπό συνθήκες σκότους είναι ανενεργά ή παρουσιάζουν χαμηλή δραστηριότητα (Δροσόπουλος, 1998). Επομένως, οι αντιδράσεις αυτές δεν είναι δυνατό να πραγματοποιηθούν εξ ολοκλήρου στο σκοτάδι, γι αυτό και θα ήταν αποδεκτός ο χαρακτηρισμός τους ως αντιδράσεις της φωτοσυνθετικής αφομοίωσης του άνθρακα (Taiz και Zeiger, 2006).

#### 1.3.2.1. Ο κύκλος της αφομοίωσης του διοξειδίου του άνθρακα

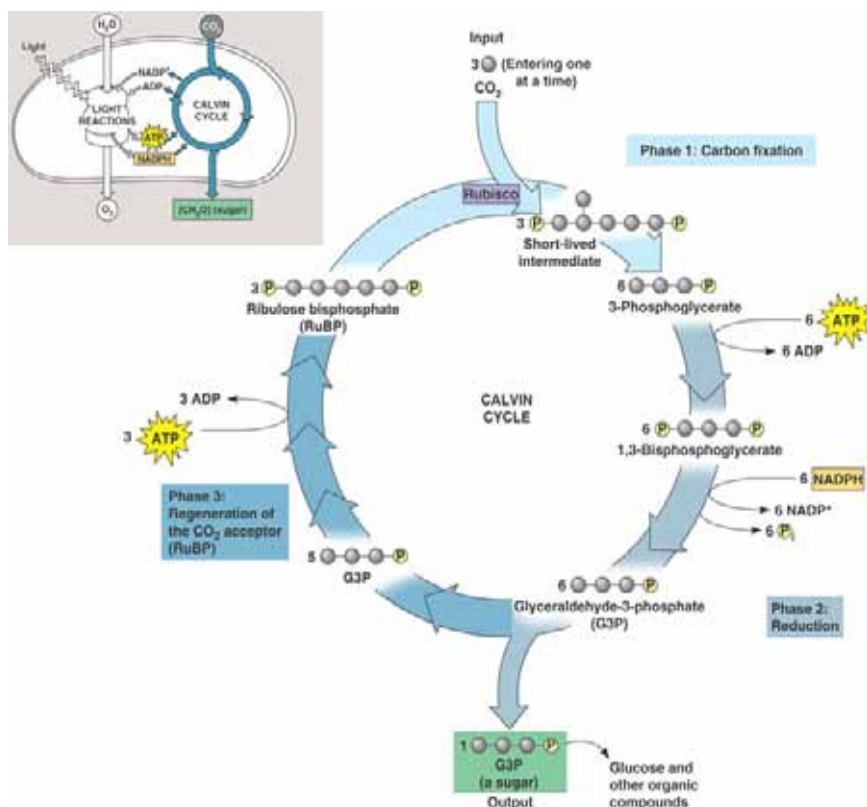
Η αφομοίωση του άνθρακα θεωρείται η πιο σημαντική μεταβολική δραστηριότητα των αυτότροφων οργανισμών, διότι μετατρέπουν τις ανόργανες μορφές άνθρακα σε οργανικές ουσίες, μέσω μίας σειράς από αντιδράσεις, που ακολουθούν κυκλική πορεία και είναι γνωστές ως κύκλος των Calvin-Benson (προς τιμήν των επιστημόνων που τον ανακάλυψαν) ή κύκλος  $C_3$  (διότι το πρώτο προϊόν που σχηματίζεται στον φωτοσυνθετικό κύκλο αναγωγής του άνθρακα είναι ένα σώμα με τρία άτομα άνθρακα). Το χαρακτηριστικό αυτού του κύκλου είναι ότι αφήνει καθαρό κέρδος σε άνθρακα, συγκρινόμενος με άλλες μεταβολικές πορείες σε φυτά ή ζώα, που για κάθε μόριο άνθρακα που δεσμεύεται, ένα μόριο απελευθερώνεται σε κάποιο επόμενο στάδιο της διαδικασίας (Μανέτας, 2005). Κι ενώ το  $CO_2$  περιέχει μία από τις πιο οξειδωμένες μορφές άνθρακα που υπάρχουν στη φύση (+4), μέσω του κύκλου του Calvin, σταδιακά, ο αριθμός οξειδωσης του άνθρακα μειώνεται έτσι ώστε να μπορέσει να

ενσωματωθεί στις οργανικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται από τα κύτταρα (Taiz και Zeiger, 2006).

Αρχικά, το ατμοσφαιρικό CO<sub>2</sub> εισέρχεται από τα στομάτια των φύλλων και μέσω διάχυσης καταλήγει στο στρώμα των χλωροπλαστών των κυττάρων του μεσόφυλλου, ώστε να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για τη δράση των ενζύμων του κύκλου C<sub>3</sub>. Ο κύκλος περιλαμβάνει τρία διακριτά στάδια: την καρβοξυλίωση, την αναγωγή και την αναγέννηση του δέκτη (*εικόνα 6*). Στην πρώτη φάση, το μόριο που υποδέχεται το CO<sub>2</sub> είναι η διφωσφορική ριβουλόζη (RuBP), ένα σάκχαρο με πέντε άτομα άνθρακα και δύο φωσφορικές ομάδες. Από την καρβοξυλίωση παράγεται ένα ασταθές προϊόν που διασπάται σε δύο μόρια 3-φωσφογλυκερινικού οξέος (PGA). Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση είναι η καρβοξυλάση-οξυγονάση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης, που σε σύντμηση ονομάζεται Rubisco, και είναι η πλέον άφθονη πρωτεΐνη των φύλλων, καθώς αποτελεί περίπου το 15% της συνολικής πρωτεΐνης των χλωροπλαστών. Στη δεύτερη φάση, το PGA ανάγεται σε 3-φωσφογλυκεριναλδεΐδη, που είναι ένα άτομο με τρία άτομα άνθρακα (τριόζη), σε μία σειρά δύο αντιστρεπών αντιδράσεων. Στην πρώτη αντίδραση, που καταλύεται από την κινάση του φωσφορογλυκερινικού, το PGA μετατρέπεται σε 1,3-διφωσφογλυκερινικό. Στη συνέχεια, αυτό ανάγεται από το NADPH σε φωσφορική γλυκεραλδεΐδη, σε μια αντίδραση που καταλύεται από μια NADP<sup>+</sup>-εξαρτώμενη αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (Κατινάκης, 2004). Η αντίδραση της αναγωγής του PGA είναι ακριβώς αντίστροφη της κύριας εξεργονικής αντίδρασης της γλυκόλυσης. Μάλιστα, είναι ενδεργονική, απαιτώντας ένα μόριο ATP και ένα μόριο NADPH<sub>2</sub> για κάθε μόριο PGA που ανάγεται. Για κάθε έξι περιστροφές του κύκλου το καθαρό προϊόν είναι ένα μόριο εξόζης. Η συνεχής αφομοίωση του CO<sub>2</sub> απαιτεί το σταθερό εφοδιασμό του κύκλου με διφωσφορική ριβουλόζη, η οποία εξασφαλίζεται με την αναγέννηση της από τις παραγόμενες φωσφορικές τριόζες. Συγκεκριμένα, τα 5/6 των παραγόμενων τριοζών χρησιμοποιούνται για την αναγέννηση της RuBP, ενώ το υπόλοιπο 1/6 διατίθεται για τη βιοσύνθεση χρήσιμων τελικών προϊόντων που περιλαμβάνουν όχι μόνο εξόζες, αλλά και λιπαρά οξέα και αμινοξέα. Από τις εξόζες παράγεται ο δισακχαρίτης σακχαρόζη προς μεταφορά στο υπόλοιπο φυτό ή ο πολυσακχαρίτης άμυλο προς αποταμίευση στο χλωροπλάστη (Μανέτας, 2005). Στην τρίτη λοιπόν, και τελευταία φάση του κύκλου του Calvin, οι αντιδράσεις που οδηγούν στην αναγέννηση της RuBP από φωσφοτριόζες μπορούν να διαχωριστούν σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, τα ένζυμα φωσφατάση της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης, φωσφατάση της 1,7-διφωσφορικής σεδοεπουλόζης, τρανσκετολάση και αλδολάση μετατρέπουν ένα μέρος των φωσφορικών τριοζών σε φωσφορικές πεντόζες. Στο δεύτερο στάδιο, οι φωσφορικές πεντόζες μετατρέπονται σε φωσφορική ριβουλόζη μέσω μίας σειράς αντιδράσεων που καταλύονται από την ισομεράση της 5-φωσφορικής ριβόζης, την επιμεράση της 5-φωσφορικής ριβουλόζης και την κινάση της 5-φωσφορικής ριβουλόζης (Κατινάκης, 2004). Με τη συμπλήρωση και της τρίτης φάσης, ο

## Εισαγωγή

κύκλος  $C_3$  έχει ολοκληρωθεί και η RuBP είναι διαθέσιμη εκ νέου ως υπόστρωμα της Rubisco για τον επόμενο κύκλο.



Εικόνα 6. Η πορεία των βιοχημικών αντιδράσεων του κύκλου του Calvin.

### 1.3.2.2. Παραλλαγές στη βιοχημική οδό φωτοσυνθετικής ενσωμάτωσης του άνθρακα ( $C_3$ , $C_4$ και CAM φωτοσύνθεση)

Έως σήμερα, έχουν γίνει γνωστές τρεις κύριες βιοχημικές παραλλαγές του φωτοσυνθετικού μεταβολισμού του άνθρακα (Αιβαλάκις, κ.ά., 2005):

1. Η  $C_3$  φωτοσύνθεση ή κύκλος του Calvin, με πρώτο ενδιάμεσο μεταβολίτη το 3-φωσφογλυκερινικό οξύ (ένωση με τρία άτομα άνθρακα)
2. Η  $C_4$  φωτοσύνθεση ή κύκλος των Hatch και Slack, με πρώτο ενδιάμεσο μεταβολίτη το οξαλικό οξύ (ένωση με τέσσερα άτομα άνθρακα)
3. Ο μεταβολισμός οξέων τύπου Crassulaceae (CAM)

Κατά την περιγραφή του κύκλου του Calvin παραπάνω, αναφέρθηκε ως πρώτο προϊόν της φωτοσυνθετικής αφομοίωσης του  $\text{CO}_2$  το PGA, δηλαδή ένα μόριο με τρία άτομα άνθρακα. Όλα τα φυτά που ακολουθούν τη μεταβολική αυτή οδό είναι γνωστά ως  $C_3$  φυτά (Δροσόπουλος, 1998).

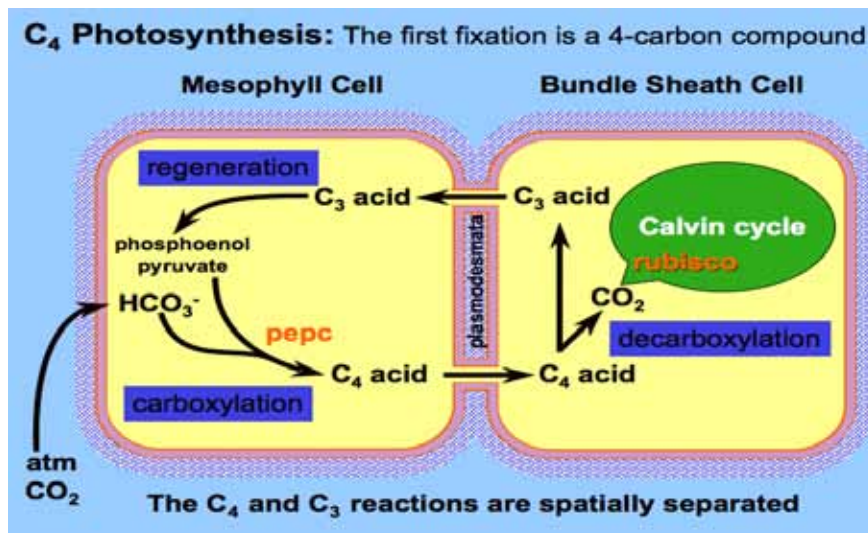
Ορισμένα φυτά όμως, που αντιπροσωπεύουν περίπου το 1% του συνόλου των φυτικών ειδών, έχουν αναπτύξει μηχανισμούς, μέσω των οποίων αυξάνουν τη συγκέντρωση του  $\text{CO}_2$  εντός των κυττάρων στα οποία υπάρχει και λειτουργεί η Rubisco, εμφανίζοντας έτσι δύο ή τρεις φορές υψηλότερη φωτοσυνθετική δραστηριότητα σε σχέση με τα  $C_3$  φυτά ειδικά σε υψηλές εντάσεις προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Σ' αυτά τα φυτά το πρώτο προϊόν της



καθήλωσης του  $\text{CO}_2$  είναι το οξαλικό οξύ, ένα  $\text{C}_4$  οξύ και ως εκ τούτου καλούνται  $\text{C}_4$  φυτά (Κατινάκης, 2004). Η  $\text{C}_4$  οδός (εικόνα 7) λειτουργεί ως ένα πολύπλοκο βιοχημικό και φυσιολογικό προσάρτημα του κύκλου του Calvin που εξυπηρετεί στη δέσμευση, μεταφορά και συγκέντρωση ατμοσφαιρικού  $\text{CO}_2$  στις περιοχές στις οποίες λειτουργεί ο κύκλος του Calvin. Η σημαντική διαφοροποίηση της  $\text{C}_4$  οδού έγκειται στην εξειδικευμένη ανατομία των φύλλων των φυτών που ανήκουν σ' αυτήν την κατηγορία, γνωστή ως ανατομία Kranz (Αϊβαλάκης, κ.ά., 2005). Συγκεκριμένα, τα  $\text{C}_4$  φυτά περιλαμβάνουν δύο τύπους φωτοσυνθετικών κυττάρων, διευθετημένα σε δύο ομόκεντρους κύκλους, που περιβάλλουν τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες: *α.* τα κύτταρα του μεσοφύλλου, που διαθέτουν λεπτά τοιχώματα και μεγάλους μεσοκυττάριους χώρους, συνδεδόμενα χαλαρά μεταξύ τους και *β.* τα κύτταρα του κολεού της δέσμης, που είναι ευμεγέθη με παχιά κυτταρικά τοιχώματα, για την αποτροπή της διάχυσης των αερίων, και μεγάλο αριθμό χλωροπλάστων και συνδέονται με τα κύτταρα του μεσοφύλλου με πολυάριθμα πλασμοδέσματα. Αυτά τα ανατομικά χαρακτηριστικά επιτρέπουν τη συγκέντρωση του  $\text{CO}_2$  στα κύτταρα του παρεγχυματικού κολεού, όπου βρίσκονται η Rubisco και ο κύκλος  $\text{C}_3$ , και την εύκολη επικοινωνία και κατανομή των εργασιών μεταξύ των κυττάρων του κολεού και του μεσοφύλλου (Κατινάκης, 2004). Το κλειδί του  $\text{C}_4$  μηχανισμού, που δραστηριοποιείται κατά το πρώτο και καθοριστικό στάδιο του, είναι το ένζυμο καρβοξυλάση του φωσφοενολπυροσταφυλικού οξέος (PEP-καρβοξυλάση). Πιο ειδικά, η πρώτη αντίδραση του κύκλου  $\text{C}_4$ , αμέσως μετά την είσοδο του ατμοσφαιρικού  $\text{CO}_2$  στα φύλλα μέσω των στοματιών, είναι η μετατροπή του σε δισανθρακικό ανιόν ( $\text{HCO}_3^-$ ) με τη δράση της ανθρακικής αφυδρατάσης, διότι η PEP-καρβοξυλάση που είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση του άνθρακα, αντιδρά μόνο με  $\text{HCO}_3^-$  και όχι με  $\text{CO}_2$ . Το προϊόν της καρβοξυλίωσης του PEP είναι το οξαλικό οξύ, το οποίο καθότι είναι ασταθές γρήγορα ανάγεται σε ένα πιο σταθερό μόριο, ανάλογα με το είδος του  $\text{C}_4$  φυτού. Σε μερικά είδη μετατρέπεται σε μηλικό οξύ, ενώ σε άλλα σε ασπαργινικό. Ο  $\text{C}_4$  μεταβολίτης, διαμέσου των πλασμοδεσμών, μεταφέρεται με διάχυση από τα κύτταρα του μεσοφύλλου προς τα κύτταρα του κολεού, όπου και αποκαρβοξυλιώνεται, παράγοντας πυροσταφυλικό οξύ και  $\text{CO}_2$ . Το  $\text{CO}_2$  που απελευθερώνεται, δεσμεύεται από τη Rubisco και αφομοιώνεται μέσω του κύκλου του Calvin σε φωσφορικές τριόζες στους χλωροπλάστες των κυττάρων του δεσμικού κολεού. Το πυροσταφυλικό οξύ επιστρέφει μέσω των πλασμοδεσμών στο μεσοφύλλο, όπου και μετατρέπεται σε PEP με κατανάλωση ATP, ολοκληρώνοντας έτσι με την αναγέννηση του τον κύκλο (Μανέτας, 2005). Η λειτουργία της  $\text{C}_4$  οδού, παρόλο που παρουσιάζει αυξημένο ενεργειακό κόστος οδηγεί στον περιορισμό απωλειών άνθρακα λόγω της φωτοαναπνοής μέσω καταστολής του διπτού χαρακτήρα της Rubisco, η οποία υπό συνθήκες υψηλών συγκεντρώσεων  $\text{CO}_2$  λειτουργεί μόνο ως καρβοξυλάση κι όχι ως οξυγονάση. Τελικά, μέσω της  $\text{C}_4$  φωτοσύνθεσης, επιτυγχάνονται πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις του  $\text{CO}_2$  και επομένως αποτελεσματικότερη δέσμευσή του από τη Rubisco. Τα  $\text{C}_4$  φυτά παρουσιάζουν προσαρμοστικά πλεονεκτήματα σε περιβάλλοντα με υψηλές θερμοκρασίες και έντονες εντάσεις φωτισμού, κάτι που εξηγεί την επικράτησή τους

## Εισαγωγή

στην τροπική και υποτροπική ζώνη. Αντίθετα τα C3 φυτά (όπως το *Berberis thunbergii* της παρούσας μελέτης) λόγω της φωτοαναπνοής είναι πιο αποτελεσματικά σε ηπιότερες θερμοκρασίες, γι' αυτό και επικρατούν σε εύκρατες έως υποτροπικές ζώνες (Δροσόπουλος, 1998).



Εικόνα 7. Ο κύκλος C4 της φωτοσυνθετικής αφομοίωσης του CO<sub>2</sub>.

Εκτός από τα C3 και C4 φυτά, υπάρχει τέλος, μία ομάδα φυτών, που διαβιούν σε ξηρικά περιβάλλοντα με αβέβαια και πρόσκαιρα περιστατικά υψηλής διαθεσιμότητας νερού, όπως οι κάκτοι, που παρουσιάζουν ένα τρίτο μηχανισμό καθήλωσης του CO<sub>2</sub> στην περιοχή της Rubisco. Αυτή η παραλλαγή του φωτοσυνθετικού μεταβολισμού του άνθρακα καλείται όξινος μεταβολισμός τύπου Crassulaceae ή σε σύντμηση CAM, διότι αυτός ο μηχανισμός παρατηρήθηκε αρχικά σε μέλη της οικογένειας Crassulaceae. Τα φύλλα των φυτών αυτών επιδεικνύουν εξαιρετικά μεγάλες μεταβολές στη συγκέντρωση των οξέων και ιδιαίτερα του μηλικού, στη διάρκεια των ημερήσιων κύκλων (Κατινάκης, 2004). Τα φυτά CAM διαθέτουν ανατομικά χαρακτηριστικά που μειώνουν τις απώλειες νερού και CO<sub>2</sub>, όπως παχιά σαρκώδη φύλλα και βλαστούς με μεγάλα χυμοτόπια καθώς και μειωμένο μέγεθος αλλά και συχνότητα του ανοίγματος των στοματίων τους. Συγκεκριμένα, τα στομάτια τους ανοίγουν κατά τη διάρκεια της νύχτας, οπότε και πραγματοποιείται η ανταλλαγή αερίων και η αρχική καθήλωση του CO<sub>2</sub> και κλείνουν κατά την ημέρα (Taiz και Zeiger, 2006). Όπως και στη C4 φωτοσύνθεση, έτσι και στο μηχανισμό CAM, ένζυμο κλειδί θεωρείται η PEP-καρβοξυλάση. Κατά τη διάρκεια της νύχτας, αποδομείται μέρος των αποθηκευμένων υδατανθράκων για να παραχθεί το υπόστρωμα της PEP-καρβοξυλάσης. Το CO<sub>2</sub> που εισέρχεται στα φύλλα μέσω του νυχτερινού ανοίγματος των στοματίων, ενσωματώνεται στο PEP και μετατρέπεται σε οξαλικό οξύ, που γρήγορα ανάγεται σε μηλικό από τη δράση της NAD-εξαρτώμενης αφυδρογονάσης του μηλικού. Το μηλικό οξύ μεταφέρεται στα χυμοτόπια μέσω ενεργού μεταφοράς, όπου και συσσωρεύεται, προκαλώντας έντονη οξύνιση στα κύτταρα των φύλλων κατά τη νύχτα. Κατά τη διάρκεια της καθήλωσης του CO<sub>2</sub>, τα στομάτια των φύλλων παραμένουν ανοιχτά για να

υπάρχει σταθερή παροχή του ατμοσφαιρικού άνθρακα (Δροσόπουλος, 1998). Σύμφωνα με τα παραπάνω, τα φυτά CAM χαρακτηρίζονται από ημερονύκτιες διακυμάνσεις του περιεχομένου των κυττάρων σε μηλικό οξύ, καθώς συσσωρεύεται τη νύχτα και ελαττώνεται στη διάρκεια της ημέρας, αλλά και σε άμυλο και pH, με τα δύο τελευταία να ακολουθούν αντίθετη πορεία από εκείνη του μηλικού (Αϊβαλάκης, κ.ά., 2005). Στις πρώτες πρωινές ώρες, τα στομάτια αρχίζουν να κλείνουν και το μηλικό οξύ απελευθερώνεται από τα χυμοτόπια στο κυτταρόπλασμα, όπου και αποκαρβοξυλιώνεται από το μηλικό ένζυμο-NAD προς πυροσταφυλικό οξύ. Έτσι, η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> αρχίζει ν' αυξάνεται, κι επειδή τα στομάτια έχουν κλείσει είναι αδύνατο να διαφύγει. Ο κύκλος του Calvin έχει αρχίσει να λειτουργεί και η υψηλή συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> επιτρέπει την καρβοξυλιωτική δράση της Rubisco. Το παραγόμενο πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται τελικά σε φωσφορικές τριόζες, οι οποίες διαχέονται στους χλωροπλάστες και αφομοιώνονται από τον κύκλο C3 για την παραγωγή υδατανθράκων. Μάλιστα, το άμυλο αποτελεί την πρώτη ύλη για τη σύνθεση του PEP, που είναι απαραίτητο για τη συντήρηση της αντίδρασης καρβοξυλίωσης (Κατινάκης, 2004). Αξίζει ν' αναφερθεί ότι ο μεταβολισμός CAM παρουσιάζει ομοιότητες με τον κύκλο C4 καθώς και ορισμένες διαφορές, ωστόσο η σημαντικότερη έγκειται στο γεγονός ότι ενώ στα C4 φυτά η αρχική δέσμευση του CO<sub>2</sub> κι ο κύκλος του Calvin λειτουργούν ταυτόχρονα αλλά σε διαφορετικά κύτταρα, στα φυτά CAM λειτουργούν στον ίδιο τύπο κυττάρου αλλά σε διαφορετικές ώρες του ημερονύκτιου κύκλου. Με διαφορετικά λόγια, οι καρβοξυλιώσεις στα φυτά C4 είναι διαχωρισμένες τοπικά, ενώ στα φυτά CAM είναι διαχωρισμένες χρονικά (Taiz και Zeiger, 2006).

### ***1.3.3. Καταπόνηση της φωτοσυνθετικής συσκευής από υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας, φωτοαναστολή και φωτοπροστασία.***

Τα φυτά στο φυσικό τους περιβάλλον υποβάλλονται σε διακυμάνσεις της ηλιακής ακτινοβολίας ανάλογα με την ώρα της ημέρας και την εποχή, με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται διακύμανση και στην ποσότητα των φωτονίων που απορροφούνται από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές. Σε υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας, τα φυτά αρχικά ανταποκρίνονται με αύξηση του ρυθμού απορρόφησης του φωτός από τις χλωροφύλλες, που οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού αφομοίωσης του CO<sub>2</sub>. Υπό συνθήκες υπερπροσφοράς ενέργειας της φωτεινής ακτινοβολίας, η απορρόφησή της από τη φωτοσυνθετική συσκευή δεν είναι εναρμονισμένη με τη χρήση του παραγόμενου φωτοχημικού έργου στις βιοσυνθετικές οδούς του φωτοσυνθετικού αναβολισμού οδηγώντας στην πρόκληση διαταραχών στη φωτοσυνθετική λειτουργία (Καραμπουρνιώτης, 2003). Σε συνθήκες υψηλής υπερτροφοδότησης της φωτοσυνθετικής συσκευής με ενέργεια, το ενεργειακό πλεόνασμα δεν μπορεί να αξιοποιηθεί κατά τη φωτοχημική ροή ηλεκτρονίων. Η κατάσταση αυτή οδηγεί σε συσσώρευση βλάβης στα φωτοσυστήματα, οπότε παρατηρείται μείωση της φωτοσυνθετικής ικανότητας των φυτών, φαινόμενο γνωστό ως φωτοαναστολή. Η φωτοαναστολή μπορεί να είναι παροδική, όπου απλά παρατηρείται μία μείωση της ανά φωτόνιο απόδοσης της

## Εισαγωγή

φωτοσύνθεσης ή χρόνια, με μείωση της ανά φωτόνιο απόδοσης και της μέγιστης φωτοσυνθετικής ικανότητας (Taiz και Zeiger, 2006). Το φαινόμενο αυτό γίνεται έκδηλο ιδιαίτερα στην περίπτωση κατά την οποία τα φυτά βιώνουν συνδυασμό των υψηλών εντάσεων ακτινοβολίας και άλλων παραγόντων καταπόνησης όπως ξηρασία, ακραίες θερμοκρασίες και αλατότητα, ενώ αφορά όχι μόνο φυτά που είναι υποχρεωτικά σκιόφυτα αλλά και ηλιόφυτα, ιδιαίτερα στην περίπτωση όπου μετά από μία περίοδο εγκλιματισμού σε χαμηλές εντάσεις φωτεινής ακτινοβολίας παρέχεται αιφνίδιος φωτισμός υψηλής έντασης (Solonchenko *et al.*, 2008). Σύμφωνα με το μηχανισμό της φωτοαναστολής, το ενεργειακό πλεόνασμα, καθώς δεν μπορεί να αποσβεσθεί στις φωτοχημικές αντιδράσεις ροής ηλεκτρονίων, προκαλεί το σχηματισμό τοξικών προϊόντων όπως βλαβερές μορφές οξυγόνου, που είναι γνωστές ως ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS, reactive oxygen species) και αποτελούν ελεύθερες ρίζες, ιδιαίτερα βλαβερές για τη φωτοσυνθετική συσκευή καθώς επιφέρουν οξειδώσεις και άλλους μετασχηματισμούς ευαίσθητων μορίων όπως αυτών των λιπιδίων, των πρωτεϊνών, των νουκλεϊκών οξέων και των χρωστικών, με συνέπεια την καταστροφή της λειτουργικότητάς τους και την κατάρρευση του κυττάρου λόγω οξειδωτικής καταπόνησης (Stroch *et al.*, 2004). Ο πλέον ευάλωτος στόχος τους στο PS II είναι η πρωτεΐνη D1 που αποικοδομείται και αποσπάται από τη μεμβράνη του θυλακοειδούς, ενώ για να αποκατασταθεί η βλάβη πρέπει να γίνει *de novo* σύνθεση νέου λειτουργικού πεπτιδίου (Taiz και Zeiger, 2006).

Για την αποφυγή της φωτοαναστολής, η φωτοσυνθετική συσκευή είναι εξαιρετικά δυναμική και ικανή να αντιδρά σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών στην ποιότητα και στην ποσότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Επιπλέον, τα φυτά διαθέτουν διάφορους μορφολογικούς και βιοχημικούς μηχανισμούς, που καλούνται φωτοπροστατευτικοί μηχανισμοί, ώστε α) να αποφεύγουν τη δέσμευση της πλεονάζουσας ενέργειας, β) να εξισορροπούν την απορρόφηση της ενέργειας με την κατανάλωση της για την παραγωγή φωτοχημικού έργου αλλά και με την απόσβεση της περίσσειάς της, ενώ γ) διαθέτουν μία σειρά από ενζυμικά και μη ενζυμικά συστήματα που συμβάλλουν στην απόσβεση της πλεονάζουσας ενέργειας, στην πρόληψη της δημιουργίας ROS, καθώς και στην εξουδετέρωσή τους (Steyn *et al.*, 2002). Στην αποφυγή της απορρόφησης πλεονάζουσας ενέργειας συμμετέχουν οι μορφολογικές και φυσιολογικές τροποποιήσεις είτε μόνιμες είτε παροδικές (οι οποίες λαμβάνουν χώρα σε χρονικά διαστήματα από μερικά δευτερόλεπτα έως μερικές ημέρες), με στόχο τη μείωση της απορροφητικότητας του φύλλου. Στην ασφαλή απόσβεση της πλεονάζουσας ενέργειας συμμετέχουν φαινόμενα όπως η επανεκπομπή φωτονίων με τη μορφή φθορισμού (αν και η συμμετοχή της είναι πολύ μικρή), η απόσβεση της πλεονάζουσας ενέργειας με τη μορφή απωλειών θερμότητας όπου πρωταγωνιστικό ρόλο διαδραματίζει ο κύκλος των ξανθοφυλλών, και τέλος η κατανάλωση της επιπλέον ενέργειας με τη μορφή ATP σε διαδικασίες όπως η φωτοαναπνοή και η αντίδραση Mehler (Καραμπουρνιώτης, 2003). Γενικά, η μείωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης που παρατηρείται

σε συνθήκες φωτοαναστολής δεν οφείλεται αποκλειστικά σε βλάβες στα κέντρα αντίδρασης του PS II, αλλά και στην επαγωγή φωτοπροστατευτικών μηχανισμών για τη διοχέτευση της πλεονάζουσας ενέργειας με εκπομπή θερμότητας (Demmig-Adams and Adams, 1992). Όταν οι παραπάνω μηχανισμοί είναι επαρκείς, αποφεύγονται οι μόνιμες βλάβες στο φυτό, η μείωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης είναι αντιστρεπτή και έχει προστατευτικό ρόλο (δυναμική φωτοαναστολή). Αν ωστόσο, οι αμυντικοί μηχανισμοί αδυνατούν να ανταποκριθούν πλήρως στο ενεργειακό φορτίο, τότε οι ROS παράγονται με αυξημένο ρυθμό, παραμένουν και δημιουργούν μόνιμες βλάβες (μόνιμη φωτοαναστολή). Ακόμα όμως και στην περίπτωση κατά την οποία, οι διάφοροι φωτοπροστατευτικοί μηχανισμοί δεν δύνανται να προστατέψουν τη φωτοσυνθετική συσκευή, αντισταθμίζουν αυτήν τους την αδυναμία με τη δραστηριοποίηση μηχανισμών επιδιόρθωσης των ζημιών που έχουν προκύψει. Όσο ο ρυθμός επιδιόρθωσης των βλαβών υπερτερεί του ρυθμού συσσώρευσης τους, η φωτοσυνθετική συσκευή προστατεύεται επαρκώς. Στην αντίθετη περίπτωση, συσσωρεύεται υψηλό επίπεδο φωτοαναστολής με δυσμενείς επιπτώσεις στη φυτικό οργανισμό (Takahashi and Murata, 2008).

### **1.3.3.1. Οπτικά φράγματα των φύλλων, παρουσία ανθοκυανιούχων κυττάρων κι επιπτώσεις στις οπτικές ιδιότητες των φύλλων**

Τα φυτά για να αποφεύγουν την καταπόνηση της φωτοσυνθετικής συσκευής από τις υπερβολικές εντάσεις ακτινοβολίας, προτάσσουν ως πρώτη γραμμή άμυνας έναν αριθμό στρατηγικών αποφυγής, που λειτουργούν στο επίπεδο του προτύπου της κίνησης και της δομής των φύλλων και έχουν ως στόχο να περιορίσουν το φως που προσπίπτει στους φωτοσυνθετικούς ιστούς και τελικά να μειώσουν την ποσότητα των φωτονίων που απορροφούνται από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές (Μανέτας, 2005). Πιο ειδικά, κάποια φυτά ρυθμίζουν με τέτοιο τρόπο τον προσανατολισμό των φύλλων τους, ώστε να διευθετούνται περισσότερο παράλληλα προς τις ηλιακές ακτίνες ώστε να μειώνεται η πυκνότητα της φωτονιακής ροής ανά μονάδα επιφάνειας του ελάσματος. Άλλα φυτά, ιδίως τα σκιοφιλά είδη που εκτίθενται συχνά σε ηλιοκηλίδες, αναδιπλώνουν τα φύλλα τους, προκειμένου να μειώσουν την ελεύθερη επιφάνειά τους και να προβάλλουν περισσότερο την αποαξονική επιφάνεια τους προς τον ήλιο, η οποία εμφανίζει υψηλότερη ανακλαστικότητα (Taiz και Zeiger, 2006; Μανέτας, 2005). Ωστόσο, σε συνθήκες υψηλού φωτισμού, παρατηρούνται πιο μακροπρόθεσμες προσαρμογές, όπως η ανάπτυξη ενός παχέος στρώματος κηρών, τριχώματος ή αδένων άλατος στην επιφάνεια των φύλλων, που αυξάνουν την ανάκλαση του φωτός και είναι δυνατό να μειώσουν την απορρόφηση του έως και 40%, ελαχιστοποιώντας παράλληλα την υπερβολική θέρμανση καθώς και άλλα προβλήματα που συνδέονται με τη απορρόφηση του φωτός (π.χ. απώλειες νερού, είσοδος υπερϊώδους ακτινοβολίας στο εσωτερικό των ιστών κ.ά.) (Demmig-Adams and Adams, 1992). Υπάρχουν επίσης στρατηγικές, που λαμβάνουν χώρα στο εσωτερικό των φυτικών ιστών και αφορούν σε κινήσεις χλωροπλαστών αλλά και στη συσσώρευση χρωστικών, περιοριστικών ως προς την απορρόφηση της ηλιακής ακτινοβολίας. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί υπό καθεστώς έντονου φωτισμού, η

## Εισαγωγή

μετακίνηση χλωροπλαστών είτε προς τα αντικλινή κυτταρικά τοιχώματα είτε προς την επιφάνεια των κυττάρων που είναι διευθετημένα παράλληλα προς την προσπίπτουσα ακτινοβολία, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της απορρόφησης φωτονίων από το φύλλο έως και 15% (Taiz και Zeiger, 2006). Η φωτοπροστατευτική λειτουργία στα φυτά ολοκληρώνεται με τη συσσώρευση στους φυτικούς ιστούς ενός μεγάλου αριθμού χρωστικών, με κύριους εκπροσώπους τα καροτενοειδή, τις φαινολικές ενώσεις και ορισμένα αλκαλοειδή. Παρόλο που διαφέρουν μεταξύ τους στη χημική δομή και τις οπτικές ιδιότητες, όλες οι παραπάνω χρωστικές παρουσιάζουν μία κοινή χαρακτηριστική φωτοσταθερότητα, δηλαδή από τη στιγμή που επάγεται ο σχηματισμός τους μπορούν να διατηρηθούν με ελάχιστη δαπάνη ενέργειας, προσφέροντας μία μακροπρόθεσμη προστασία εναντίον της φωτοαναστολής (Solonchenko *et al.*, 2008). Από τις φαινολικές ενώσεις ξεχωρίζουν οι ανθοκυανίνες, μία ομάδα χρωστικών με χαρακτηριστικό ερυθρό χρωματισμό, ενώ από τα αλκαλοειδή οι μπεταλαΐνες.

Για λόγους που δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί, τα ανώτερα φυτά διαφέρουν σημαντικά ως προς την ικανότητά τους να συνθέτουν τις ανθοκυανίνες, γι' αυτό και υπάρχουν ελάχιστα φυτά που διαθέτουν μονίμως ανθοκυανικά φύλλα, με την εμφάνιση ερυθρού χρώματος σε ολόκληρη την επιφάνειά τους ή σε ορισμένα σημεία τους, ενώ πιο συνηθισμένη είναι η περίπτωση της παροδικής ερυθρότητας των φύλλων (Manetas, 2006). Οι ανθοκυανίνες συσσωρεύονται σε επιφανειακούς ιστούς κυρίως των νεαρών και γηρασμένων φύλλων που εκτίθενται απευθείας στο φως, όπως η προσαξονική επιδερμίδα αλλά και στα κύτταρα του μεσοφύλλου. Η σύνθεσή τους επάγεται από την παρουσία φωτός και ενισχύεται σε περιόδους κατά τις οποίες η έντονη ακτινοβολία συνδυάζεται και με άλλους παράγοντες καταπόνησης, όπως ακραίες θερμοκρασίες, ξηρασία, τροφοπενίες θρεπτικών στοιχείων κ.ά., οι οποίοι αυξάνουν την ενεργειακή πίεση στους χλωροπλάστες και ο κίνδυνος για οξειδωτικές βλάβες είναι σοβαρός (Merzlyak *et al.*, 2008). Ο ακριβής ρόλος των ανθοκυανινών στα φύλλα παραμένει ακόμη ασαφής και ενδεικτικό αυτού είναι ο μεγάλος αριθμός υποθέσεων σχετικών με τη λειτουργία τους, με κυριότερες την προστασία από φωτοαναστολή, την εξουδετέρωση ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), την προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία και την προστασία από φυτοφάγους ή παθογόνους οργανισμούς (Hughes *et al.*, 2008; Manetas, 2006; Merzlyak *et al.*, 2008; Steyn *et al.*, 2002). Πάντως, κανένας από τους προτεινόμενους ρόλους δεν αποδίδεται αποκλειστικά στις ανθοκυανίνες, καθώς άλλα συστατικά των φύλλων μπορούν να εκτελέσουν εξίσου ή και περισσότερο αποτελεσματικά τις ίδιες λειτουργίες (Manetas, 2006). Μεταξύ των διαφόρων θεωριών που επιχειρούν να δώσουν μια εξήγηση για την παρουσία των ανθοκυανινών στα φύλλα, η πιο δημοφιλής αναφέρεται στον πιθανό φωτοπροστατευτικό τους ρόλο. Μάλιστα, η παρουσία τους στα φύλλα έχει συσχετιστεί με τη φωτοπροστασία και με τους μηχανισμούς που χρησιμοποιούν τα φυτά για να αποφεύγουν τη δημιουργία ROS ή να επιτυγχάνουν την εξουδετέρωσή τους. Στην πρώτη περίπτωση οι ανθοκυανίνες μπορούν, λειτουργώντας ως οπτικό φίλτρο, να συμβάλλουν στη μείωση της έντασης του φωτός που φτάνει στις φωτοσυνθετικές χρωστικές, ενώ στη δεύτερη περίπτωση

επιδεικνύοντας αντιοξειδωτική δράση (Manetas, 2006). Ένας λόγος που οι ανθοκυανίνες συνδέθηκαν με την προστασία από τη φωτοαναστολή, είναι και ότι η συσσώρευσή τους επάγεται από τους ίδιους παράγοντες καταπόνησης που αυξάνουν την πιθανότητα δημιουργίας ελεύθερων ριζών στα κύτταρα. Σύγκριση ανθοκυανικών με πράσινα φύλλα συχνά οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι ανθοκυανίνες προστατεύουν τη φωτοσυνθετική συσκευή καθώς τα ανθοκυανικά φύλλα παρουσιάζουν καλύτερες φωτοσυνθετικές παραμέτρους και υψηλότερη αντοχή στη φωτοαναστολή (Steyn *et al.*, 2002). Η παρουσία των ανθοκυανινών στα νεαρά και γηράσκοντα φύλλα, μπορεί να αποδοθεί στον αυξημένο κίνδυνο φωτοαναστολής που αυτά αντιμετωπίζουν, τα μεν λόγω της αναπτυσσόμενης φωτοσυνθετικής συσκευής που δεν είναι ακόμη σε θέση να διαχειριστεί την ενέργεια της ηλιακής ακτινοβολίας που απορροφάται από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές, τα δε λόγω της απορύθμισης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Solonchenko *et al.*, 2008). Μία σειρά πειραματικών δεδομένων δείχνουν πως οι ανθοκυανίνες επηρεάζουν σημαντικά την ποσότητα και ποιότητα του φωτός που απορροφάται από τα φύλλα. In vivo, οι ανθοκυανίνες των φύλλων απορροφούν κυρίως στην υπεριώδη και πράσινη φασματική περιοχή (520-540nm), ενώ εμφανίζουν περιορισμένη απορρόφηση στην κυανή και σχεδόν μηδενική στην ερυθρή περιοχή του φάσματος (Steyn *et al.*, 2002). Τα φύλλα φαίνονται κόκκινα επειδή οι χρωματικές αυτές περιοχές του φάσματος αφαιρούνται από το ανακλώμενο φως, επομένως η περιεκτικότητα των φύλλων σε ανθοκυανίνες συσχετίζεται με αυξημένη απορρόφηση και μειωμένη ανακλαστικότητα στην πράσινη περιοχή. Βάσει των φασματοσκοπικών ιδιοτήτων των ανθοκυανινών, εκφράζονται ενστάσεις για τον πιθανό φωτοπροστατευτικό ρόλο των ανθοκυανινών, καθώς το πράσινο φως (από το οποίο κυρίως πιστεύεται πως προστατεύουν οι ανθοκυανίνες) απορροφάται κυρίως από τα κατώτερα στρώματα του μεσοφύλλου που δε χαρακτηρίζονται από υψηλή ενεργειακή πίεση αλλά αντίθετα συμβάλλουν στην μέτριου ρυθμού αφομοίωση του CO<sub>2</sub> στα βαθύτερα στρώματα των χλωροπλαστών (Manetas, 2006). Με άλλα λόγια, το φάσμα απορρόφησης των ανθοκυανινών δεν ταυτίζεται με το φάσμα δράσης της φωτοαναστολής, καθιστώντας αβέβαιη τη συμβολή αυτών των χρωστικών στη συνολική φωτοπροστασία.

Ο φωτοπροστατευτικός ρόλος των ανθοκυανινών προβάλεται συχνά ως δεδομένος όχι τόσο λόγω της διατύπωσης ενός πειστικού μηχανισμού μέσω του οποίου οι ανθοκυανίνες προσθέτουν στο φωτοπροστατευτικό δυναμικό των φύλλων, όσο λόγω των πολλών πειραματικών δεδομένων τα οποία συνηγορούν υπέρ της ύπαρξής του. Η υπόθεση του οπτικού φίλτρου έχει δοκιμαστεί σε πολυάριθμες μελέτες οι οποίες ωστόσο έχουν δώσει έως σήμερα αντικρουόμενα αποτελέσματα. Αναπτυξιακές μελέτες σε είδη του γένους *Syzygium* δεν έδειξαν υπεροχή των ανθοκυανικών φύλλων ως προς τα πράσινα (Dodd *et al.*, 1998) ενώ ελαφρώς υψηλότερο φωτοπροστατευτικό δυναμικό παρουσιάζουν τα ανθοκυανικά συγκριτικά με τα πράσινα νεαρά φύλλα του *Vitis vinifera* (Liakopoulos *et al.*, 2006) και του *Quercus coccifera* (Manetas *et al.*, 2003). Ισχυρές ενδείξεις για την προστασία έναντι της καταπόνησης

## Εισαγωγή

από ακτινοβολία λόγω της ύπαρξης του ανθοκυανικού φίλτρου έχουν αναφερθεί για πολυάριθμα φυτικά είδη όπως τα *Bauhinia variegata* (Smillie and Hetherington, 1999), *Lactuca sativa* (Neill and Gould, 2003), *Galax urceolata* (Hughes and Smith, 2007), *Cornus stolonifera* (Gould *et al.*, 2010), *Begonia semperflorens* (Zhang *et al.*, 2010) και *Oxalis triangularis* (Nielsen and Simonsen, 2011). Από την άλλη μεριά, οι Burger and Edwards (1996) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα ανθοκυανικά φύλλα του είδους *Coleus blumei* ήταν ομοίως ευαίσθητα στην φωτοπαρεμπόδιση όπως και τα αντίστοιχα πράσινα. Επίσης, καμία εμφανής αύξηση του φωτοπροστατευτικού δυναμικού δεν βρέθηκε ως αποτέλεσμα της ύπαρξης ανθοκυανινών στα φύλλα των ειδών *Prunus cerasifera* (Kyparissis *et al.*, 2007), *Cistus creticus* (Zeliou *et al.*, 2009), *Pistacia lentiscus* (Nikiforou and Manetas, 2010) και *Pelargonium × hortorum* (Liakopoulos and Spanorigas, 2012).

### **1.3.3.2. Εναλλακτικές οδοί απόσβεσης της ενέργειας της φωτεινής ακτινοβολίας στο επίπεδο της φωτοσυλλογής (αποδιέγερση χλωροφύλλης, κύκλος των ξανθοφυλλών (qE), κατάσταση τριπλότητας, απόσβεση μέσω ενεργού φωτοαναστολής (qI))**

Τα φυτά, όταν δεν είναι σε θέση να αποφύγουν την έκθεση τους σε υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας, θέτουν σε εφαρμογή ποικίλες στρατηγικές ανθεκτικότητας, μέσω των οποίων αποσβένουν την περισσευούμενη ενέργεια της φωτεινής ακτινοβολίας είτε στο επίπεδο της φωτοσυλλογής είτε στο επίπεδο των φωτεινών αντιδράσεων.

Μία εκ των παραπάνω στρατηγικών αναφέρεται στην αποδιέγερση του μορίου της χλωροφύλλης (Taiz και Zeiger, 2006). Όπως είναι γνωστό, τα μόρια των φωτοσυνθετικών χρωστικών διεγείρονται όταν απορροφούν ηλιακή ενέργεια, με αποτέλεσμα να είναι ασταθή, να τείνουν δηλαδή να επανέλθουν ταχέως στην θεμελιώδη ενεργειακή κατάσταση, αποδίδοντας την επιπλέον ενέργεια που απορρόφησαν (ενέργεια διέγερσης) με διάφορους τρόπους: α) Με τη μορφή θερμότητας όπου η ενέργεια διέγερσης μετατρέπεται βαθμιαία σε θερμική ενέργεια μέσω αλλαγών δόνησης και περιστροφής του μορίου. β) Με τη μορφή ακτινοβολίας οπότε το μόριο της χρωστικής επιστρέφει στη βασική κατάσταση με ταυτόχρονη εκπομπή ενός φωτονίου. Η εκπομπή συμβαίνει συνήθως πολύ γρήγορα και ονομάζεται φθορισμός. Επειδή τα φαινόμενα διέγερσης-αποδιέγερσης συνοδεύονται πάντα από μικρές απώλειες ενέργειας υπό μορφή θερμότητας, η ενέργεια ακτινοβολίας που εκπέμπεται είναι μικρότερη εκείνης που απορροφήθηκε και ως εκ τούτου το μήκος κύματος της ακτινοβολίας φθορισμού μεγαλύτερο. Παρόλο που η αποδιέγερση μέσω φθορισμού είναι σύνηθες φαινόμενο, η συνεισφορά αυτού του τύπου αποδιέγερσης είναι ποσοτικά αμελητέα. γ) Με μεταφορά της ενέργειας διέγερσης σε γειτονικά μόρια. Μέσω αυτής της διαδικασίας η ενέργεια μεταφέρεται στο κέντρο αντίδρασης κάθε φωτοσυστήματος, διαδικασία που συνοδεύεται από παραγωγή φωτοχημικού έργου, ενώ αν η αποδιέγερση συμβεί με τους δύο πρώτους τρόπους, δεν είναι δυνατόν να παραχθεί φωτοχημικό έργο (Αϊβαλάκης κ.α., 2005). δ) Μέσω εσωτερικής μετατροπής της χλωροφύλλης διεγερμένης κατάστασης απλότητας σε χλωροφύλλη



διεγερμένης κατάστασης τριπλότητας (*εικόνα 8*). Η χλωροφύλλη τριπλότητας ( $^3\text{Chl}$ ), αν και αντιπροσωπεύει έναν εναλλακτικό τρόπο αποδιέγερσης, δύναται να οδηγήσει στην παραγωγή διεγερμένου οξυγόνου απλότητας ( $^1\text{O}_2$ ) το οποίο είναι μια από τις πλέον δραστικές ενεργές μορφές οξυγόνου η οποία μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτες οξειδώσεις και βλάβες ευαίσθητων στόχων όπως οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια των μεμβρανών (Niyogi, 2000). Όλα τα καροτενοειδή έχουν τη δυνατότητα να παραλαμβάνουν την ενέργεια διέγερσης από την  $^3\text{Chl}$  ή από το  $^1\text{O}_2$  και να μεταπίπτουν τα ίδια σε κατάσταση τριπλότητας. Σε αυτή τη μορφή όμως, έχοντας μικρή πιθανότητα να μεταφέρουν την ενέργειά τους στο μοριακό οξυγόνο, επανέρχονται στην αρχική κατάσταση εκπέμποντας θερμότητα και επομένως, είτε μειώνεται ο κίνδυνος δημιουργίας  $^1\text{O}_2$  είτε γίνεται ασφαλής αποδιέγερσή του. Η  $^3\text{Chl}$  που πιθανώς σχηματίζεται στη φωτοσυλλεκτική αντέννα και μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό  $^1\text{O}_2$ , φαίνεται ότι αποδιεγείρεται αποτελεσματικά από τα καροτενοειδή που εντοπίζονται πλησίον της (Stroch *et al.*, 2004). Περίπου 4-25% των φωτονίων που απορροφούνται από το PS II μπορεί να διαχέονται μέσω αυτής της οδού. Η οδός απόσβεσης μέσω της χλωροφύλλης τριπλότητας είναι συστατική και δεν υπόκειται σε ρύθμιση. Πάντως, ακόμα και σε άριστες συνθήκες, το 10% της ενέργειας του φωτός που απορροφάται από το PS II, υπολογίζεται πως χάνεται λόγω της δημιουργίας  $^3\text{Chl}$  (Stroch *et al.*, 2004).

Μία άλλη στρατηγική εμπλέκει τον κύκλο των ξανθοφυλλών, ο οποίος παρέχει τη δυνατότητα απόσβεσης της ενέργειας διέγερσης μέσω της μεταφοράς της σε μόρια ξανθοφυλλών, συγκεκριμένα της ανθεραξανθίνης και κυρίως της ζεαξανθίνης. Γενικά, τα καροτενοειδή εκτελούν βασικούς φωτοπροστατευτικούς ρόλους στους χλωροπλάστες καθώς προκαλούν, μέσω εξειδικευμένων αντιδράσεων, απόσβεση της χλωροφύλλης στην κατάσταση διέγερσης τριπλότητας και αποτοξίνωση των ελεύθερων ριζών ή άλλων ενεργών μορφών οξυγόνου, που σχηματίζονται λόγω της έκθεσης σε υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας (Demmig-Adams, 1990). Τα κυριότερα που απαντώνται στους φωτοσυνθετικούς ιστούς των χερσαίων φυτών είναι η λουτεΐνη, το β-καροτένιο, η βιολαξανθίνη και η νεοξανθίνη. Σε υψηλές εντάσεις φωτός συσσωρεύονται επίσης η ζεαξανθίνη και η ανθεραξανθίνη μέσω σταδιακής αποεποξειδωσης της βιολαξανθίνης. Ενώ η απόσβεση της περίσσειας της ενέργειας από τα καροτενοειδή μέσω της έκλυσης θερμότητας αποτελεί μια μη ρυθμιζόμενη διαδικασία, τα φυτά διαθέτουν επίσης και ένα γρήγορα επαγόμενο μηχανισμό μη φωτοχημικής απόσβεσης (non-photochemical quenching, NPQ), μέσω του οποίου το φως που απορροφάται σε περίσσεια αποσβήνεται επίσης ως θερμότητα και δε συμμετέχει στη φωτοχημική διαδικασία, επιτρέποντας έτσι βραχυπρόθεσμη προσαρμογή στις αλλαγές στην ένταση του φωτός (Young *et al.*, 1997). Το NPQ βασίζεται σε διεργασίες ρυθμιζόμενες από το φως και εξαρτώμενες κυρίως από τον κύκλο των ξανθοφυλλών οι οποίες ενεργοποιούνται υπό συνθήκες αυξημένης έντασης ακτινοβολίας (Field *et al.*, 1998). Οι μεταβολές στο NPQ αποτελούν εκτίμηση της αποδοτικότητας με την οποία πραγματοποιείται η απόσβεση της ενέργειας διέγερσης με τη μορφή θερμότητας, σε σχέση με την αντίστοιχη αποδοτικότητα όταν η φωτοσυνθετική

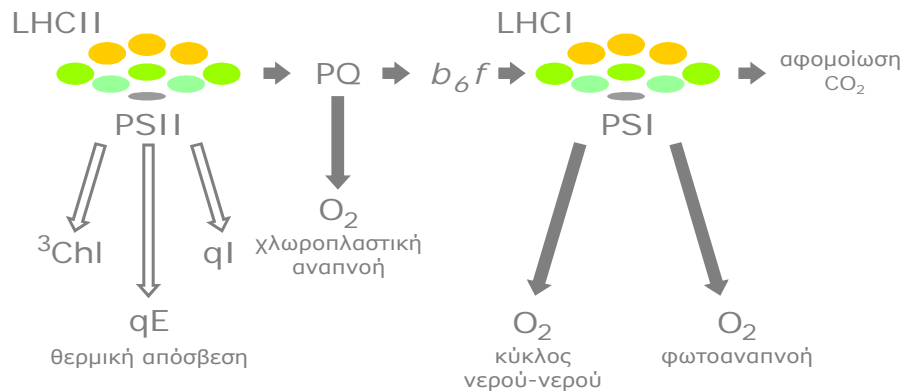
## Εισαγωγή

συσκευή είναι προσαρμοσμένη στο σκοτάδι όπου η απόσβεση είναι αποκλειστικά φωτοχημική. Η αύξηση του NPQ οφείλεται, είτε σε διαδικασίες που προστατεύουν ένα φύλλο από βλάβες λόγω της περίσσειας του φωτός είτε στις ίδιες τις βλάβες. Ένας τρόπος για να διαχωριστούν αυτές οι διαδικασίες είναι μέσω της κινητικής τους, όταν ο ιστός επανέλθει στο σκοτάδι μετά από ένα διάστημα φωτισμού, καθώς η καθεμία ηρεμεί σε διαφορετικό χρόνο, από μερικά λεπτά μέχρι αρκετές ώρες (Demmig-Adams, 1990). Έτσι, συνήθως διακρίνονται τρεις συνιστώσες του NPQ που βασίζονται σε διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς (qE, qT και qI), η κυριότερη ωστόσο συνιστώσα θεωρείται η qE, η οποία ηρεμεί σε λίγα λεπτά μετά την επαναφορά ενός φύλλου στο σκοτάδι. Είναι γνωστή ως pH-εξαρτώμενη μη φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού, λαμβάνει χώρα στη φωτοσυλλεκτική αντέννα (κυρίως του PS II) και οφείλεται στην απόσβεση της ενέργειας διέγερσης της  $^1\text{Chl}$  με τη μορφή θερμότητας, μέσω των τριών καροτενοειδών που συμμετέχουν στον κύκλο των ξανθοφυλλών (Demmig-Adams *et al.*, 1996). Η qE επειδή επάγεται ταχύτατα παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των φυτών που διαβιούν σε περιβάλλοντα με έντονες διακυμάνσεις στην ένταση του φωτός (όπως στον υποόροφο δασών), καθώς μπορεί να προσαρμόσει γρήγορα την συλλογή φωτονίων από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές (εικόνα 8).

Η δεύτερη συνιστώσα, γνωστή ως qT, σχετίζεται με την κατανομή της ενέργειας μεταξύ των δύο φωτοσυστημάτων. Η ρύθμιση της κατανομής γίνεται μέσω αλλαγής της στερεοδιάταξης των πρωτεϊνών των αντεννών φωτοσυλλογής. Η συμβολή του qT στη συνολική μη-φωτοχημική απόσβεση είναι γενικά μικρή, ωστόσο το ποσοστό του είναι σημαντικό σε χαμηλές εντάσεις ακτινοβολίας. Λόγω της φύσης του και δεδομένου ότι κατά τα συνήθη πειράματα φθορισμομετρίας χλωροφύλλης μελετάται μόνο το PS II, το qT σχετίζεται στην πραγματικότητα με την μη-μεταφορά ενέργειας προς το PS II και όχι με την απόσβεσή της. Ωστόσο, συμπεριλαμβάνεται ως συνιστώσα του NPQ κυρίως λόγω του αποτελέσματός του.

Τέλος, υπό υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας, όταν η αποσβεστική ικανότητα της qE φτάνει στον κόρο, εμφανίζεται μια άλλη συνιστώσα του NPQ, γνωστή ως qI, που παραμένει για αρκετό χρονικό διάστημα μετά την προσαρμογή στο σκοτάδι ενός φωτιζόμενου φύλλου (τουλάχιστον 10 λεπτά). Έχει συνήθως πολύ μικρότερη συμβολή από την qE και αποδίδεται σε περισσότερο μόνιμη επίδραση της περίσσειας φωτός. Αυτή η μορφή της μη φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού της χλωροφύλλης συνδέεται με το φαινόμενο της φωτοαναστολής και περιλαμβάνει διαδικασίες που αφορούν στην αντιμετώπιση συσσωρευμένων βλαβών στα κέντρα αντίδρασης του PS II, λόγω της απορρόφησης υπερβολικής ποσότητας φωτονίων. Έτσι, η συνιστώσα qI μειώνει τις βλάβες που παρουσιάζονται στο PS II, μέσω απόσβεσης της πλεονάζουσας απορροφούμενης ενέργειας και φαίνεται να μοιράζεται κάποια χαρακτηριστικά με την qE (Stroch *et al.*, 2004). Συγκεκριμένα, για την αποτελεσματική δράση της qE, είναι απαραίτητη η αλληλομετατροπή των ξανθοφυλλών στον αντίστοιχο κύκλο μαζί με τον σχηματισμό κατάλληλης διαφοράς ΔpH. Η συμμετοχή, λοιπόν, της δραστηριότητας του

κύκλου των ξανθοφύλλων στο μηχανισμό qI έγκειται στο γεγονός ότι η χαλάρωση της qI έχει συσχετισθεί με τη σταδιακή μετατροπή της ζεαξανθίνης σταδιακά σε βιολαξανθίνη. Συνεπώς, η qI αναπτύσσεται πιο έντονα (και χαλαρώνει πιο αργά) απουσία της ζεαξανθίνης, ενώ είναι σαφώς μειωμένη κατά την μόνιμη συσσώρευση υψηλών επιπέδων ζεαξανθίνης (Jahns and Holzwarth, 2012) (εικόνα 8).



Εικόνα 8. Σύνοψη των φωτοπροστατευτικών μηχανισμών των χλωροπλαστών.

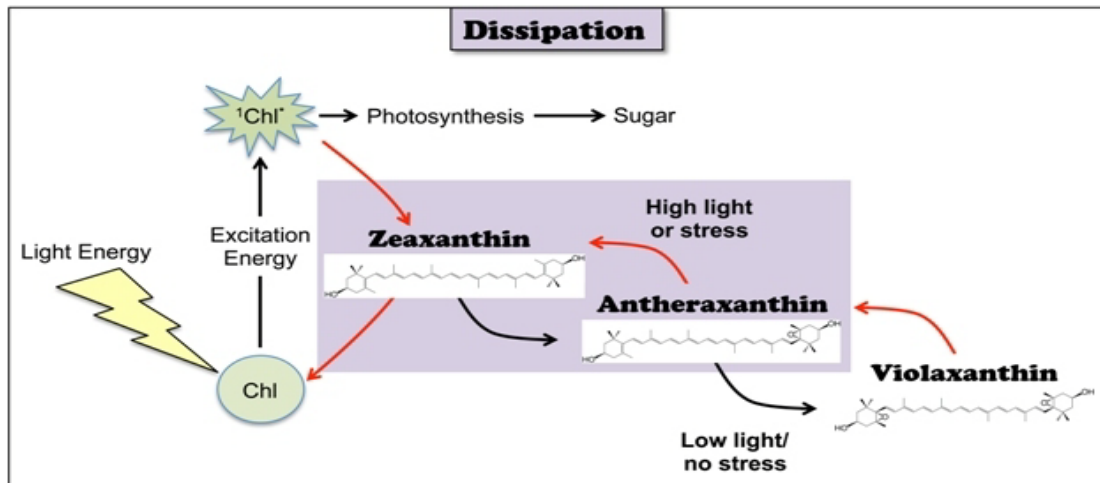
#### 1.3.3.2.1. Ο κύκλος των ξανθοφυλλών

Η ασφαλής χρήση της ηλιακής ακτινοβολίας από τα φυτά κατά τη φωτοσύνθεση εξαρτάται από την ικανότητά τους να αποσβένουν με ασφάλεια την πλεονάζουσα απορροφούμενη ενέργεια. Ο πλέον αποτελεσματικός μηχανισμός απόσβεσης της ενέργειας στηρίζεται σε μία ομάδα καροτενοειδών και είναι γνωστή ως ο κύκλος των ξανθοφυλλών (εικόνα 9), που θεωρείται ο σημαντικότερος φωτοπροστατευτικός μηχανισμός από πλευράς ενεργειακής χωρητικότητας και υλοποιείται από την αλληλομετατροπή τριών καροτενοειδών, της βιολαξανθίνης (V), της ανθεραξανθίνης (A) και της ζεαξανθίνης (Z). Τα ένζυμα που καταλύουν την αλληλομετατροπή μεταξύ των τριών μορφών ρυθμίζονται από την τιμή pH του μικροχώρου των θυλακοειδών (Young *et al.*, 1997). Οι ξανθοφύλλες, οι οποίες είναι ενσωματωμένες στα φωτοσυλλεκτικά σύμπλοκα, έχουν ως κύρια λειτουργία να αυξάνουν τη 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 and Adams, 1996). Η εμπλοκή του κύκλου λοιπόν, στην απόσβεση της πλεονάζουσας ενέργειας συνίσταται στην ενζυμική μετατροπή του ανενεργού συστατικού της βιολαξανθίνης σε ζεαξανθίνη και αντίστροφα, μέσω της ενδιάμεσης ανθεραξανθίνης. 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 αποεποξειδάση σε ζεαξανθίνη, ύστερα από την οξίνιση του ενδοθυλακοειδούς χώρου. Τα παραπάνω φαινόμενα έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την κατευθυνόμενη απόσβεση του φθορισμού της χλωροφύλλης (Chen *et al.*, 2011).

## Εισαγωγή

Πιο ειδικά, υπό κανονικές συνθήκες φωτισμού αναπτύσσεται στους χλωροπλάστες μια διαφορά συγκέντρωσης πρωτονίων μεταξύ του στρώματος και του εσωτερικού των θυλακοειδών, που αποτελεί την κινητήρια δύναμη για τις διαδικασίες φωτοφωσφορυλίωσης και την παραγωγή ATP. Ωστόσο, σε συνθήκες φωτοπαρεμπόδισης δημιουργείται πολύ υψηλή  $\Delta pH$  στο εσωτερικό των χλωροπλάστων, η οποία αποτελεί το σήμα κινδύνου που σηματοδοτεί την έναρξη λειτουργίας των προστατευτικών μηχανισμών (Καραμπουρνιώτης, 2003). Έτσι, η έντονη οξίνιση της κοιλότητας των θυλακοειδών προκαλεί την ενεργοποίηση της αποεποξειδάσης της βιολαξανθίνης, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή ζεαξανθίνης. Η μετατροπή αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της δέσμευσης ακτινοβολίας από τα συστήματα φωτοσυλλογής (LHC) και στην επακόλουθη διάχυση της ενέργειας (Demmig-Adams and Adams, 1996). Συμπερασματικά, ο τρόπος λειτουργίας του κύκλου των ξανθοφυλλών συνίσταται στην μεταφορά της ενέργειας διέγερσης της χλωροφύλλης στη ζεαξανθίνη, η οποία στη συνέχεια αποδιεγείρεται αποσβένοντας με ασφάλεια την ενέργεια υπό μορφή θερμότητας. Η ενεργειακή αυτή σύνδεση μεταξύ ζεαξανθίνης και χλωροφύλλης δεν είναι σταθερή αλλά εμφανίζεται όταν υπάρχει πλεόνασμα ενέργειας, ενώ ο βαθμός συμμετοχής της ζεαξανθίνης στη φωτοπροστατευτική διαδικασία εξαρτάται από τη σοβαρότητα της κατάστασης. Η συσσώρευση της ζεαξανθίνης προκαλεί με τη σειρά της αλλαγές στον τρόπο οργάνωσης των τμημάτων της φωτοσυλλεκτικής αντένας, αλλαγές οι οποίες προάγονται και από την χαμηλή τιμή του pH. Έτσι, μεταβάλλεται η διαμόρφωση της αντένας του PS II ή/και των συμπλόκων των χρωστικών-πρωτεϊνών των κέντρων αντίδρασης, προωθώντας την αλληλεπίδραση με τις ξανθοφύλλες και ενεργοποιώντας το NPQ (Gilmore *et al.*, 1995; Niyogi *et al.*, 1998). Υπό χαμηλές εντάσεις φωτισμού ή στο σκοτάδι, η ζεαξανθίνη μετατρέπεται σταδιακά ξανά σε βιολαξανθίνη μέσω του ενζύμου εποξειδάση της ζεαξανθίνης, που ενεργοποιείται σε ουδέτερες τιμές pH και ο βαθμός εμπλοκής του κύκλου μειώνεται (Demmig-Adams and Adams, 1992; Demmig-Adams *et al.*, 1996).

Αξίζει επίσης, να αναφερθεί η υπόθεση που υποστηρίζει ότι εκτός από την τη ζεαξανθίνη, σημαντικό ρόλο στην απόσβεση της πλεονάζουσας ενέργειας παίζει και η ανθεραξανθίνη, καθώς φαίνεται να έχει την ικανότητα να παγιδεύει και να αποσβένει το πλεόνασμα της ενέργειας διέγερσης των συμπλόκων της αντένας του PS II υπό μορφή θερμότητας (Gilmore and Yamamoto, 2001). Τέλος, έχει διαπιστωθεί ότι ο εγκλιματισμός των φυτών σε υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας οδηγεί σε αύξηση του αποθέματος των καροτενοειδών του κύκλου των ξανθοφυλλών στους χλωροπλάστες τους καθώς και αύξηση της ικανότητας απόσβεσης της πλεονάζουσας ενέργειας διέγερσης (Logan *et al.*, 1998).



Εικόνα 9. Φωτοπροστασία της φωτοσυνθετικής συσκευής μέσω του κύκλου των ξανθοφυλλών.

### 1.3.3.3. Εναλλακτικές βιοχημικές οδοί χρήσης της φωτοσυνθετικής ενέργειας (χλωροπλαστική αναπνοή, φωτοαναπνοή, οδός Mehler)

Τα φυτά που υπόκεινται σε μακροχρόνια έκθεση σε υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας, εγκλιματίζονται σε επίπεδο φωτοπροστατευτικών μηχανισμών ώστε να μειώνουν την ενεργειακή πίεση στα φωτοσυστήματα τόσο στο επίπεδο της αντέννας όσο και στο επίπεδο της απόσβεσης του πλεονάσματος της ενέργειας μέσω αύξησης του ρυθμού χρησιμοποίησης της σε εναλλακτικά μονοπάτια διοχέτευσης των ηλεκτρονίων εκ των οποίων τα κυριότερα είναι η χλωροπλαστική αναπνοή, η φωτοαναπνοή και η αντίδραση Mehler (εικόνα 8) (Stroch *et al.*, 2004).

Ο όρος χλωροπλαστική αναπνοή χρησιμοποιείται για να περιγράψει τη δραστηριότητα μίας αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στους χλωροπλάστες, που λειτουργεί γύρω από το PS I και περιλαμβάνει την μεταφορά των ηλεκτρονίων από το NADH ή το NADPH στην πλαστοκινόνη (PQ), μέσω της δραστηριότητας της αφυδρογονάσης του NAD(P)H (NDH), και από εκεί στο O<sub>2</sub>, μέσω της δραστηριότητας της πλαστιδιακής οξειδάσης της κινόλης (PTOX), με τελικό προϊόν το νερό (Benpoun, 2002). Η παρουσία αυξημένων ποσοτήτων των συμπλόκων NDH και PTOX σε φυτά που υπόκεινται σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις, υποδεικνύει πως διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στον εγκλιματισμό τους σε μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες. Παρά το γεγονός ότι δεν έχει αποδειχθεί μία απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων από την NDH προς την PTOX, φαίνεται ότι αυτά τα σύμπλοκα συνεργάζονται στενά για να βελτιστοποιήσουν την αποτελεσματικότητα της κυκλικής ροής ηλεκτρονίων (Rumeau *et al.*, 2007). Συγκεκριμένα, όταν τα φυτά βρίσκονται σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. έντονη ακτινοβολία, υψηλή θερμοκρασία κ.λπ.), αυξάνεται η ζήτηση για ATP η οποία μπορεί να καλυφθεί από την παραγωγή μέσω της κυκλικής ροής ηλεκτρονίων στο PS I. Το σύμπλοκο NDH, διαμέσου της εμπλοκής του στη ροή αυτή, είτε άμεσα με την παροχή μίας οδού μεταφοράς ηλεκτρονίων είτε έμμεσα με την κατάλληλη οξειδοαναγωγική αντιστάθμιση της ενδοσυστηματικής αλυσίδας μεταφοράς

## Εισαγωγή

ηλεκτρονίων ώστε να καταστεί δυνατή η μέσω της φερρεδοξίνης κυκλική μεταφορά ηλεκτρονίων, πιθανόν συμμετέχει στη διάχυση της ενέργειας και την παροχή ATP (Nixon, 2000). Η PTOX, από την άλλη, φαίνεται πως εμπλέκεται στη διαδικασία σχηματισμού των καρτενοειδών καθώς και στην αποτροπή της παραμονής των δεκτών των ηλεκτρονίων του PS I στην ανηγμένη κατάσταση με αποτέλεσμα να προστατεύεται η φωτοσυνθετική συσκευή από βλάβη και κατ' επέκταση από φωτοαναστολή. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα καρτενοειδή βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών του PS II από έντονη ακτινοβολία, οδηγεί στην υπόθεση πως αυτό το σύμπλοκο λειτουργεί ως βαλβίδα ασφαλείας στις περιπτώσεις υπερσυσσώρευσης ενέργειας κατά τη φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων (Rumeau *et al.*, 2007). Μία τελευταία λειτουργία στην οποία ενδέχεται να εμπλέκεται η χλωροπλαστική αναπνοή είναι η αποτοξίνωση των ενεργών μορφών οξυγόνου που παράγονται στους χλωροπλάστες σε συνθήκες έντονης ακτινοβολίας χάρη στην κατανάλωση  $O_2$ , η οποία οδηγεί σε μείωση του ρυθμού παραγωγής  $H_2O_2$  λόγω μείωσης της συγκέντρωσης του  $O_2$  στο μικροπεριβάλλον των θυλακοειδών (Casano *et al.*, 2000). Ωστόσο, η χλωροπλαστική αναπνοή δεν μπορεί να αποτελέσει έναν ανεξάρτητο φωτοπροστατευτικό μηχανισμό, αλλά αποτελεί ένα τμήμα ενός περίπλοκου συνόλου ρυθμίσεων κι αλληλεπιδράσεων που συνεργάζονται για την προστασία των φωτοσυνθετικών οργανισμών από τις κυμαινόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (Field *et al.*, 1998).

Η φωτοαναπνοή ή ο κύκλος C2 είναι συνέπεια του διλειτουργικού χαρακτήρα της Rubisco, που εκτός από τη δράση της ως καρβοξυλάση εμφανίζει και δραστηριότητα οξυγενάσης, δηλαδή μπορεί να χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το  $CO_2$  αλλά και το  $O_2$  αντίστοιχα (Κατινάκης, 2004). Ο όρος φωτοαναπνοή χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα σύνολο βιοχημικών διεργασιών που επάγονται μεν από το φως, εμφανίζουν δε κοινά χαρακτηριστικά με την αναπνοή, καθώς κατά τη διεξαγωγή τους προσλαμβάνεται  $O_2$  και απελευθερώνεται  $CO_2$ . Συγκεκριμένα, οι διεργασίες αυτές πραγματοποιούνται σε τρία διαφορετικά υποκυτταρικά οργανίδια (χλωροπλάστες, μιτοχόνδρια και υπεροξεισώματα) και ξεκινούν με την οξειδωση της RuBP και την παραγωγή γλυκολικού οξέος και 3-φωσφορογλυκερινικού οξέος (3-PGA), εκ των οποίων το τελευταίο ενσωματώνεται στον κύκλο του Calvin. Αποτέλεσμα του μεταβολισμού δύο μορίων γλυκολικού οξέος είναι η πρόσληψη ενός  $O_2$ , η αποβολή ενός  $CO_2$  και η παραγωγή ενός μορίου 3-PGA, που εισέρχεται έπειτα στον κύκλο C3, ενώ παράλληλα καταναλώνεται ένα μόριο  $NADPH_2$  και ένα μόριο ATP (Taiz και Zeiger, 2006). Είναι λοιπόν εμφανές, πως κατά τη φωτοαναπνοή, σε αντίθεση με την καταβολική αναπνοή, όχι μόνο δεν υπάρχει ενεργειακό κέρδος για το κύτταρο υπό μορφή NADH και ATP αλλά δαπανάται ενέργεια για τη φωσφορυλίωση του γλυκολικού οξέος, κάτι που αποτελεί και τη βάση της υπόθεσης ότι ο κύκλος λειτουργεί ως βαλβίδα εκτόνωσης της περίσσειας ενέργειας σε συνθήκες υπερφόρτωσης της φωτοσυνθετικής συσκευής (Αιβαλάκης, κ.ά., 2005). Πιο ειδικά, όταν η παροχή  $CO_2$  είναι περιοριστική για την καρβοξυλίωση της 1,4-διφώσφοροριβουλόζης και τη λειτουργία του κύκλου του Calvin, μειώνεται και η αναγωγική δύναμη του κύκλου αλλά και η

κατανάλωση του ATP. Υπό τις συνθήκες αυτές ευνοούνται η αντίδραση της οξυγενάσης και επομένως η φωτοαναπνοή και αφού καταναλώνουν επίσης ATP και αναγωγική δύναμη, θα ήταν δυνατό να αποτελέσουν μία διέξοδο για τα προϊόντα των φωτεινών αντιδράσεων, προστατεύοντας τη φωτοσυνθετική συσκευή από τον κίνδυνο χρόνιας φωτοαναστολής (Μανέτας, 2005). Η φωτοαναπνοή έχει επίσης συνδεθεί με το μεταβολισμό του αζώτου στα φύλλα. Αξίζει τέλος, ν' αναφερθεί ότι κατά τη φωτοαναπνοή παράγονται μεταβολίτες, όπως η σερίνη και η γλυκίνη, με την τελευταία να χρησιμοποιείται για τη σύνθεση γλουταθειόνης που αποτελεί συστατικό του αντιοξειδωτικού συστήματος των φυτών, οπότε είναι πιθανό η φωτοαναπνοή να συνεισφέρει έμμεσα στην προστασία των φυτών έναντι των οξειδωτικών βλαβών (Wingler *et al.*, 2000).

Η αντίδραση Mehler είναι ένας ακόμα εναλλακτικός τρόπος διοχέτευσης των ηλεκτρονίων προς το οξυγόνο και αντιπροσωπεύει τη φωτοαναγωγή του  $O_2$  σε νερό στο PS I. Σε δυσμενείς συνθήκες φωτισμού, ακόμα και αν η αφομοίωση του  $CO_2$  έχει περιοριστεί ή ανασταλεί, μέσω της αντίδρασης Mehler πραγματοποιείται ροή ηλεκτρονίων διαμέσου της φωτοσυνθετικής μεμβράνης, κάτι που θεωρείται αναγκαία προϋπόθεση για την προστασία των φυτικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, τα ηλεκτρόνια που προέκυψαν κατά το διαχωρισμό των μορίων του νερού στο PS II προωθούνται στο οξυγόνο μέσω του PS I στην αναγωγική πλευρά του οποίου δημιουργούνται ενεργές μορφές οξυγόνου ( $O_2^-$  κι έπειτα  $H_2O_2$ ) εξαιτίας του αρνητικού ηλεκτροχημικού δυναμικού της φερρεδοξίνης (Fd) (Rizhsky *et al.*, 2003). Το  $H_2O_2$  γρήγορα μετατρέπεται σε νερό από τη δράση της υπεροξειδάσης του ασκορβικού οξέος. Επειδή τα ηλεκτρόνια από το νερό στο PS II μεταφέρονται στο οξυγόνο, που τελικά ανάγεται πάλι σε νερό στο PS I, η όλη διαδικασία καλείται και κύκλος νερού-νερού (Makino *et al.*, 2002). Χάρη σε αυτόν, εξουδετερώνονται άμεσα οι ρίζες υπεροξειδίου στη θέση δημιουργίας τους, προτού έλθουν σε επαφή με τα μόρια στόχους και προκαλέσουν βλάβες, ενώ το πρώτο προϊόν της αντίδρασης του  $H_2O_2$  με το ασκορβικό οξύ ανάγεται στη συνέχεια από το PS I με δαπάνη NADPH, με συνέπεια την περαιτέρω ενεργειακή αποφόρτιση του PS I. Έχει διαπιστωθεί επίσης, πως η αντίδραση Mehler-υπεροξειδάσης αναπτύσσει μία διαβάθμιση πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης των θυλακοειδών που προωθεί τη μετατροπή της βιολαξανθίνης σε ζεαξανθίνη και είναι επαρκής για να πρωτονιώσει τις πρωτεΐνες των χλωροφυλλών που βρίσκονται στο μικροχώρο των θυλακοειδών (Demmig-Adams and Adams, 1992). Στην πρωτονιωμένη τους μορφή, οι πρωτεΐνες δεσμεύουν ζεαξανθίνη και υποβάλλονται σε μία τροποποίηση της στερεοδιαμόρφωσής τους η οποία τις μετατρέπει σε παγίδες διάχυσης ενέργειας που ανταγωνίζονται με το κέντρο αντίδρασης του PS II για ενέργεια. Με τον τρόπο αυτό η ενεργειακή πίεση εκτρέπεται από το φωτοσύστημα και το προστατεύει από το κίνδυνο φωτοαναστολής. Τέλος, υπάρχει και ο πιθανός ρόλος της αντίδρασης Mehler ως διαμεσολαβητή της πραγματοποίησης της κυκλικής ροής ηλεκτρονίων κάτω από δυσμενείς συνθήκες. Πιο ειδικά, όταν παρατηρείται μείωση των φορέων ηλεκτρονίων μεταξύ των δύο φωτοσυστημάτων, η κυκλική ροή ηλεκτρονίων αναστέλλεται,

## **Εισαγωγή**

κάτι που δε συμβαίνει με τη γραμμική μεταφορά ηλεκτρονίων προς το οξυγόνο. Μεσολαβώντας στην οξείδωση των ενδοσυστηματικών φορέων ηλεκτρονίων, η αντίδραση Mehler μπορεί να κάνει την κυκλική ροή πιθανή όταν κανένας άλλος δέκτης ηλεκτρονίων δεν είναι διαθέσιμος (Heber, 2002).



## II. Σκοπός της εργασίας

Στη φύση, υπάρχουν φυτά που χαρακτηρίζονται από άτομα με πράσινο ή/και ανθοκυανικό φύλλωμα. Ο συγκεκριμένος φαινότυπος είναι αποτέλεσμα της βιοσύνθεσης και συσσώρευσης ανθοκυανινών στους επιδερμικούς ιστούς ή στα κύτταρα του μεσοφύλλου. Οι πιθανοί φυσιολογικοί και οικολογικοί ρόλοι των ανθοκυανινών των φύλλων δεν είναι πλήρως διευκρινισμένοι και το γεγονός αυτό αντικατοπτρίζεται και στο μεγάλο αριθμό υποθέσεων που υπάρχουν στη βιβλιογραφία, οι οποίες προσπαθούν να δώσουν μια εξήγηση για την παρουσία των χρωστικών αυτών. Μεταξύ των διαφόρων υποθέσεων για τους πιθανούς ρόλους των ανθοκυανινών στα φύλλα, ίσως και η περισσότερο δημοφιλής, αναφέρεται στον πιθανό φωτοπροστατευτικό ρόλο τους. Ο ρόλος αυτός μπορεί να εκπληρωθεί μέσω της αντιοξειδωτικής τους δράσης αλλά κυρίως μέσω της λειτουργίας τους ως οπτικού φίλτρου το οποίο απορροφά φωτόνια που διαφορετικά θα απορροφούσαν οι φωτοσυνθετικές χρωστικές, με αποτέλεσμα να μειώνεται η ενεργειακή πίεση στα φωτοσυστήματα κάτω από υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας (ιδίως όταν αυτές συνυπάρχουν και με άλλους παράγοντες καταπόνησης όπως χαμηλές θερμοκρασίες ή έλλειψη νερού). Λόγω απορρόφησης μέρους της ακτινοβολίας από τα ανθοκυανικά μόρια μειώνεται η πιθανότητα φωτοπαρεμπόδισης.

Ο προαναφερθείς ρόλος των ανθοκυανινών έχει διερευνηθεί αρκετές φορές πειραματικά τα τελευταία χρόνια αλλά με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η επανεξέταση του πιθανού φωτοπροστατευτικού ρόλου των χρωστικών αυτών στα ανθοκυανικά φύλλα του φυτού *Berberis thunbergii*. Για το λόγο αυτό εξετάστηκε ενδελεχώς η επίδραση του επιπέδου συσσώρευσης των ανθοκυανινών στις παραμέτρους απόδοσης της φωτοσυνθετικής συσκευής υπό συνθήκες υψηλής έντασης προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Οι μετρήσεις της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και του φωτοπροστατευτικού δυναμικού πραγματοποιήθηκαν τόσο στο πεδίο όσο και στο εργαστήριο. Οι μετρήσεις που έλαβαν χώρα στο πεδίο αποσκοπούσαν στη διερεύνηση της πιθανής ικανότητας των ανθοκυανινών να επηρεάζουν ορισμένες παραμέτρους έτσι ώστε να παρέχουν κάποιο πλεονέκτημα στα ανθοκυανικά φύλλα υπό πραγματικές συνθήκες. Επιπροσθέτως, ο πιθανός φωτοπροστατευτικός ρόλος των ανθοκυανινών εξετάστηκε σε συνθήκες εργαστηρίου, μέσω πειραματικών χειρισμών που εκθέτουν τα φύλλα σε λευκό και ερυθρό φως ώστε να εξεταστεί ειδικότερα ο ρόλος των ανθοκυανινών ως οπτικών φίλτρων.



### III. Υλικά και Μέθοδοι

#### III.1. Φυτικό υλικό και συνθήκες καλλιέργειας

Ως φυτικό υλικό για την πραγματοποίηση των πειραμάτων επιλέχθηκαν φυτά *Berberis thunbergii* αυτοφυή στο έδαφος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών καθώς και δέκα νεαρά φυτά σε γλάστρες. Η προμήθεια των γλαστρικών φυτών έγινε από εμπορικό φυτώριο και η επιλογή των φαινοτύπων έγινε βάσει της παρουσίας ανθοκυανινών στα φύλλα. Τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε μεγαλύτερες γλάστρες αμέσως μετά την αγορά τους και λιπάνθηκαν. Τοποθετήθηκαν στην ταράτσα του κτιρίου όπου στεγάζεται το εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών και ποτίζονταν κάθε μέρα, νωρίς το πρωί και αργά το απόγευμα, μέσω αυτόματου ποτίσματος.

#### III.2. Εγκλιματισμός των φυτών σε διαφορετικά φωτεινά καθεστώτα

Κατά την εγκατάσταση των γλαστρικών φυτών στην ταράτσα του κτιρίου έλαβε χώρα κι ένας επιπλέον χειρισμός, που αφορούσε στη διαμόρφωση δύο διαφορετικών φωτεινών καθεστώτων για το φωτισμό των φυτών. Συγκεκριμένα, τοποθετήθηκαν πέντε φυτά σε φυσικό φως (100% PAR) και τα υπόλοιπα σε φυσικό φως με δίκτυο σκίασης πράσινου χρώματος, ούτως ώστε να μειωθεί η ένταση της PAR στο ήμισυ (50% PAR). Οι γλάστρες τοποθετήθηκαν σε συγκεκριμένες θέσεις, όπου σημάνθηκε και ο προσανατολισμός τους. Τα φυτά που βρίσκονταν στο φυσικό φως ονομάστηκαν φυτά φωτός (ήλιου, Η) ενώ τα φυτά κάτω από το δίκτυο χαρακτηρίστηκαν φυτά σκιάς (Σ). Στα φυτά σκιάς συνυπήρχαν πράσινα και ανθοκυανιούχα φύλλα ενώ στα φυτά ηλίου μόνο ανθοκυανιούχα φύλλα. Τα αυτοφυή φυτά είχαν αναπτυχθεί κάτω από φυσικό φως και η παρουσία ανθοκυανιούχων και πράσινων φύλλων οφειλόταν στη θέση των φύλλων στην κόμη και στην έκθεσή τους στο ηλιακό φως.

#### III.3. Μελέτη συσσώρευσης ανθοκυανινών μετά από αλλαγή του φωτεινού καθεστώτος

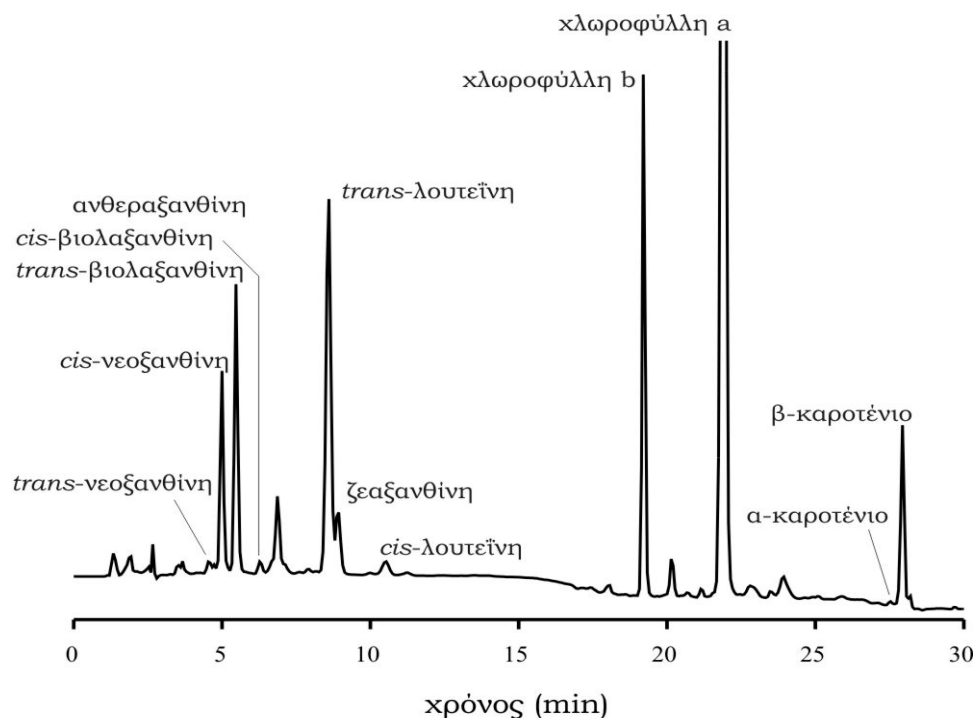
Προκειμένου να μελετηθεί η συσσώρευση των ανθοκυανινών στα φύλλα των φυτών που αναπτύσσονταν κάτω από διαφορετικά φωτεινά καθεστώτα, έγινε λήψη φωτογραφιών συγκεκριμένων φύλλων για την παρατήρηση αλλαγών στο φαινότυπο τους κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν έξι φύλλα ώριμα από κάθε γλάστρα και σημάνθηκαν με ταμπελάκια. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στο γεγονός ότι στα άτομα αυτού του είδους φυτού μπορεί να παρατηρηθεί φύλλωμα πράσινου χρώματος σε όλη την έκταση του ελάσματος, ανθοκυανιούχο φύλλωμα και φύλλωμα με εμφάνιση μωσαϊκού, δηλαδή συνδυασμός πράσινου και ανθοκυανιούχου φαινοτύπου. Επίσης, κάθε φύλλο χαρακτηρίστηκε με βάση τον προσανατολισμό του καθώς και με έναν αριθμό που προσδιορίζει τον αριθμό των επαναλήψεων για κάθε κατηγορία φυτών.

## Υλικά και Μέθοδοι

Ύστερα από την πάροδο έξι ημερών τα σημασμένα φύλλα αποκόπηκαν από τα φυτά και λήφθηκαν ξανά φωτογραφίες τους, οπότε και έγινε σύγκριση με τις αρχικές και αξιολόγηση των τυχόν διαφορών που παρατηρήθηκε στο χρώμα τους.

### III.4. Ανάλυση φωτοσυνθετικών χρωστικών

Για την ανάλυση φωτοσυνθετικών (χλωροφυλλών) και φωτοπροστατευτικών (καροτενοειδών) χρωστικών ελήφθησαν δίσκοι φύλλων και εμβαπτίστηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο. Στη συνέχεια τα δείγματα εκχυλίστηκαν σε μεθανόλη με ίχνη  $\text{CaCO}_3$  (2 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  $6^\circ \text{C}$  με φως ασφαλείας. Το υπερκείμενο επεξεργάστηκε με φίλτρο μεμβράνης MN Chromafil GF-PET 20/25 (Macherey–Nagel, Düren, Germany). Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Darko *et al*, 2000 (εικόνα 10). Οι αναλύσεις έγιναν σε σύστημα Prominence (Shimadzu Co., Tokyo, Japan) εξοπλισμένο με απαερωτή DGU-20A<sub>5</sub>, αντλία LC-20AD, ανιχνευτή UV-Vis συστοιχίας φωτοδιόδων SPD-M20A και θερμοστατούμενο διαμέρισμα στηλών CTO-20A. Όγκος 20 μl δείγματος εγχύθηκε σε στήλη Zorbax Stablebond-C<sub>18</sub>, 5 μm,  $250 \times 4,6$  mm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) και διαχωρίστηκε σε γραμμικό gradient των εξής διαλυτών: A MeCN, B MeOH και C MeCl<sub>2</sub>.



Εικόνα 10. Ενδεικτική χρωματογραφική ανάλυση φωτοσυνθετικών και φωτοπροστατευτικών χρωστικών από φύλλο του φυτού *Berberis thunbergii*.

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  $1 \text{ ml min}^{-1}$  και η ανίχνευση έγινε στα 437 nm. Η ταυτοποίηση των κορυφών έκλυσης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια φασμάτων απορρόφησης (370–800 nm) και σε αναφορά με τους πρωτότυπους συντελεστές χωρητικότητας (Darko *et al.*, 2000).

### **III.5. Μετρήσεις αδρών οπτικών ιδιοτήτων των φύλλων**

Η λήψη των φασμάτων περατότητας και ανάκλασης πραγματοποιήθηκε σε άθικτα φύλλα και από την προσαξονική επιφάνεια με τη βοήθεια φασματοραδιομέτρου συστοιχίας φωτοδιόδων (USB2000+, Ocean Optics Inc., Dunedin, FL, USA) με τη βοήθεια κατάλληλου υποδοχέα φύλλου. Για τη βαθμονόμηση του οργάνου χρησιμοποιήθηκε πρότυπη επιφάνεια σκέδασης Spectralon (ανάκλαση/σκέδαση υψηλότερη του 97%) και τα φάσματα διορθώθηκαν βάσει σκοτεινού φάσματος το οποίο ήταν διορθωμένο για την παράσιτη ακτινοβολία με την πηγή φωτός σβηστή.

### **III.6. Πειράματα φθορισμομετρίας χλωροφύλλης**

Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το φθορισμόμετρο χλωροφύλλης PAM-2100 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). Η πρώτη σειρά πειραμάτων αφορούσε σε σημειακές μετρήσεις λειτουργικών παραμέτρων της φωτοχημείας σε δύο διαφορετικές εντάσεις φωτισμού και με δύο διαφορετικούς χρόνους εγκλιματισμού και πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές περιοχές (ανθοκυανιούχες και μη) των ίδιων φύλλων σε προϋπάρχοντα φυτά στο πεδίο. Η δεύτερη ομάδα πειραμάτων πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της φωτοπεριόδου σε σειρά, με πρώτο την μέτρηση της θεμελιώδους φωτοχημικής ικανότητας του PS II, δεύτερο την ανάλυση απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης μετά την επαγωγή της φωτοσύνθεσης και τρίτο την μελέτη της κινητικής χαλάρωσης στο σκοτάδι και πραγματοποιήθηκαν σε φυτά σε φυτοδοχεία, τα οποία αναπτύσσονταν σε φυσικές συνθήκες φωτισμού.

#### **III.6.1. Μετρήσεις στιγμιαίων παραμέτρων σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού**

Οι παράμετροι που καταγράφηκαν ήταν η θεμελιώδης φωτοχημική ικανότητα του φωτοσυστήματος II σε δείγματα, τα οποία ήταν εγκλιματισμένα στο σκοτάδι ( $\Phi_{PSII_0}$ ) και η φωτοχημική απόδοση του φωτοσυστήματος II κάτω από αυξανόμενες εντάσεις φωτισμού ( $\Phi_{PSII}$ ), η οποία υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Genty *et al.* (1989). Η παράμετρος ETR υπολογίστηκε ως  $ETR = Q \times \Phi_{PSII} \times A \times 0,5$ , όπου Q η ένταση της προσπίπτουσας φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας και A (= 0,84) ο συντελεστής απορροφητικότητας της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Στην εξίσωση θεωρείται ότι ο συντελεστής κατανομής των φωτονίων μεταξύ των δύο φωτοσυστημάτων είναι 0,5. Η παράμετρος μη-φωτοχημικής απόσβεσης κατά Stern-Volmer (NPQ) υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Bilger and Björkman (1990) ως  $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$ . Για την πρώτη ομάδα μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε ο

## Υλικά και Μέθοδοι

υποδοχέας συσκότισης του φύλλου ενώ για την δεύτερη ο ειδικός υποδοχέας 2030-B leaf clip. Για τη λήψη των μετρήσεων υπό συνθήκες φωτός χρησιμοποιήθηκε το λευκό φως της εσωτερικής λάμπας αλογόνου του οργάνου μέτρησης. Η περίοδος εγκλιματισμού στο σκοτάδι ήταν περισσότερο από 20 min ενώ του εγκλιματισμού στις αλλαγές της έντασης της φωτεινής ακτινοβολίας ήταν 2 ή 15 min. Η ακτινοβολία κορεσμού εφαρμόζονταν σε ένταση 15000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  για χρόνο 0,8 s. Σε κάθε περίπτωση, η ένταση της ακτινοβολίας μέτρησης ήταν σταθερή και η ενίσχυση ρυθμιζόταν κατάλληλα ώστε ο φθορισμός να βρίσκεται στα όρια μεταξύ 200-300 της κλίμακας του οργάνου.

### III.6.2. Μετρήσεις καμπυλών επαγωγής και χαλάρωσης στο σκοτάδι

Τα παρακάτω πειράματα πραγματοποιήθηκαν με το πρωτόκολλο μέτρησης των Liakopoulos and Spanorigas (2012).

#### III.6.2.1. Μετρήσεις θεμελιώδους φωτοχημικής ικανότητας του PS II

Για τη μέτρηση της θεμελιώδους φωτοχημικής ικανότητας του PS II ( $\Phi_{\text{PSIIo}}$ ) τα δείγματα προσυσκοτίστηκαν για 30 min με χρήση των υποδοχών συσκότισης του οργάνου μέτρησης. Ακολούθως, εφαρμόστηκε ακτινοβολία μέτρησης (ML, 650 nm, PAR < 0,15  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), η ένταση της οποίας ρυθμίστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του οργάνου μέτρησης. Για τις εντάσεις της ML οι οποίες εφαρμόστηκαν δεν παρατηρήθηκε ακτινικό αποτέλεσμα βάσει της παρακολούθησης της σταθερότητας της έντασης του φθορισμού βάσης ( $F_o$ , *εικόνα 11*) (Logan *et al.*, 2007). Ο φθορισμός βάσης καταγράφηκε τρεις φορές αρχικά και τρεις φορές μετά την εφαρμογή σκοτεινού ερυθρού φωτός (FR, 10 s, 730 nm, E < 15  $\text{W m}^{-2}$ ). Από τις έξι τιμές  $F_o$  επιλέχθηκε για τους υπολογισμούς η μικρότερη τιμή. Ακολούθως εφαρμόστηκε παλμός κορεσμού (SP, 0,8 s, λευκό φως, PAR 15000  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) για την καταγραφή του μέγιστου φθορισμού ( $F_m$ , *εικόνα 11*). Η  $\Phi_{\text{PSIIo}}$  υπολογίστηκε ως  $F_v / F_m$  όπου  $F_v = F_m - F_o$ .

#### III.6.2.2. Καταγραφή της καμπύλης βραδείας κινητικής επαγωγής φωτοσύνθεσης

Μετά την μέτρηση της  $\Phi_{\text{PSIIo}}$  εφαρμόστηκε ακτινικό φως (AL, λευκό φως, PAR 1600  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) για χρονικό διάστημα 14 min στη διάρκεια του οποίου εφαρμόζονταν παλμοί κορεσμού (SP, 1,2 s, ανά 30 s, λευκό φως, PAR 15000  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) για τον προσδιορισμό του μέγιστου φθορισμού ( $F'_m$ ). Αμέσως μετά την ακολουθία των παλμών κορεσμού και την παύση του ακτινικού φωτός έγινε προσδιορισμός του φθορισμού βάσης ( $F'_o$ ) χρησιμοποιώντας σκοτεινό ερυθρό φως (FR, 3 s, 730 nm, E < 15  $\text{W m}^{-2}$ , *εικόνα 11*).

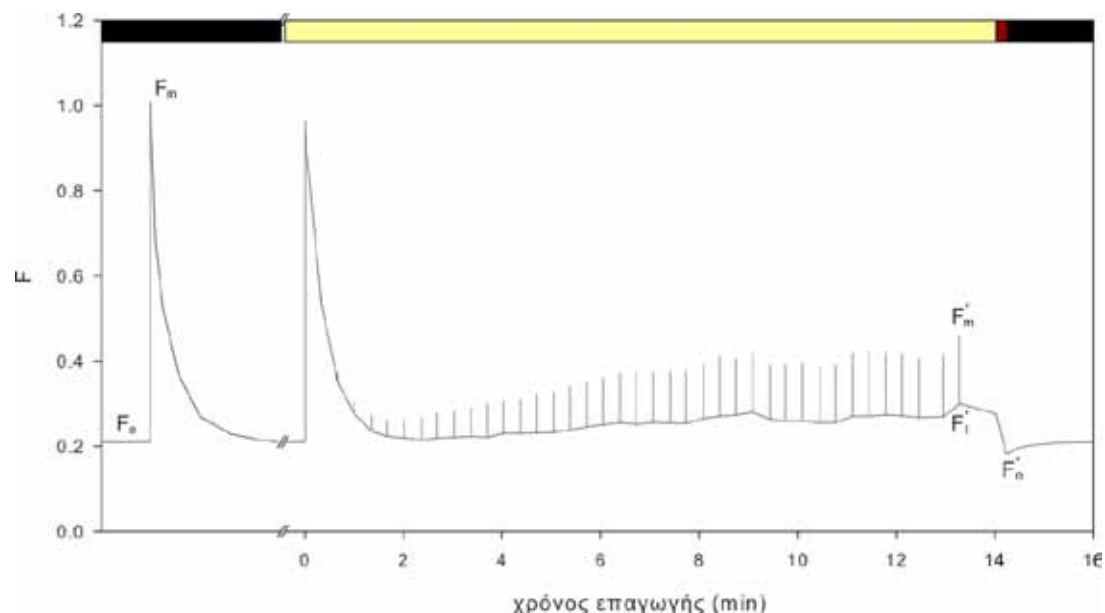
#### III.6.2.3. Καταγραφή της καμπύλης βραδείας κινητικής χαλάρωσης στο σκοτάδι σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες

Για την καταγραφή της κινητικής της απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης στο σκοτάδι το δείγμα φωτίστηκε με όμοια χαρακτηριστικά ακτινοβολίας με αυτά της επαγωγής της φωτοσύνθεσης της αμέσως προηγούμενης ανάλυσης και εφαρμόστηκε ακολουθία παλμών κορεσμού (SP, 1,2 s, σε χρόνους 15, 45, 75, 105 και 135 s, λευκό φως, PAR 15000  $\mu\text{mol}$

quanta  $m^{-2} s^{-1}$ ) ώστε να προσδιοριστεί η παράμετρος  $F'_m$  υπό συνθήκες φωτισμού με σκοπό τον προσδιορισμό του συντελεστή μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης (qN). Αμέσως μετά, το δείγμα παρέμεινε στο σκοτάδι για χρονικό διάστημα 30 min στην αρχή του οποίου εφαρμόστηκε σκοτεινό ερυθρό φως (FR, 3 s, 730 nm,  $E < 15 W m^{-2}$ ) και ακολούθως παλμοί κορεσμού (SP, 1,2 s, σε χρόνους 10, 22, 36, 53, 74, 99, 129, 165, 208, 260, 322, 396, 485, 592, 699, 806, 913, 1020, 1127, 1234, 1341, 1448, 1555 και 1662 s, λευκό φως, PAR 15000  $\mu mol quanta m^{-2} s^{-1}$ ) για τον προσδιορισμό του μέγιστου φθορισμού ( $F'_m$ ). Σε χρόνους 380, 900 και 1646 s καθώς και μετά το πέρας της ακολουθίας των παλμών κορεσμού έγινε προσδιορισμός του φθορισμού βάσης ( $F'_o$ ) χρησιμοποιώντας σκοτεινό ερυθρό φως (FR, 3 s, 730 nm,  $E < 15 W m^{-2}$ ).

#### III.6.2.4. Ανάλυση της καμπύλης βραδείας κινητικής της επαγωγής της φωτοσύνθεσης και υπολογισμός παραμέτρων απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης στο φως

Στην εικόνα 11 φαίνεται μια τυπική καμπύλη βραδείας κινητικής της επαγωγής της φωτοσύνθεσης σε ένα φύλλο *Berberis thunbergii* σε ένταση ακτινικού φωτός 1600  $\mu mol quanta m^{-2} s^{-1}$ . Από την ανάλυση της καμπύλης κινητικής διαπιστώθηκε ότι η σταθερή κατάσταση επιτυγχάνεται σε χρόνο περίπου 10 min. Η  $\Phi_{PSII}$  υπολογίστηκε ως  $\Delta F / F'_m = (F'_m - F'_t) / F'_m$ . Οι συντελεστές φωτοχημικής και μη φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού υπολογίστηκαν ως  $qP = \Delta F / (F'_m - F'_o) = (F'_m - F'_t) / (F'_m - F'_o)$  και  $qN = (F_m - F'_m) / (F_m - F'_o)$  αντίστοιχα. Ο ρυθμός μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού υπολογίστηκε ως  $NQP = (F_m - F'_m) / F'_m$ .



Εικόνα 11. Καταγραφή ελάχιστου φθορισμού βάσης ( $F_o$ ) και απόλυτα μέγιστου φθορισμού ( $F_m$ ) σε φύλλο εγκλιματισμένο στο σκοτάδι και εκτέλεση καμπύλης επαγωγής της φωτοσύνθεσης όπου καταγράφονται ο μέγιστος ( $F'_m$ ), ο σταθερός ( $F'_t$ ) και ο ελάχιστος φθορισμός βάσης ( $F'_o$ ).

**Πίνακας 1.** Παράμετροι κινητικής του φθορισμού χλωροφύλλης, απόσβεσης του φθορισμού της χλωροφύλλης και λειτουργικών χαρακτηριστικών του PSII κατά την ανάλυση των καμπυλών βραδείας κινητικής επαγωγής του φθορισμού στο φως και χαλάρωσης του φθορισμού στο σκοτάδι (Maxwell and Johnson, 2000; Baker, 2008).

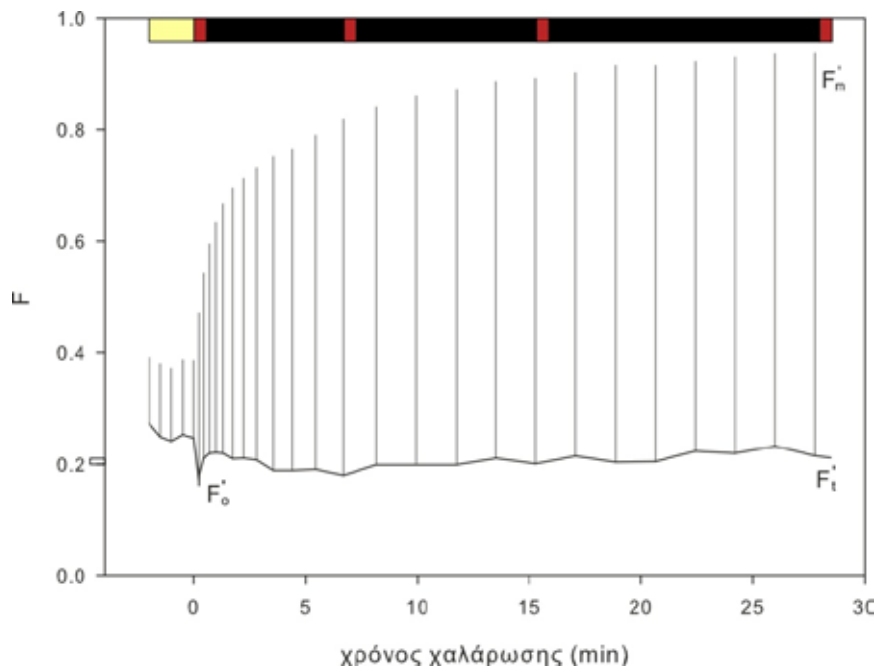
| Συμβολισμός   | υπολογίζεται ως   | ονομασία   | περιγραφή / φυσιολογική σημασία  | συνθήκες φωτισμού κατά την μέτρηση                   |
|---------------|---|--|--|--|
| $F_v, F'$     | -   | απόδοση φθορισμού  | η σχετική ένταση του φθορισμού όπως καταγράφεται από το όργανο μέτρησης  | ML και επιπλέον οποιοδήποτε άλλο είδος ακτινοβολίας  |
| $F_t$         | -   | απόδοση φθορισμού σε σταθερές συνθήκες φωτισμού και φωτοσυνθετικής λειτουργίας του δείγματος | η σχετική ένταση του φθορισμού όπως καταγράφεται από το όργανο μέτρησης σε σταθερές συνθήκες φωτισμού και φωτοσυνθετικής λειτουργίας του δείγματος                     | ML και AL  |
| $F_o$         | -   | ελάχιστος φθορισμός βάσης  | η ελάχιστη σχετική ένταση φθορισμού σε δείγμα εγκλιματισμένο στο σκοτάδι (φωτοχημικά κέντρα PSII ανοικτά)  | ML   |
| $F_m$         | -   | απόλυτα μέγιστος φθορισμός   | η μέγιστη σχετική ένταση φθορισμού σε δείγμα εγκλιματισμένο στο σκοτάδι (φωτοχημικά κέντρα PSII κλειστά)   | ML και SP  |
| $F'_m$        | -   | μέγιστος φθορισμός   | η μέγιστη σχετική ένταση φθορισμού σε δείγμα εγκλιματισμένο στο φως (φωτοχημικά κέντρα PSII κλειστά)   | ML, AL και SP  |
| $F'_o$        | -   | φθορισμός βάσης  | η ελάχιστη σχετική ένταση φθορισμού σε δείγμα εγκλιματισμένο στο φως (φωτοχημικά κέντρα PSII ανοικτά)  | ML (και προαιρετικά FR) αμέσως μετά την παύση του AL |
| $F_v$         | $F_m - F_o$   | μεταβλητός φθορισμός   | διαφορά μεταξύ απόλυτα μέγιστου φθορισμού και ελάχιστου φθορισμού βάσης / μέγιστη απόδοση χρήσης του απορροφημένου φωτός για την διεξαγωγή φωτοχημικών αντιδράσεων     | ML και SP  |
| $\Delta F$    | $F'_m - F_t$  | διαφορά φθορισμού μεταξύ $F'_m$ και $F_t$  | φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού από τα ανοικτά φωτοχημικά κέντρα PS II   | ML, AL και SP  |
| $\Phi_{PSII}$ | $F_v / F_m$   | θεμελιώδης φωτοχημική απόδοση του PS II  | απόλυτα μέγιστη απόδοση χρήσης του απορροφημένου φωτός για την διεξαγωγή φωτοχημικών αντιδράσεων σε δείγμα εγκλιματισμένο στο σκοτάδι (φωτοχημικά κέντρα PSII ανοικτά) | ML και SP  |
| $\Phi_{PSII}$ | $\Delta F / F'_m$   | λειτουργική φωτοχημική απόδοση του PS II   | λειτουργική απόδοση χρήσης του απορροφημένου φωτός για την διεξαγωγή φωτοχημικών αντιδράσεων   | ML, AL και SP  |
| qP            | $\Delta F / (F'_m - F'_o)$                                    | συντελεστής φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού  | συντελεστής της λειτουργικής προς την απόλυτα μέγιστη φωτοχημική απόδοση του PS II / ποσοστό ανοικτών φωτοχημικών κέντρων PS II  | ML, AL και SP  |
| NPQ           | $(F_m - F'_m) / F_m$  | ρυθμός μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού  | μη-φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού από $F_m$ σε $F'_m$ / εκτίμηση του ρυθμού θερμικής απόσβεσης της ενέργειας του PS II  | ML, AL και SP  |
| qN            | $(F_m - F'_m) / (F_m - F'_o)$                                 | συντελεστής μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού   | συντελεστής της μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού   | ML, AL και SP  |
| qE            | μετά από επίλυση της βραδείας κινητικής φθορισμού στο σκοτάδι | ενεργειακά εξαρτώμενη συνιστώσα μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού                       | συνιστώσα της μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού οφειλόμενη στην διαφορά χημειοοσμωτικού δυναμικού πρωτονίων   | ML και SP σε διάφορους χρόνους μετά την παύση του AL |
| qI            | μετά από επίλυση της βραδείας κινητικής φθορισμού στο σκοτάδι | φωτοανασταλτική συνιστώσα μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού                             | συνιστώσα της μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού οφειλόμενη στην φωτοαναστολή της φωτοχημείας του PS II  | ML και SP σε διάφορους χρόνους μετά την παύση του AL |
| qT            | μετά από επίλυση της βραδείας κινητικής φθορισμού στο σκοτάδι | μεταβατική συνιστώσα μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού                                  | συνιστώσα της μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού οφειλόμενη σε αλλαγές της φωτοσυλλεκτικής αντένας του PS II   | ML και SP σε διάφορους χρόνους μετά την παύση του AL |



Στον πίνακα 1 συνοψίζονται οι παράμετροι της κινητικής του φθορισμού και οι παράμετροι της ανάλυσης απόσβεσης του φθορισμού που μετρήθηκαν ή υπολογίστηκαν στη διάρκεια των δύο πειραμάτων.

### III.6.2.5. Ανάλυση της καμπύλης βραδείας κινητικής χαλάρωσης και υπολογισμός παραμέτρων απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης.

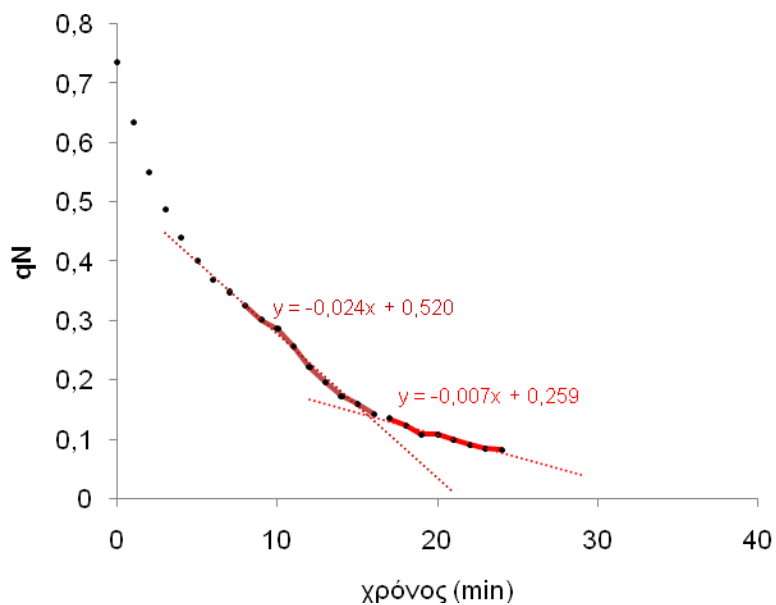
Στην εικόνα 12 φαίνεται μια τυπική καμπύλη βραδείας κινητικής χαλάρωσης σε ένα φύλλο μετά από την παύση της εφαρμογής ακτινικού φωτός έντασης  $1600 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Από την καμπύλη αυτή υπολογίζεται αρχικά η μεταβολή του  $qN$  συναρτήσει του χρόνου (εικόνα 13).



Εικόνα 12. Καταγραφή φθορισμού βάσης ( $F_o'$ ), σταθερού ( $F_t'$ ) και μέγιστου φθορισμού ( $F_m'$ ) σε καμπύλη χαλάρωσης μετά την παύση του ακτινικού φωτός.

Ακολουθώς προσδιορίζονται οι δύο ευθύγραμμες περιοχές της καμπύλης οι οποίες αντιστοιχούν στην μεταβολή με το χρόνο των συνιστωσών  $qT+qI$  και  $qI$  και προσαρμόζονται ευθείες σε αυτές. Από την προβολή των ευθειών προς τον κατακόρυφο άξονα υπολογίζεται η αρχική τιμή για κάθε συνιστώσα. Αρχικά υπολογίζεται η συνιστώσα  $qI$  από την τρίτη περιοχή και ακολούθως η συνιστώσα  $qT+qI$ , δηλαδή ουσιαστικά η συνιστώσα  $qT$ . Τέλος υπολογίζεται η συνιστώσα  $qE$  με αφαίρεση από την αρχική τιμή της  $qN$ .

## Υλικά και Μέθοδοι



Εικόνα 13. Μεταβολή του  $qN$  με το χρόνο χαλάρωσης μετά την παύση ακτινικού φωτός. Στην καμπύλη προσαρμόζονται δύο ευθείες οι οποίες αντιστοιχούν στα εύρη γραμμικής μεταβολής των συνιστωσών ( $qT+qI$ , η πρώτη) και ( $qI$ , η δεύτερη). Με προβολή των ευθειών προς τον κατακόρυφο άξονα μπορεί να υπολογιστεί η αρχική τιμή των συνιστωσών.

## IV. Αποτελέσματα

### IV.1. Πείραμα με φυτά πεδίου

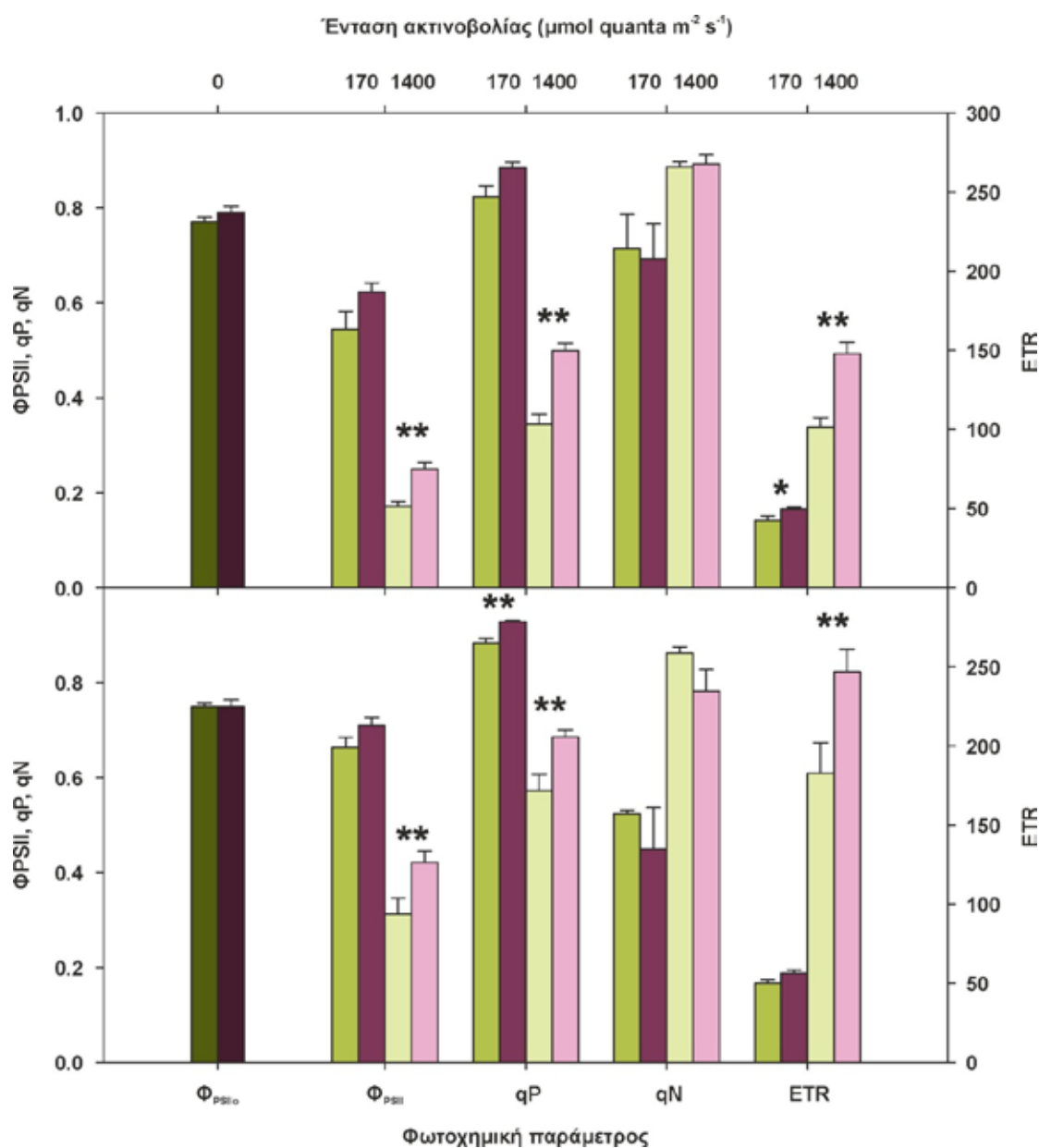
#### *IV.1.1. Μέτρηση φωτοχημικών παραμέτρων του PSII μέσω φθορισμού χλωροφύλλης σε πράσινες και ανθοκυανικές περιοχές του ελάσματος σε δύο διαφορετικές εντάσεις ακτινοβολίας.*

Τα πειράματα αυτής της ενότητας αφορούσαν στην καταγραφή των φωτοχημικών παραμέτρων φύλλων φυτών πεδίου στο έλασμα των οποίων συνυπήρχαν πράσινες και ανθοκυανικές περιοχές. Η μέτρηση περιοχών του ίδιου φύλλου ελαχιστοποιεί τις πιθανές διαφορές μεταξύ πράσινων και ανθοκυανικών δειγμάτων οι οποίες δεν οφείλονται αποκλειστικά στην παρουσία ανθοκυανινών αλλά σε παράγοντες όπως η ηλικία ή το φωτεινό καθεστώς στο οποίο είχε εγκλιματιστεί κάθε δείγμα. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της θεμελιώδους φωτοχημικής ικανότητας ( $\Phi_{PSII_0}$ ), της λειτουργικής φωτοχημικής ικανότητας ( $\Phi_{PSII}$ ), του συντελεστή φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού (qP), του συντελεστή μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού (qN) καθώς και του ρυθμού γραμμικής ροής ηλεκτρονίων (ETR) μεταξύ των δύο δειγμάτων υπό δύο διαφορετικές τιμές έντασης φωτεινής ακτινοβολίας (170 ή 1400  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) και σε χρόνο εγκλιματισμού στο φως 2 ή 15 λεπτά.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 14, οι τιμές της παραμέτρου  $\Phi_{PSII_0}$  δεν διέφεραν μεταξύ ανθοκυανικών και πράσινων περιοχών γεγονός που απομακρύνει το ενδεχόμενο της ενδογενούς παραλλακτικότητας μεταξύ τους. Οι δε τιμές της παραμέτρου βρίσκονται εντός των φυσιολογικών ορίων (0,75-0,80). Κάθε μείωση της μετρούμενης τιμής από τα παραπάνω επίπεδα υποδηλώνει την ύπαρξη βλαβών του PSII λόγω καταπόνησης και ως εκ τούτου δυσλειτουργίες στο επίπεδο της φωτοσύνθεσης. Μετά την επαγωγή της φωτοσύνθεσης, οι τιμές της παραμέτρου  $\Phi_{PSII}$  ήταν ελαφρώς μειωμένες για τις πράσινες περιοχές του ελάσματος συγκριτικά με τις ανθοκυανικές, τόσο στη χαμηλή όσο και στην υψηλή ένταση ακτινοβολίας. Ωστόσο, μεταξύ των δύο τιμών έντασης οι τιμές διέφεραν σημαντικά, όπως αναμένεται, με τις χαμηλότερες τιμές να σημειώνονται στην υψηλότερη ένταση. Το γεγονός ότι η ανά φωτόνιο απόδοση του PS II μειώνεται όταν αυξάνεται η ένταση της προσπίπτουσας φωτοσυνθετικά ενεργής ακτινοβολίας είναι φυσιολογική αντίδραση του φωτοχημικού μηχανισμού και προκαλείται επειδή στις υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας η ενέργεια που απορροφάται από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές αφενός μειώνει το ποσοστό των ανοικτών κέντρων PSII (όπως φαίνεται και από τις τιμές της παράμετρο qP) και αφετέρου προκαλεί την εμπλοκή φωτοπροστατευτικών μηχανισμών οι οποίοι μειώνουν τη ροή ενέργειας προς τη φωτοχημική αλυσίδα ροής ηλεκτρονίων (όπως φαίνεται και από τις τιμές της παραμέτρου qN). Επίσης, δεδομένου ότι οι ανθοκυανικές περιοχές εμφάνισαν υψηλότερη  $\Phi_{PSII}$  στις υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας, γίνεται φανερό η καλύτερη απόδοση της φωτοχημικής συσκευής στην

## Αποτελέσματα

περίπτωση αυτή συγκριτικά με τις πράσινες περιοχές. Αντίστοιχη με τη μείωση των τιμών της  $\Phi_{PSII}$  ήταν και η μείωση των τιμών του συντελεστή φωτοχημικής απόσβεσης. Αντίθετα με την παράμετρο  $qP$ , οι τιμές του συντελεστή μη-φωτοχημικής απόσβεσης ( $qN$ ) δεν παρουσίασαν μεγάλες διαφορές μεταξύ των δειγματοληπτικών κατηγοριών όσο και μεταξύ των δύο εντάσεων φωτεινής ακτινοβολίας. Τέλος, ο ρυθμός γραμμικής ροής ηλεκτρονίων (ETR) εμφάνισε αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ των δύο τιμών έντασης φωτεινής ακτινοβολίας όσο και στην υψηλή ένταση μεταξύ των πράσινων και ανθοκυανικών περιοχών. Συνοψίζοντας, η παρουσία του ανθοκυανικού φίλτρου στα φύλλα είχε ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της φωτοχημικής απόδοσης, του  $qP$  και του ETR σε υψηλότερα επίπεδα και στις δύο εντάσεις ακτινοβολίας.



Εικόνα 14. Θεμελιώδης φωτοχημική ικανότητα ( $\Phi_{PSI0}$ ), λειτουργική φωτοχημική ικανότητα ( $\Phi_{PSII}$ ), συντελεστής φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού ( $qP$ ), συντελεστής μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού ( $qN$ ) και ρυθμός γραμμικής ροής ηλεκτρονίων (ETR) σε δύο διαφορετικές τιμές έντασης

προσπίπτουσας φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας για τα φύλλα των δύο κατηγοριών του φυτού *Berberis thunbergii*, ύστερα από χρόνο εγκλιματισμού στο φως 2 min (πάνω) ή 15 min (κάτω). Οι τιμές ελήφθησαν από ώριμα φυτά στο έδαφος και αποτελούν μέσο όρο πέντε επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου.

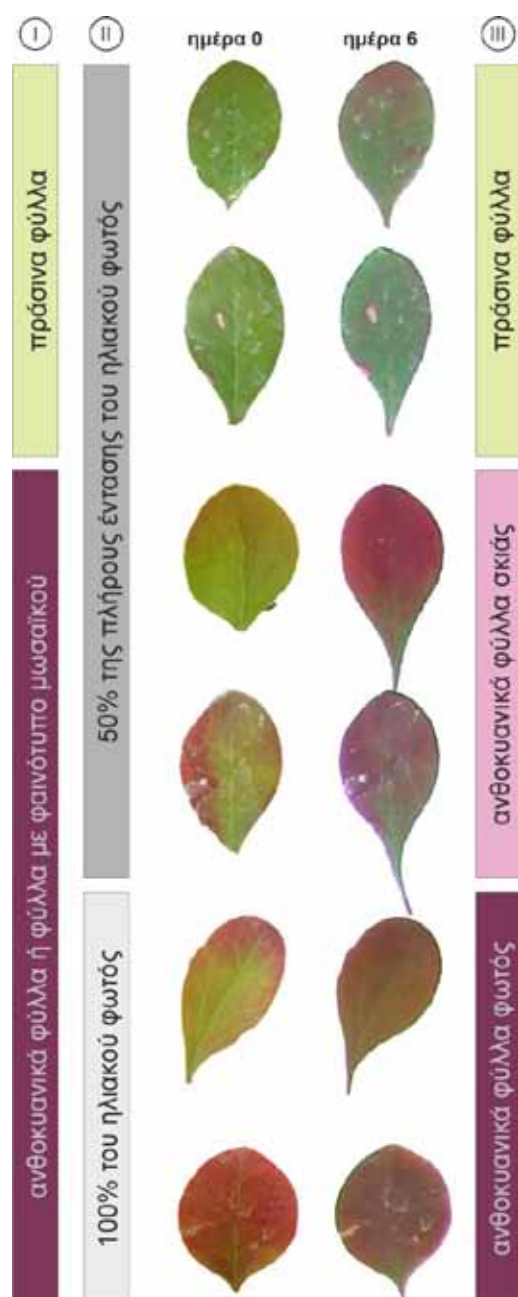
Για χρόνο εγκλιματισμού των φύλλων στο φως ίσο με 15 λεπτά, οι παράμετροι  $\Phi_{PSII}$ , qP και ETR κυμάνθηκαν σε υψηλότερες τιμές και στα δύο είδη περιοχών του ελάσματος δεδομένης της πληρέστερης επαγωγής της φωτοσύνθεσης συγκριτικά με το πείραμα όπου ο χρόνος εγκλιματισμού ήταν 2 λεπτά. Αντίστοιχα, μειωμένες ήταν οι τιμές του qN στον μεγαλύτερο χρόνο εγκλιματισμού. Μικρές διαφορές παρουσιάστηκαν και εδώ μεταξύ πράσινων και ανθοκυανικών περιοχών του ελάσματος ενώ εμφανίστηκαν και διαφορές στην παράμετρο qN όπου τις μικρότερες τιμές έδωσαν οι ανθοκυανικές περιοχές (εικόνα 14).

### **IV.2. Πείραμα φυτών σε φυτοδοχεία υπό δύο διαφορετικά καθεστώτα.**

#### ***IV.2.1. Μελέτη συσσώρευσης ανθοκυανινών σε πράσινα φύλλα μετά την έκθεσή τους στο πλήρες ηλιακό φως.***

Ύστερα από την εγκατάσταση των γλαστρικών φυτών στο χώρο διεξαγωγής των πειραμάτων και την κατανομή τους υπό δύο διαφορετικά φωτεινά καθεστώτα (πλήρης ένταση ηλιακής ακτινοβολίας και σκιά-50% της πλήρους έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας) ελήφθησαν φωτογραφίες σε πράσινα και ανθοκυανικά φύλλα. Στην εικόνα 15 φαίνονται έξι φύλλα την ημέρα της εγκατάστασης (ημέρα 0, δύο πράσινα, τρία με φαινότυπο μωσαϊκού και ένα ανθοκυανικό) και τα ίδια φύλλα έξι ημέρες μετά (ημέρα 6). Τα δύο πράσινα και τα δύο εκ των φύλλων με φαινότυπο μωσαϊκού τοποθετήθηκαν έτσι ώστε να δέχονται το ήμισυ της έντασης της φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας, ενώ τα περισσευούμενα φύλλα τέθηκαν υπό καθεστώς πλήρους έντασης. Μετά το πέρας έξι ημερών, παρατηρήθηκε συσσώρευση ανθοκυανινών στα περισσότερα φύλλα. Όπως είναι προφανές, η συσσώρευση ανθοκυανινών ήταν εντονότερη στα φύλλα που εκτέθηκαν σε πλήρες φως. Η μικρότερη συσσώρευση εμφανίστηκε στα πράσινα φύλλα τα οποία είχαν προφανώς τέτοια γεωμετρική διευσθέτηση ώστε να δέχονται κατά περίπτωση ακόμα λιγότερο φως από τα υπόλοιπα. Επομένως, οι ανθοκυανίνες συσσωρεύονται στα φύλλα του φυτού *Berberis thunbergii* υπό συνθήκες έκθεσης στο ηλιακό φως. Υπό συνθήκες πλήρους έκθεσης σε υψηλές εντάσεις φωτεινής ακτινοβολίας, η συσσώρευσή τους μπορεί να οδηγήσει στην ταχεία μετατροπή του πράσινου φαινοτύπου των φύλλων σε ανθοκυανικό.

## Αποτελέσματα



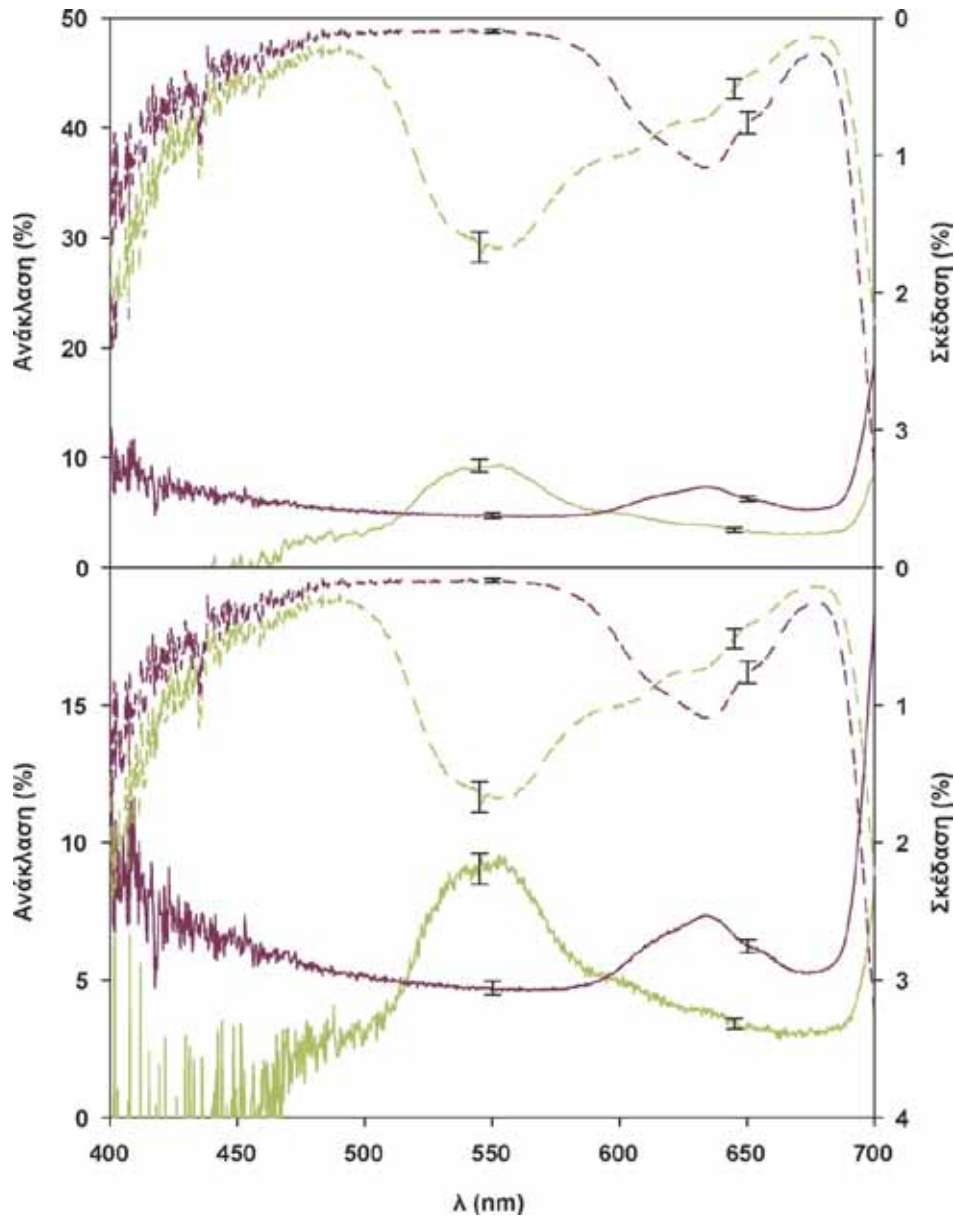
Εικόνα 15. Απεικόνιση της συσώρευσης ανθοκυανινών σε φύλλα του φυτού *Berberis cretica* εγκλιματισμένων στο πλήρες αλλά και στο ήμισυ του ηλιακού φωτός, ύστερα από την πάροδο 6 ημερών.

### *IV.2.2. Μελέτη αδρών οπτικών ιδιοτήτων πράσινων και ανθοκυανικών φύλλων.*

Στην εικόνα 16 παρουσιάζονται τα φάσματα ανάκλασης και περατότητας των φύλλων μετρημένα από την προσαξονική (ορθός προσανατολισμός) ή την αποαξονική πλευρά του ελάσματος. Τα ανθοκυανικά φύλλα εμφανίζουν απόσβεση στα φάσματα ανάκλασης και περατότητας σε μία φασματική περιοχή μήκους περίπου 100 nm με κέντρο τα 560 nm που είναι το μέγιστο απορρόφησης των ανθοκυανικών μορίων. Το γεγονός αυτό συμφωνεί με την υπόθεση ότι η μείωση της φωτοπερατότητας στα ανθοκυανικά φύλλα οφείλεται στην παρουσία ανθοκυανινών στα κύτταρα του μεσοφύλλου καθώς τα μόρια των ανθοκυανινών απορροφούν κυρίως στην πράσινη περιοχή (530-550 nm) και λιγότερο στην κυανή περιοχή

ενώ εμφανίζουν μηδενική απορρόφηση στην ερυθρή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.

Από τα φάσματα ανάκλασης και περατότητας που λήφθηκαν από την αποαξονική επιφάνεια των φύλλων, παρατηρείται μεγάλη ανακλαστικότητα της κάτω επιφάνειας των φύλλων ενώ στην περατότητα οι δύο τύποι φύλλων δεν εμφανίζουν ιδιαίτερες διαφορές.



Εικόνα 16. Φάσματα ανάκλασης και περατότητας της προσαξονικής (πάνω) ή της αποαξονικής (κάτω) επιφάνειας πράσινων και ανθοκυανικών φύλλων του φυτού *Berberis thunbergii* (μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα από πέντε φύλλα).

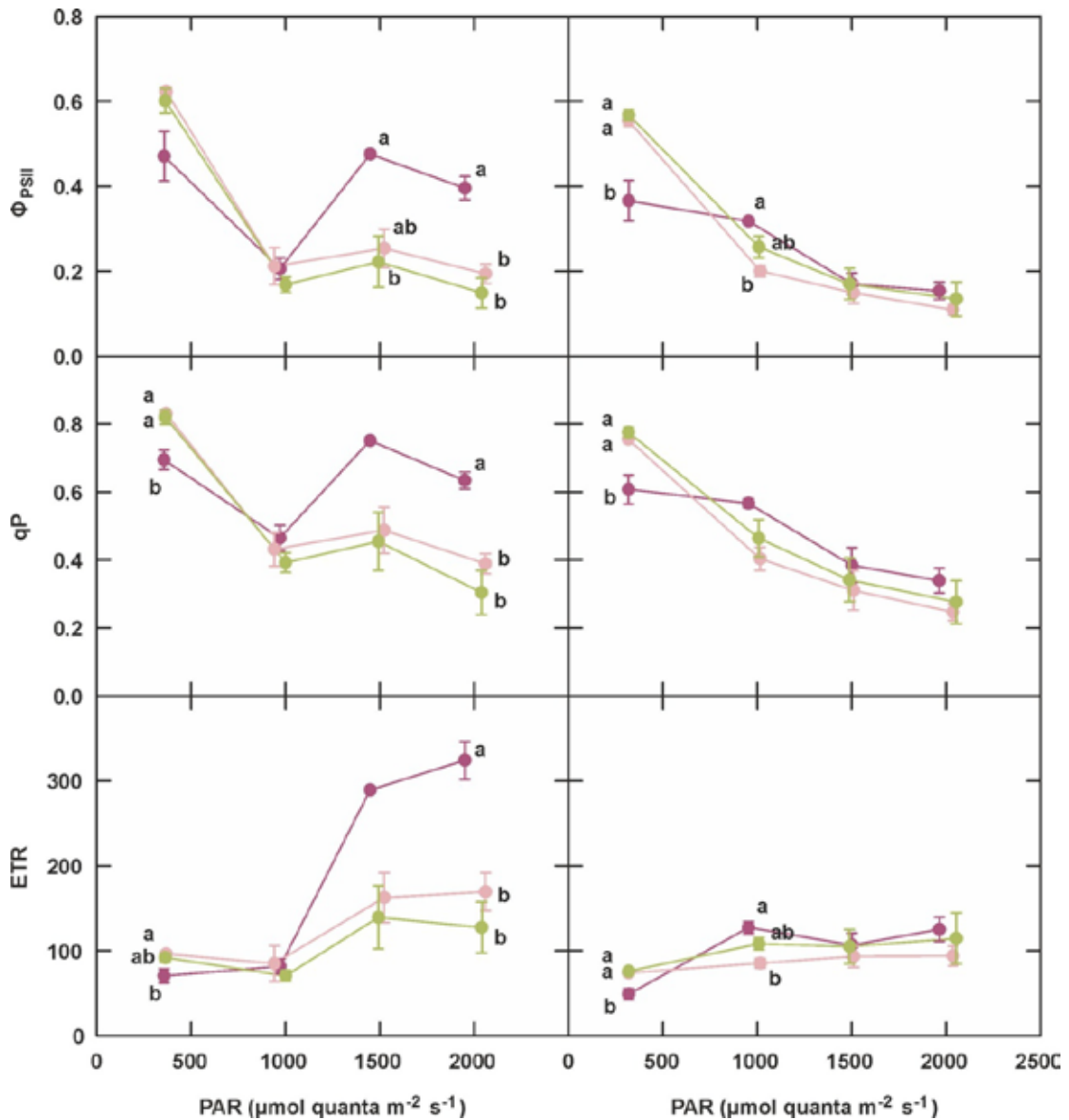
## Αποτελέσματα

### *IV.2.3. Μέτρηση φωτοχημικών παραμέτρων επαγωγής και χαλάρωσης φθορισμού χλωροφύλλης σε πράσινα και ανθοκυανικά φύλλα σε τέσσερις διαφορετικές εντάσεις και δύο διαφορετικές ποιότητες ακτινοβολίας.*

Στην ενότητα αυτή μελετήθηκαν οι φωτοχημικές παράμετροι τριών δειγματοληπτικών κατηγοριών φύλλων (ανθοκυανικών φωτός, ανθοκυανικών σκιάς και πράσινων σκιάς). Σκοπός της ενότητας αυτής ήταν η διάκριση των πιθανών διαφορών των πράσινων και ανθοκυανικών φύλλων κυρίως όσον αφορά στο ρόλο των ανθοκυανινών ως οπτικών φίλτρων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη ακτινικού φωτός διαφορετικής φασματικής σύστασης (λευκό ή ερυθρό). Το ερυθρό φως δεν απορροφάται από τα ανθοκυανικά μόρια σε αντίθεση με το λευκό του οποίου η πράσινη και σε μικρότερο βαθμό η κυανή φασματική περιοχή απορροφώνται από τα ανθοκυανικά μόρια. Έτσι, εάν οι ανθοκυανίνες λειτουργούν ως εκλεκτικά οπτικά φίλτρα μειώνοντας το ποσό της ακτινοβολίας που προσπίπτει στις φωτοσυνθετικές χρωστικές, η παρουσία τους θα πρέπει να έχει αντίκτυπο στις φωτοχημικές παραμέτρους των φύλλων διαφορετικών φαινοτύπων όταν χρησιμοποιείται λευκό φως αλλά όχι όταν χρησιμοποιείται ερυθρό. Με σκοπό την διάκριση μεταξύ διαφορών των φύλλων που οφείλονται στον εγκλιματισμό τους σε διαφορετικά φωτεινά καθεστώτα και διαφορών που οφείλονται αποκλειστικά στην παρουσία ανθοκυανινών, χρησιμοποιήθηκαν δύο κατηγορίες ανθοκυανικών φύλλων, δηλαδή, ανθοκυανικά φύλλα φωτός και ανθοκυανικά φύλλα σκιάς. Μεταξύ τους τα φύλλα σκιάς δεν θα πρέπει να παρουσιάζουν διαφορές που να οφείλονται σε οποιοδήποτε άλλο χαρακτηριστικό παρά μόνο στην παρουσία ή όχι ανθοκυανινών στο έλασμα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, υπό λευκό φως υψηλής έντασης, τα ανθοκυανικά φύλλα φωτός παρουσίασαν υψηλότερη λειτουργική φωτοχημική ικανότητα σε σύγκριση με τα πράσινα φύλλα και τα ανθοκυανικά φύλλα σκιάς τα οποία, επιπρόσθετα, μεταξύ τους δεν εμφάνισαν αξιόλογες διαφορές (*εικόνα 17*). Επίσης, υπό τις συνθήκες αυτές, τα ανθοκυανικά φύλλα φωτός εμφάνισαν μεγαλύτερες τιμές των παραμέτρων ETR, qP και qT υποδηλώνοντας υψηλότερο ρυθμό φωτοχημικής ροής ηλεκτρονίων και χαμηλότερο φωτοκορεσμό, και αντίστοιχα μικρότερες τιμές των παραμέτρων qN, qE και NPQ υποδηλώνοντας χαμηλότερο βαθμό ενεργειακής υπερφόρτωσης και εμπλοκής μηχανισμών μη-φωτοχημικής απόσβεσης (*εικόνα 18*). Σε κάθε περίπτωση, τα φύλλα σκιάς δεν παρουσίασαν διαφορές μεταξύ τους είτε περιείχαν ανθοκυανίνες είτε όχι. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει πως οι διαφορές μεταξύ ανθοκυανικών φύλλων φωτός και των υπολοίπων δύο κατηγοριών φύλλων δεν οφείλονται τόσο στην παρουσία ανθοκυανινών αλλά στο διαφορετικό φωτεινό καθεστώς εγκλιματισμού μεταξύ φύλλων σκιάς και φωτός.



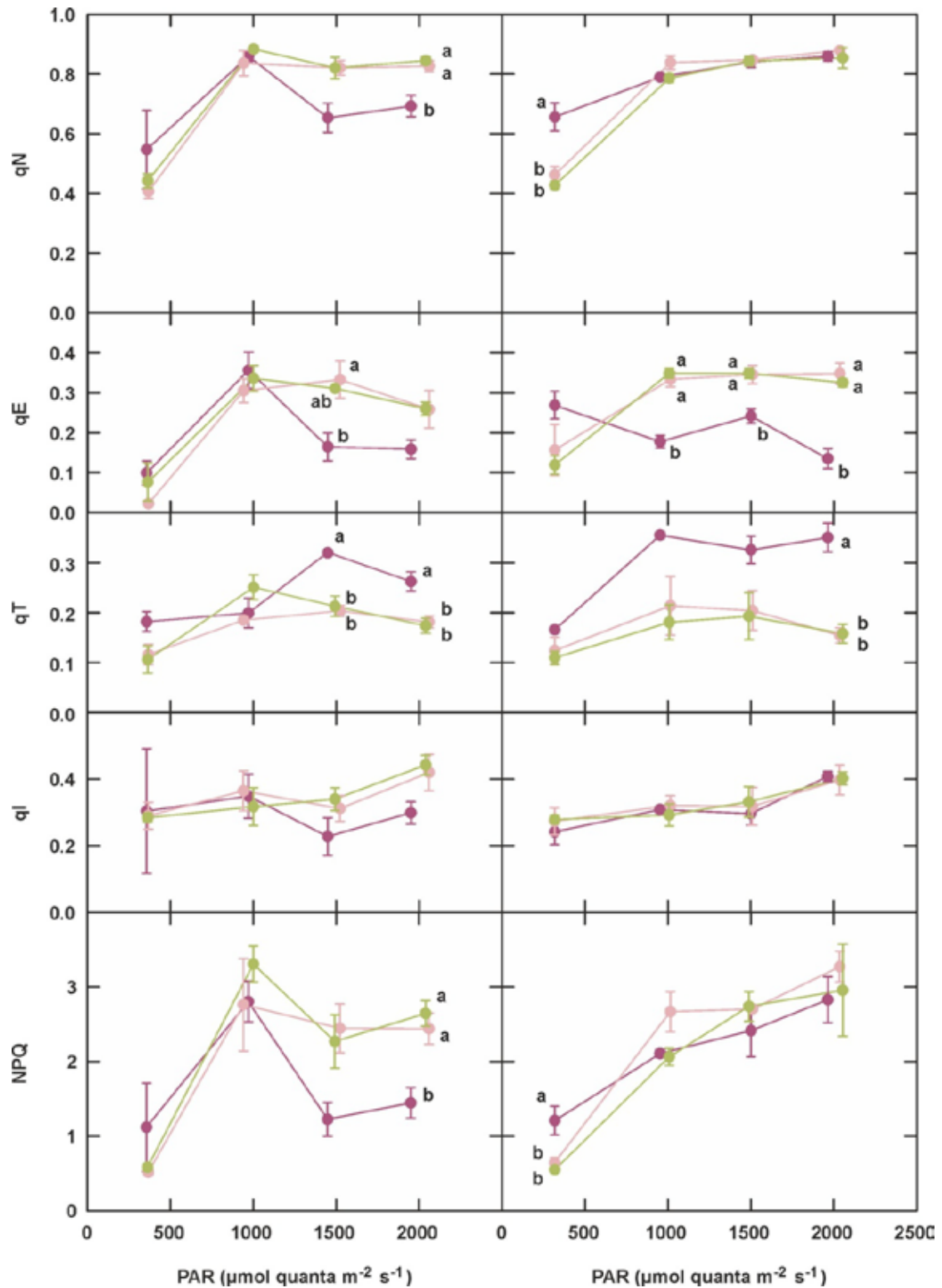


Εικόνα 17. Καμπύλες εξάρτησης της λειτουργικής φωτοχημικής ικανότητας, του συντελεστή φωτοχημικής απόσβεσης και του ρυθμού γραμμικής ροής ηλεκτρονίων από την ένταση της προσπίπτουσας φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας. Με πράσινα σύμβολα παριστάνονται τα πράσινα φύλλα, με ροζ τα ανθοκυανικά φύλλα σιάς και με μωβ τα ανθοκυανικά φύλλα φωτός. Οι τιμές ελήφθησαν από νεαρά φυτά σε γλάστρες και αποτελούν μέσο όρο πέντε επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα του μέσου.

Η επανάληψη των ίδιων μετρήσεων υπό ερυθρό ακτινικό φως είχε ως αποτέλεσμα την απουσία διαφορών όχι μόνο μεταξύ των δύο ειδών φύλλων σιάς αλλά και αυτών με τα ανθοκυανικά φύλλα φωτός. Συγκεκριμένα, τα ανθοκυανικά φύλλα φωτός έδειξαν παρόμοιες τιμές  $\Phi_{PSII}$ , ETR, qP και qN (εικόνες 17 και 18). Ωστόσο, σημειώθηκε διαφορά μεταξύ φύλλων φωτός και φύλλων σιάς στη σύσταση της μη-φωτοχημικής απόσβεσης. Η ανάλυση της καμπύλης κινητικής δίνει τη δυνατότητα υπολογισμού των τριών συνιστωσών του qN, δηλαδή των qE, qT και qI. Γενικά, οι συνιστώσες qE και qT αντιπροσωπεύουν την απόσβεση

## Αποτελέσματα

φθορισμού μέσω φωτοπροστατευτικών μηχανισμών ενώ η παράμετρος  $qI$  περιγράφεται ως μεσοπρόθεσμη απόσβεση του φθορισμού οφειλόμενη σε ελεγχόμενη απόσβεση ή σε συσσώρευση βλάβης από υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας. Μεταξύ των τριών δειγματοληπτικών κατηγοριών, ενώ οι τιμές της  $qN$  ήταν παρόμοιες, τα ανθοκυανικά φύλλα φωτός παρουσίασαν εμφανώς χαμηλότερη  $qE$  και υψηλότερη  $qT$  συγκριτικά με τα ανθοκυανικά και πράσινα φύλλα σκιάς (*εικόνα 18*). Ωστόσο, με εξαίρεση τις διαφορές στη σύσταση του  $qN$ , τα αποτελέσματα της χρήσης ερυθρής ακτινοβολίας συνηγορούν υπέρ της μη επίδρασης του ανθοκυανικού φίλτρου όταν η ακτινοβολία έχει φασματική σύσταση η οποία δεν αλληλεπιδρά με τα ανθοκυανικά μόρια. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο δεδομένου ότι η ερυθρή ακτινοβολία δεν απορροφάται από τις ανθοκυανίνες και ως εκ τούτου διεισδύει στο μεσόφυλλο σε παρόμοιο βαθμό ανεξαρτήτως φαινοτύπου των φύλλων.



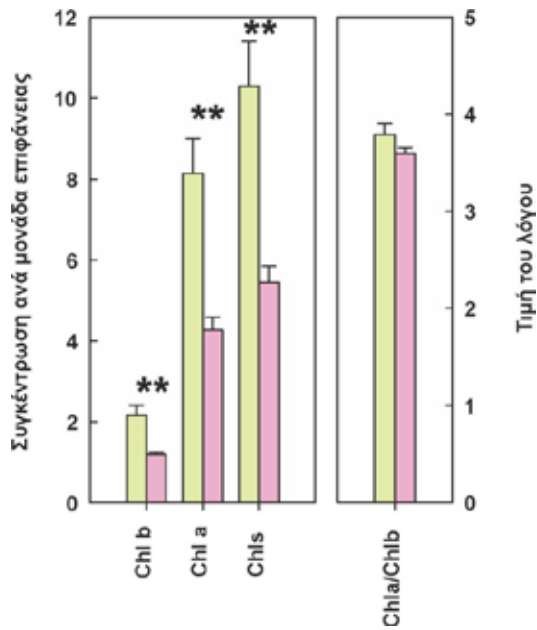
Εικόνα 18. Καμπύλες εξάρτησης του συντελεστή μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού και των συστατικών του ( $qE$ ,  $qT$  και  $qI$ ) και του συντελεστή μη-φωτοχημικής απόσβεσης κατά Stern-Volmer (NPQ) από την ένταση της προσπίπτουσας φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας. Με πράσινα σύμβολα παριστάνονται τα πράσινα φύλλα, με ροζ τα ανθοκυανικά φύλλα σκιάς και με μωβ τα ανθοκυανικά φύλλα φωτός. Οι τιμές ελήφθησαν από νεαρά φυτά σε γλάστρες και αποτελούν μέσο όρο πέντε επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου.

### *IV.2.4. Μέτρηση της σύστασης των χρωστικών και λειτουργίας του κύκλου των ξανθοφυλλών σε πράσινα και ανθοκυανικά φύλλα εγκλιματισμένα στο ήμισυ της πλήρους έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας σύστασης.*

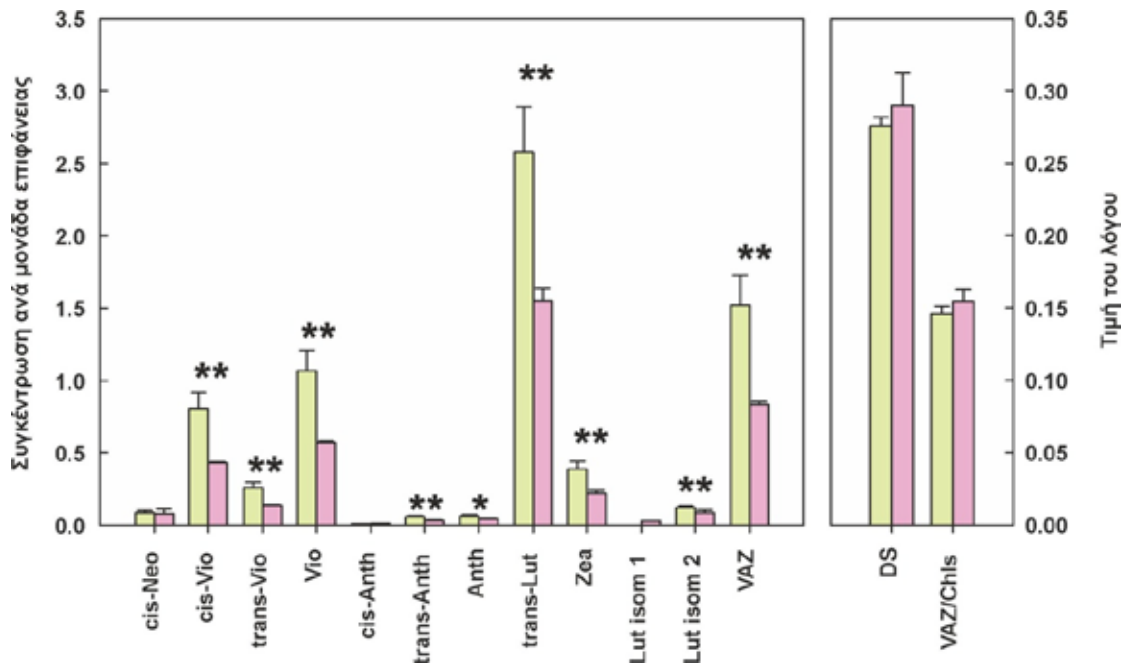
Τα φύλλα εμφανίζουν διαφορές στη σύσταση των φωτοσυνθετικών χρωστικών αναλόγως με το φωτεινό καθεστώς στο οποίο έχουν εγκλιματιστεί. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, εξετάστηκαν φύλλα των δύο διαφορετικών φαινοτύπων που είχαν εγκλιματιστεί σε συνθήκες σκιάς, σε ένταση ίση με το ήμισυ της πλήρους έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας. Ωστόσο, η παρουσία του ανθοκυανικού φίλτρου ενδέχεται να τροποποιεί το φωτεινό μικροπεριβάλλον στο μεσόφυλλο με αποτέλεσμα αλλαγές στη σύσταση των φωτοσυνθετικών χρωστικών. Σκοπός των μετρήσεων αυτών ήταν η σύγκριση της σύστασης των χρωστικών στις παραπάνω δύο κατηγορίες φύλλων και η πιθανή επίδραση του ανθοκυανικού φίλτρου στις αντίστοιχες παραμέτρους.

Τα ανθοκυανικά φύλλα έδειξαν αξιοσημείωτα, έως και 50%, χαμηλότερες, συγκεντρώσεις χλωροφυλλών (εικόνα 19) και καρτενοειδών (εικόνα 20) συγκριτικά με τα πράσινα φύλλα. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως παρά τις διαφορές στις συγκεντρώσεις των χρωστικών, οι δύο κατηγορίες φύλλων δεν έδειξαν διαφορά όσον αφορά στο λόγο των δύο χλωροφυλλών (εικόνα 21). Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει πως δεν υφίστανται διαφορές σε επίπεδο εγκλιματισμού της φωτοσυνθετικής συσκευής στην ακτινοβολία.

Στην εικόνα 20 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των κυριότερων καρτενοειδών των φύλλων ανά μονάδα επιφάνειας. Στα καρτενοειδή που αναλύθηκαν περιλαμβάνονται τα συστατικά του κύκλου των ξανθοφυλλών και διάφορα άλλα συστατικά. Όπως φαίνεται, η συγκέντρωση των καρτενοειδών είναι περίπου διπλάσια στα πράσινα φύλλα συγκριτικά με τα ανθοκυανικά. Οι διαφορές αυτές αφορούν επιπρόσθετα το μέγεθος της δεξαμενής των συστατικών του κύκλου των ξανθοφυλλών (VAZ, εικόνα 20). Παρά τις διαφορές στη συγκέντρωση, ο βαθμός εμπλοκής του κύκλου (πάρμετρος DS) είναι παρόμοιος μεταξύ των δύο κατηγοριών φύλλων. Οι μετρήσεις ελήφθησαν μετά από επαγωγή της φωτοσύνθεσης και σταθεροποίηση των φωτοχημικών παραμέτρων των φύλλων. Επίσης, παρόμοιες είναι οι τιμές του δείκτη VAZ/Chls και στους δύο τύπους φύλλων. Η παράμετρος αυτή υποδηλώνει το βαθμό προστασίας των φωτοσυστημάτων από την υπερβολική ενέργεια της φωτεινής ακτινοβολίας μέσω του συνδυασμού των συστατικών του κύκλου με τη χλωροφύλλη των φωτοσυνθετικών συμπλόκων. Όλα τα παραπάνω υποδηλώνουν πως οι δύο κατηγορίες φύλλων εμφανίζουν περίπου τον ίδιο βαθμό εγκλιματισμού στην υψηλή ακτινοβολία.



Εικόνα 19. Συγκέντρωση χλωροφυλλών (χλωροφύλλης a, χλωροφύλλης b και ολικών χλωροφυλλών) καθώς και ο λόγος των χλωροφυλλών a και b στα φύλλα στις δύο δειγματοληπτικές κατηγορίες. Οι τιμές είναι μέσοι όροι πέντε επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα του μέσου. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους κατά Tukey ( $P < 0.05$ ).



Εικόνα 20. Το σύνολο των συστατικών του κύκλου των ξανθοφυλλών καθώς και το άθροισμα των βασικών συστατικών του (VAZ, βιολαξανθίνη + ανθεραξανθίνη + ζεαξανθίνη) των φύλλων σκιάς του ανθοκυανικού και πράσινου φαινοτύπου. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα από πέντε φύλλα της κάθε κατηγορίας.



## V. Συζήτηση

Διάφορα φυτικά είδη συσσωρεύουν ανθοκυανίνες στα φύλλα, είτε στους επιδερμικούς ιστούς είτε στα κύτταρα του μεσοφύλλου (Gould *et al.* 2002, Steyn *et al.* 2002, Kytridis and Manetas 2006). Συνήθως, η παρουσία των μορίων αυτών είναι παροδική καθώς περιορίζεται τα πολύ νεαρά ή γηρασμένα φύλλα. Συχνά, η συσσώρευση των ανθοκυανινών είναι αποτέλεσμα ενός η περισσότερων παραγόντων καταπόνησης (Steyn *et al.* 2002, Manetas 2006). Σε ορισμένα ωστόσο φυτικά είδη, η παρουσία ανθοκυανικών φύλλων είναι μόνιμος χαρακτήρας ανεξαρτήτως του επιπέδου της καταπόνησης. Συχνά, όπως στα φύλλα του είδους που εξετάστηκε στην παρούσα εργασία, η παρουσία ανθοκυανινών είναι εντονότερη στα φύλλα που είναι εκτεθειμένα στο άπλετο φως. Όλα τα παραπάνω, συντείνουν στην υπόθεση της προστασίας των ανθοκυανικών φύλλων από τις υπερβολικές εντάσεις φωτός καθώς τα μόρια των ανθοκυανινών λειτουργούν ως εκλεκτικά οπτικά φίλτρα. Ως τέτοια, απορροφούν φωτόνια της φωτοσυνθετικά ενεργής περιοχής του φάσματος και έτσι, μειώνουν την ενεργειακή πίεση στα φωτοσυστήματα και συνεπώς την πιθανότητα φωτοπαρεμπόδισης (Steyn *et al.* 2002, Gould *et al.* 2010). Οι ερυθρές ανθοκυανίνες οι οποίες κατά κόρον συσσωρεύονται στα φύλλα απορροφούν σε μια φασματική περιοχή με κέντρο τα 550 nm και πλάτος περίπου 100 nm (Neill and Gould 1999, Merzlyak *et al.* 2008). Σύμφωνα με την υπόθεση του οπτικού φίλτρου, τα φωτόνια που απορροφούνται από τις ανθοκυανίνες δεν συμμετέχουν στη φωτοσυνθετική και ως εκ τούτου δεν προσθέτουν στην ενέργεια που οδεύει στα κέντρα αντίδρασης των δύο φωτοσυστημάτων. Έτσι, οι ανθοκυανίνες ανταγωνίζονται τις χλωροφύλλες για την απορρόφηση ενέργειας της ηλιακής ακτινοβολίας και το τμήμα της ακτινοβολίας που απορροφάται από τις ανθοκυανίνες θεωρείται υπεύθυνο για τη μείωση της ενεργειακής πίεσης στη φωτοσυνθετική συσκευή. Έτσι, οι χλωροπλάστες που βρίσκονται υπό το ανθοκυανικό φίλτρο χαρακτηρίζονται από μικρότερη πιθανότητα φωτοπαρεμπόδισης και συσσώρευσης βλάβης από υπερβολικές εντάσεις ακτινοβολίας (Steyn *et al.* 2002). Ωστόσο, ακριβώς τα παραπάνω φασματικά χαρακτηριστικά αποδυναμώνουν την ισχύ της υπόθεσης της φωτοπροστασίας καθώς η φασματική περιοχή που απεμπλουτίζεται λόγω των ανθοκυανινών δεν είναι ιδιαίτερα φωτοσυνθετικά αποδοτική καθώς οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή των φωτοσυνθετικών συμπλόκων δεν έχουν μέγιστα απορρόφησης στην παραπάνω φασματική περιοχή (Manetas 2006). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, οι πολυάριθμες μελέτες για την πιθανή αύξηση του φωτοπροστατευτικού δυναμικού των ανθοκυανικών φύλλων έχουν έως σήμερα δώσει αντικρουόμενα συμπεράσματα (βλ. Εισαγωγή).

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε διερεύνηση του πιθανού ρόλου των ανθοκυανινών των φύλλων του φυτού *Berberis thunbergii*. Τα φύλλα του συγκεκριμένου φυτού παρουσιάζουν εξαιρετική πλαστικότητα ως προς τον ανθοκυανικό χαρακτήρα. Η συσσώρευση ή η αποδόμηση των ανθοκυανινών ολοκληρώνεται εντός λίγων ημερών και εξαρτάται από το εκάστοτε φωτεινό περιβάλλον. Φύλλα σε καθεστώς μερικής σκίασης ή φύλλα με προσανατολισμό και γεωμετρική διεύθυνση του ελάσματος τέτοια ώστε να δέχονται μέρος

## Συζήτηση

της πλήρους έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας παραμένουν πράσινα ή αποδομούν τις ανθοκυανίνες εάν είναι ερυθρά εντός λίγων ημερών. Αντίθετα, πράσινα φύλλα τα οποία εκτίθενται στο πλήρες ηλιακό φως (για παράδειγμα με περιστροφή του φυτού ή κλάδεμα) συσσωρεύουν ανθοκυανίνες επίσης εντός λίγων ημερών. Σύμφωνα με τα παραπάνω, είναι δυνατή η εύρεση φύλλων των δύο φαινοτυπικών κατηγοριών τα οποία δεν διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό ως προς τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά όπως για παράδειγμα φύλλα τα οποία έχουν εγκλιματιστεί σε ακραίως διαφορετικά φωτεινά καθεστώτα. Επίσης, είναι δυνατή η εύρεση φύλλων τα οποία εμφανίζουν χαρακτηριστικά μωσαϊκού όπου πράσινες και ανθοκυανικές περιοχές συνυπάρχουν στο ίδιο φύλλο. Έτσι, φύλλα ή περιοχές του ίδιου φύλλου μπορούν να συγκριθούν ως προς την ύπαρξη ή μη του ανθοκυανικού φίλτρου έχοντας τις ελάχιστες δυνατές διαφορές ως προς άλλα ανατομικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Φύλλα με εμφάνιση μωσαϊκού έχουν χρησιμοποιηθεί και σε άλλες μελέτες ακριβώς λόγω των παραπάνω επιθυμητών χαρακτηριστικών (Burger and Edwards, 1996; Hughes *et al.*, 2014).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η σύγκριση πράσινων και ανθοκυανικών περιοχών του ίδιου φύλλου ως προς τις κύριες φωτοχημικές παραμέτρους, έδειξε ότι οι ανθοκυανικές περιοχές εμφανίζουν υπεροχή ως προς τη φωτοχημική απόδοση του PSII, το ποσοστό των ανοικτών κέντρων και τη φωτοχημική ροή ηλεκτρονίων, παράγοντες οι οποίοι αυξάνουν τη φωτοσυνθετική απόδοση και μειώνουν την πιθανότητα φωτοπαραμπόδισης. Μάλιστα, οι διαφορές υπέρ των ανθοκυανικών περιοχών ήταν εντονότερες υπό συνθήκες υψηλής έντασης ακτινοβολίας, γεγονός το οποίο έχει ιδιαίτερη σημασία ως προς το φωτοπροστατευτικό δυναμικό του ανθοκυανικού φίλτρου.

Μια βάσιμη κριτική κατά τη σύγκριση πράσινων και ανθοκυανικών φύλλων σε φυτά όπως το *Berberis thunbergii* όπου η συσώρευση των ανθοκυανινών είναι αποτέλεσμα εγκλιματισμού σε διαφορετικά φωτεινά περιβάλλοντα είναι το γεγονός ότι παρά τις ομοιότητές τους, τα φύλλα των δύο κατηγοριών ενδέχεται να διαφέρουν αρκετά σε χαρακτηριστικά τα οποία με τη σειρά τους επηρεάζουν τη φωτοσυνθετική λειτουργία όπως η στοματική λειτουργία, η αντίσταση του μεσοφύλλου στη διάχυση των αερίων, η συγκέντρωση χλωροφυλλών και καροτενοειδών και η σύσταση των φωτοσυνθετικών συμπλόκων. Έτσι, οι παρατηρούμενες διαφορές αποδίδονται στην ύπαρξη του ανθοκυανικού φίλτρου ενώ μέρος των διαφορών θα έπρεπε ενδεχομένως να αποδοθούν σε άλλους παράγοντες. Για την επίλυση αυτού του προβλήματος, επιλέχθηκε η καλλιέργεια φυτών κάτω από δίχτυ σκίασης ώστε ανθοκυανικά και πράσινα φύλλα να συνυπάρχουν στο, κατά το δυνατόν, ίδιο φωτεινό καθεστώς. Παράλληλα, άλλα φυτά καλλιεργήθηκαν στο άπλετο ηλιακό φως και τα (ανθοκυανικά) φύλλα τους συγκρίθηκαν με πράσινα και ανθοκυανικά φύλλα των φυτών υπό μερική σκίαση. Με σκοπό τη διερεύνηση του πιθανού οπτικού ρόλου των ανθοκυανινών, μελετήθηκαν βασικές φωτοχημικές παράμετροι υπό τεχνητό λευκό ή ερυθρό φως. Ενώ μέρος του φάσματος του λευκού φωτός απορροφάται από τις ανθοκυανίνες, το ερυθρό φως δεν



απορροφάται. Συνεπώς, η μελέτη της φωτοσυνθετικής λειτουργίας υπό ερυθρό φως παρακάμπτει τον οπτικό ρόλο του ανθοκυανικού φίλτρου.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, υπό λευκό φως, τα ανθοκυανικά φύλλα φωτός υπερείχαν σε βασικές φωτοχημικές παραμέτρους και συγκεκριμένα στη λειτουργική φωτοχημική ικανότητα του PSII, τον συντελεστή φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού και τον ρυθμό ροής ηλεκτρονίων, ειδικά στις υψηλότερες εντάσεις, από τα 1500  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  και πάνω. Παράλληλα, τα φύλλα φωτός έδειξαν μικρότερες τιμές του συντελεστή μη-φωτοχημικής απόσβεσης ( $q_N$  και NPQ) και, επιμέρους, της συνιστώσας  $q_E$  του  $q_N$  υποδηλώνοντας μικρότερο ποσοστό ενεργειακής περίσσειας συγκριτικά με τα φύλλα σκιάς. Ανάλογα αποτελέσματα σχετικά με την υπεροχή του ανθοκυανικού φαινοτύπου συγκριτικά με τον πράσινο έχουν αναφερθεί σε πλήθος μελετών (Fondom *et al.*, 2014; Hughes *et al.*, 2014; Dewez and Perreault, 2013; Zhang *et al.*, 2010; Steyn *et al.*, 2002). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι τιμές του  $q_T$  κυμάνθηκαν σε υψηλά επίπεδα ειδικά στις υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας και στα ανθοκυανικά φύλλα φωτός γεγονός το οποίο χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Είναι δε αξιοσημείωτο γεγονός καθώς σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η συνιστώσα του  $q_T$  αποσβένεται σημαντικά στις υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας (Krause and Weis, 1991). Ωστόσο, μεταξύ ανθοκυανικών και πράσινων φύλλων σκιάς δεν παρατηρήθηκαν διαφορές σε καμία από τις παραπάνω παραμέτρους. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει πως δεν είναι τόσο το ανθοκυανικό φίλτρο που ευθύνεται για τις παρατηρούμενες διαφορές όσο το διαφορετικό φωτεινό καθεστώς στο οποίο έχουν εγκλιματιστεί τα φύλλα των δύο ομάδων φυτών. Ενδεχομένως, η δυσκολία στην εύρεση φύλλων τα οποία να διαφέρουν μόνο στην ύπαρξη του ανθοκυανικού φίλτρου να συμβάλλει στο πλήθος των αντικρουόμενων αποτελεσμάτων τα οποία έχουν κατά καιρούς δημοσιευτεί σχετικά με τον φωτοπροστατευτικό ρόλο των ανθοκυανικών (Manetas, 2006). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, παρά την όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ομοιομορφία στο φωτεινό καθεστώς μεταξύ ανθοκυανικών και πράσινων φύλλων σκιάς, αυτά εμφάνισαν μεγάλες διαφορές στη συγκέντρωση των χλωροφυλλών και των καροτενοειδών (συμπεριλαμβανομένων αυτών του κύκλου των ξανθοφυλλών). Το εντυπωσιακό σχετικά με τη σύσταση των χρωστικών και τη λειτουργία του κύκλου των ξανθοφυλλών είναι ότι, παρά τις διαφορές στις συγκεντρώσεις τους, οι τιμές του λόγου των δύο χλωροφυλλών, του λόγου των ξανθοφυλλών προς χλωροφύλλες και του συντελεστή αποεποξειδωσης των συστατικών του κύκλου των ξανθοφυλλών (δηλ. του βαθμού εμπλοκής του κύκλου στην απόσβεση της ενέργειας της ακτινοβολίας) ήταν όμοιες μεταξύ των δύο φαινοτύπων. Η ποικιλότητα των δημοσιευμένων στοιχείων σχετικά με τις διαφορές της συγκέντρωσης των χλωροφυλλών και άλλων χρωστικών μεταξύ ανθοκυανικών και πράσινων φύλλων (Nielsen and Simonsen, 2011) αποτελεί μια ακόμα δυσκολία στην ερμηνεία του φωτοπροστατευτικού ρόλου των ανθοκυανικών. Από την άλλη μεριά, ο οπτικός ρόλος των ανθοκυανικών αναμένεται να είναι εντονότερος όταν τα ίδια τα ανθοκυανικά μόρια βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις

## Συζήτηση

(όπως λογικά αναμένεται στα ανθοκυανικά φύλλα φωτός συγκριτικά με τα ανθοκυανικά φύλλα σκιάς). Η παράβλεψη της συμμετοχής της παραμέτρου της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών στις μελέτες του οπτικού ρόλου τους και στο πως αυτός επηρεάζει τη φωτοσυνθετική λειτουργία αποτελεί ένα πρόβλημα το οποίο έχει ήδη επισημανθεί (Manetas and Buschmann, 2011).

Όταν οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν με τη χρήση ερυθρού φωτός, και οι τρεις κατηγορίες φύλλων (ανθοκυανικά φύλλα φωτός και ανθοκυανικά και πράσινα φύλλα σκιάς) έδειξαν παρόμοιες τιμές των βασικών φωτοχημικών παραμέτρων. Η χρήση ερυθρής ακτινοβολίας με σκοπό την παράκαμψη του οπτικού ρόλου των ανθοκυανικών μορίων έχει χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν (Kytridis *et al.*, 2006). Στην παρούσα εργασία, ο παραπάνω χειρισμός παρέχει επιπλέον ενδείξεις για τη δράση των ανθοκυανινών ως οπτικών φίλτρων. Οι οπτικές ιδιότητες των ανθοκυανικών μορίων είναι υπεύθυνες για τουλάχιστον ένα ποσοστό των διαφορών που παρατηρούνται μεταξύ ανθοκυανικών και πράσινων φύλλων υπό συνθήκες λευκού φωτός. Ωστόσο, η απόσβεση των όποιων διαφορών μεταξύ ανθοκυανικών φύλλων φωτός και των φύλλων σκιάς υποδηλώνουν πως ενδεχομένως κάποιος άλλος μηχανισμός (προφανώς ευαίσθητος στη φασματική σύσταση της ακτινοβολίας) μπορεί να συμβάλλει στην εμφάνιση διαφορών στη φωτοσυνθετική λειτουργία των ανθοκυανικών φύλλων. Ένας τέτοιος μηχανισμός θα μπορούσε να είναι η διαφορετική ευαισθησία, εξαρτώμενη παράλληλα από τη φασματική σύσταση της ακτινοβολίας, με την οποία εμπλέκονται οι μη-φωτοχημικοί μηχανισμοί απόσβεσης υπό συνθήκες υψηλών εντάσεων ακτινοβολίας. Άλλος τέτοιος μηχανισμός θα μπορούσε να εμπλέκει τη λειτουργία των στομάτων.

## VI. Βιβλιογραφία

- Baker, N. 2008. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis *in vivo*. *The Annual Review of Plant Physiology*, 59: 89-113.
- Bennoun, P. 2002. The present model for chlororespiration. *Photosynthesis Research*, 73: 273-277.
- Bilger, W. And Björkman, O. 1990. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth Res*, 25: 173-185.
- Burger, J., Edwards, G.E. 1996. Photosynthetic efficiency, and photodamage by UV-B and visible radiation, in red versus green leaf coleus varieties. *Plant and Cell Physiology*, 37(3): 395-399.
- Casano, L., Zapata, J., Martin, M., Sabater, B. 2000. Chlororespiration and poisoning of cyclic electron transport. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 942-948.
- Chen, X., Li, W., Lu, Q., Wen, X., Li, H., Kuang, T., Li, Z., Lu, C. 2011. The xanthophyll cycle and antioxidative defense system are enhanced in the wheat hybrid subjected to high light stress. *Journal of Plant Physiology*, 168: 1828-1836.
- 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. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43: 599-626.
- 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.
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W., Barker, D.H., Logan, B.A., Bowling, D.R., Verhoeven, A.S. 1996. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiologia Plantarum*, 98: 253-264.
- Dewez, D., Perreault, F. 2013. Effect of the anthocyanic epidermal layer on Photosystem II and I energy dissipation processes in *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. *Acta Physiol. Plant.*, 35: 463-472.
- Dodd, I.C., Critchley, C., Woodall, G.S., Stewart, G.R. 1998. Photoinhibition in differently coloured juvenile leaves of *Syzygium* species. *Journal of Experimental Botany*, 49: 1437-1445.
- Field, T., Nedbal, L., Ort, D. 1998. Nonphotochemical reduction of the plastoquinone pool in sunflower leaves originates from chlororespiration. *Plant Physiology*, 116: 1209-1218.
- Fondom, N.Y., Castro-Nava, S., Huerta, A.J. 2014. Field assessment of sub-epidermal leaf anthocyanin, PSII photochemistry, and the xanthophyll-cycle as photoprotective mechanisms in two morphs of *Agave striata*. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 209: 131-141.
- Genty, B., Brintais, J-M, Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta*, 990: 87-92.

## Βιβλιογραφία

- Gilmore, A.M., Hazlett, T.L., Govindjee. 1995. Xanthophyll cycle-dependent quenching of photosystem II chlorophyll a fluorescence: Formation of a quenching complex with a short fluorescence lifetime. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 2273-2277.
- Gilmore, A.M., 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., Dudle, D.A., Neufeld, H.S. 2010. Why some stems are red: cauline anthocyanins shield photosystem II against high light stress. *J. Exp. Bot.*, 61: 2707-2717.
- Gould, K.S., Neill, S.O., Vogelmann, T.C. 2002. A unified explanation for anthocyanins in leaves? *Adv. Bot. Res.*, 37: 167-192.
- Heber, U. 2002. Irrungen, Wirrungen? The Mehler reaction in relation to cyclic electron transport in C3 plants. *Photosynthesis Research*, 73: 223-231.
- Hughes, N.M., Carpenter, K.L., Keidel, T.S., Miller, C.N., Waters, M.N., Smith, W.K. 2014. Photosynthetic costs and benefits of abaxial versus adaxial anthocyanins in *Colocasia esculenta* 'Mojito'. *Planta*, in press.
- Hughes, N.M., Smith, W.K. 2007. Seasonal photosynthesis and anthocyanin production in 10 broadleaf evergreen species. *Functional Plant Biology*, 34: 1072-1079.
- Hughes, N., Vogelmann, T., Smith, W. 2008. Optical effects of abaxial anthocyanin on absorption of red wavelengths by understorey species: revisiting the back-scatter hypothesis. *Journal of Experimental Botany*, 59(12): 3435-3442.
- Jahns, P. and Holzwarth, A.R. 2012. The role of the xanthophyll cycle and lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1817: 182-193.
- Krause, G.H., Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 313-349.
- Kyparissis, A., Grammatikopoulos, G., Manetas, Y. 2007. Leaf morphological and physiological adjustments to the spectrally selective shade imposed by anthocyanins in *Prunus cerasifera*. *Tree Physiology*, 27: 849-857.
- Kytridis, V.-P., Manetas, Y. 2006. Mesophyll versus epidermal anthocyanins as potential in vivo antioxidants: evidence linking the putative antioxidant role to the proximity of oxy-radical source. *Journal of Experimental Botany*, 57: 2203-2210.
- Liakopoulos, G., Nikolopoulos, D., Klouvatou, A., Vekkos, K.-A., Manetas, Y., Karabourniotis, G. 2006. The photoprotective role of epidermal anthocyanins and surface pubescence in young leaves of grapevine (*Vitis vinifera*). *Annals of Botany*, 98: 257-265.
- Liakopoulos, G., Spanorigas, I. 2012. Foliar anthocyanins in *Pelargonium* × *hortorum* are unable to alleviate light stress under photoinhibitory conditions. *Photosynthetica*, 50(2): 254-262.
- Logan, B.A., Adams, W.W., Demmig-Adams, B. 2007. Avoiding common pitfalls of chlorophyll fluorescence analysis under field conditions. *Functional Plant Biology*, 34: 853-859.
- Logan, B.A., Demmig-Adams, B., Adams, W.W., Grace, S.C. 1998. Antioxidants and xanthophyll cycle-dependent energy dissipation in *Cucurbita pepo* L. and *Vinca major* L. acclimated to four growth PPFDs in the field. *Journal of Experimental Botany*, 49(328): 1869-1879.

- Makino, A., Miyake, C., Yokota, A. 2002. Physiological functions of the water-water cycle (Mehler reaction) and the cyclic electron flow around PSI in rice leaves. *Plant Cell Physiology*, 43(9): 1017-1026.
- Manetas, Y., Petropoulou, Y., Psaras, G.K., Drinia, A. 2003. Exposed red (anthocyanic) leaves of *Quercus coccifera* display shade characteristics. *Functional Plant Biology*, 30: 265-270.
- Manetas, Y. 2006. Why some leaves are anthocyanic and why most anthocyanic leaves are red. *Flora*, 201: 163-177.
- Manetas, Y., Buschmann, C. 2011. The interplay of anthocyanin biosynthesis and chlorophyll catabolism in senescing leaves and the question of photosystem II photoprotection. *Photosynthetica*, 49: 515-522.
- Maxwell, K. and Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51: 659-668.
- Merzlyak, M., Chivkunova, O.B., Solovchenko, A.E., Razi Naqvi, K. 2008. Light absorption by anthocyanins in juvenile, stressed and senescing leaves. *Journal of Experimental Botany*, 59(14): 3903-3911.
- Neill, S., Gould, K.S. 1999. Optical properties of leaves in relation to anthocyanin concentration and distribution. *Can. J. Bot.*, 77: 1777-1782.
- Neill, S.O., Gould, K.S. 2003. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? *Functional Plant Biology*, 30: 865-873.
- Nielsen, S.L., Simonsen, A.-M. 2011. Photosynthesis and photoinhibition in two differently coloured varieties of *Oxalis triangularis* - the effect of anthocyanin content. *Photosynthetica*, 49: 346-352.
- Nikiforou, C., Manetas, Y. 2010. Strength of winter leaf redness as an indicator of stress vulnerable individuals in *Pistacia lentiscus*. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 205: 424-427.
- Nixon, P. 2000. Chlororespiration. *The Royal Society*, 355: 1541-1547.
- Niyogi, K.K. 2000. Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 3:455-460.
- Niyogi, K.K., Grossman, A.R., Bjorkman, O. 1998. Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *The Plant Cell*, 10: 1121-1134.
- Rizhsky, L., Liang, H., Mittler, R. 2003. The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 38921-38925.
- Rumeau, D., Peltier, G., Cournac, L. 2007. Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant, Cell and Environment*, 30: 1041-1051.
- Smillie, R.M., Hetherington, S.E. 1999. Photoabatement by anthocyanin shields photosynthetic systems from light stress. *Photosynthetica*, 36: 451-463.
- Solovchenko, A.E. and Merzlyak, M.N. 2008. Screening of visible and UV radiation as a photoprotective mechanism in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55(6): 803-822.
- Steyn, W.J., Wand, S.J.E., Holcroft, D.M., Jacobs, G. 2002. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist*, 155: 349-361.
- Stroch, M., Spunda, V., Kurasova, I. 2004. Non-radiative dissipation of absorbed excitation energy within photosynthetic apparatus of higher plants. *Photosynthetica*, 42(3): 323-337.
- Sun, J., Nishio, J.N., Vogelmann, T.C. 1998. Green light drives CO<sub>2</sub> fixation deep within leaves. *Plant Cell Physiology*, 39(10): 1020-1026.

## Βιβλιογραφία

- Taiz, L. and Zeiger, E. 2006. Plant Physiology, Fourth Edition. *Sinauer Associates. Sunderland, MA.*
- Takahashi, S. and Murata, N. 2008. How do environmental stresses accelerate photoinhibition. *Trends in Plant Science*, 13(4).
- Terashima, I., Fujita, T., Inoue, T., Chow, W.S., Oguchi, R. 2009. Green light drives leaf photosynthesis more efficiently than red light in strong white light: revisiting the enigmatic question of why leaves are green. *Plant Cell Physiology*, 50(4): 684-697.
- Vogelmann, T.C. 1993. Plant tissue optics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 44: 231-251.
- Vogelmann, T.C., Nishio, J.N., Smith, W.K. 1996. Leaves and light capture: light propagation and gradients of carbon fixation within leaves. *Trends in Plant Science*, 1(2).
- Wingler, A., Lea, P.J., Quick, W.P., Leegood, R.C. 2000. Photorespiration: Metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355: 1517-1529.
- Young, A.J., Phillip, D., Ruban, A.V., Horton, P., Frank, H.A. 1997. The xanthophyll cycle and carotenoid-mediated dissipation of excess excitation energy in photosynthesis. *Pure and Applied Chemistry*, 69(10): 2125-2130.
- Zeliou, K., Manetas, Y., Petropoulou, Y. 2009. Transient winter leaf reddening in *Cistus creticus* characterizes weak (stress-sensitive) individuals, yet anthocyanins cannot alleviate the adverse effects on photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 60: 3031-3042.
- Zhang, K.-M., Yu, H.-J., Shi, K., Zhou, Y.-H., Yu, J.-Q., Xia, X.-J. 2010. Photoprotective roles of anthocyanins in *Begonia semperflorens*. *Plant Sci.*, 179: 202-208.
- Αϊβαλάκις, Γ., Καραμπουρνιώτης, Γ., Φασσέας, Κ. 2005. Γενική Βοτανική: Η Μορφολογία, η Ανατομία και η Φυσιολογία των Ανώτερων Φυτών. *Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο.*
- Δροσόπουλος, Ι. 1998. Φυσιολογία Φυτών, Μέρος Ι. *Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.*
- Καραμπουρνιώτης, Γ. 2003. Φυσιολογία Καταπονήσεων των Φυτών. *Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο.*
- Κατινάκης, Π. 2004. Βιοχημεία. *Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο.*
- Μανέτας, Γ. 2005. Φυσιολογία Φυτών. *Αθήνα: Εκδόσεις Ίων.*