

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ**

**ΦΩΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ
ΤΩΝ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ
ΣΤΑ ΦΥΛΛΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ
*BERBERIS CRETICA***

ΑΡΤΕΜΙΣ ΛΑΖΑΡΙΔΟΥ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2007

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

Φωτοπροστατευτικός Ρόλος των Ανθοκυανινών
στα Φύλλα του Φυτού *Berberis cretica*

ΑΡΤΕΜΙΣ ΛΑΖΑΡΙΔΟΥ
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2007

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γεώργιος Καραμπουρνιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής (Επιβλέπων)

Δημήτριος Μπουράνης, Αναπληρωτής Καθηγητής (Μέλος)

Γεώργιος Αϊβαλάκης, Επίκουρος Καθηγητής (Μέλος)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Με αφορμή την ολοκλήρωση της, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Καραμπουρνιώτη Γεώργιο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του θέματος καθώς επίσης και για τη βοήθειά του κατά τη διάρκεια της εργασίας αλλά και για το φιλικό περιβάλλον που δημιούργησε με αποτέλεσμα η κάθε μέρα στον εργαστηριακό χώρο να είναι ευχάριστη.

Στα μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Φασσέα και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γεώργιο Αιβαλάκι θα ήθελα να εκφράσω την εκτίμηση και τις ευχαριστίες μου για τη συμμετοχή τους στην επιτροπή καθώς και για την διόρθωση της μελέτης μου.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά τον Διδάκτορα κ. Γεώργιο Λιακόπουλο για την ουσιαστική του καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας αλλά και για την υπομονή και τη στήριξή του σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπισα.

Επίσης ευχαριστώ τον Διδάκτορα, επιστημονικό μέλος του εργαστηρίου Δημοσθένη Νικολόπουλο για την βοήθεια που μου παρείχε όποτε την χρειάστηκα. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τους φοιτητές του εργαστηρίου για την συνεργασία τους στη διεξαγωγή της εργασίας αλλά και για το ευχάριστο περιβάλλον που δημιούργησαν με το χιούμορ και την καλή τους διάθεση.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αγάπη και στήριξη κατά τη διάρκεια των σπουδών μου και τους φίλους μου κυρίως για την ηθική συμπαράσταση που μου παρείχαν.

I. Φωτοσύνθεση

I.1. Γενικά στοιχεία

Φωτοσύνθεση είναι η διαδικασία μέσω της οποίας οι αυτότροφοι οργανισμοί χρησιμοποιούν ανόργανα συστατικά για να συνθέσουν οργανικές ενώσεις. Για να είναι ενεργειακά δυνατή η παραπάνω διαδικασία απαιτείται ενέργεια η οποία παρέχεται από τη δέσμευση της ενέργειας του ήλιου. Έτσι, προϋπόθεση για την πραγματοποίηση της φωτοσύνθεσης είναι η παρουσία φωτός κατάλληλων μηκών κύματος. Η ακτινοβολία αυτή ονομάζεται φωτοσυνθετικά ενεργός ακτινοβολία (Photosynthetically Active Radiation, PAR) και περιλαμβάνει μήκη κύματος μεταξύ 400 και 700 nm (Taiz και Zeinger, 1998). Η συνοπτική χημική αντίδραση της φωτοσύνθεσης περιλαμβάνει τη μετατροπή του διοξειδίου του άνθρακα και του νερού σε υδατάνθρακες με την ενέργεια της ηλιακής ακτινοβολίας, ενώ παράλληλα εκλύεται μοριακό οξυγόνο ως παραπροϊόν. Οι υδατάνθρακες που σχηματίζονται περιέχουν υψηλότερα ποσά ενέργειας από τα αρχικά υποστρώματα και χρησιμοποιούνται τόσο από τους ίδιους τους αυτότροφους οργανισμούς, οι οποίοι αποτελούν τους παραγωγούς όσο και από τους υπόλοιπους οργανισμούς μέσω της κατανάλωσης φυτικής τροφής. Τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως δομικές μονάδες σε διάφορες αναβολικές αντιδράσεις είτε να παράσχουν μέρος της περιεχόμενης ενέργειάς τους για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του κυττάρου κατά την αναπνευστική λειτουργία όπου ελευθερώνονται ως προϊόντα τα αρχικά υποστρώματα της φωτοσύνθεσης (Hall and Rao, 1999).

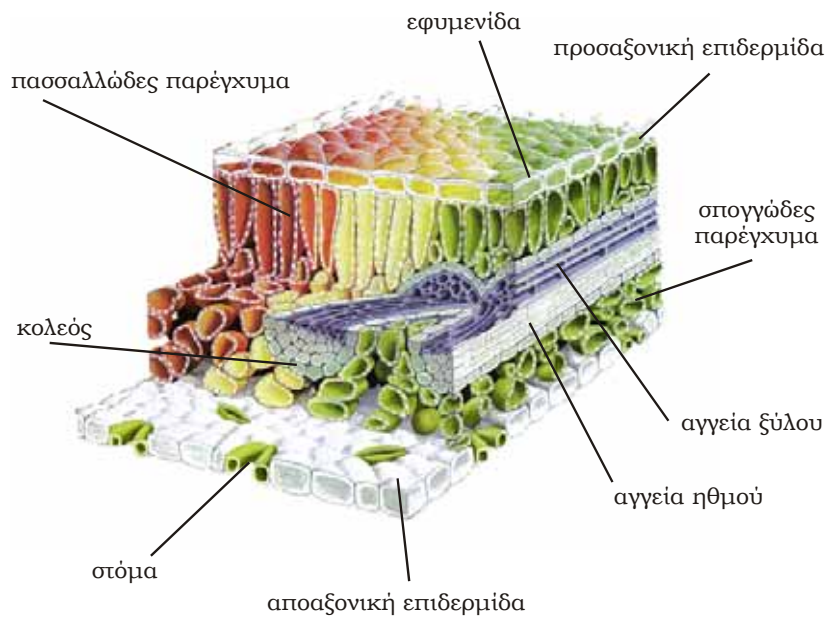
Στα ανώτερα φυτά, οι πιο δραστήριοι φωτοσυνθετικά ιστοί είναι τα φύλλα και ιδιαίτερα οι ανώτερες στοιβάδες κυττάρων του μεσοφύλλου. Τα φωτοσυνθετικά κύτταρα περιλαμβάνουν ένα μεγάλο αριθμό εξειδικευμένων ως προς την επιτέλεση της φωτοσύνθεσης οργανιδίων τα οποία ονομάζονται χλωροπλάστες. Στους

χλωροπλάστες πραγματοποιείται εξ' ολοκλήρου η αλληλουχία των φωτοχημικών και βιοχημικών σταδίων της φωτοσύνθεσης, από την αρχική δέσμευση της ενέργειας της ηλιακής ακτινοβολίας ως την βιοσύνθεση των υδατανθράκων (Hall and Rao, 1999). Η φωτοσύνθεση μπορεί να διακριθεί σε δύο φάσεις. Στην πρώτη φάση διεξάγονται οι φωτεινές αντιδράσεις, οι οποίες πραγματοποιούνται πάνω στις εσωτερικές μεμβράνες των χλωροπλαστών γνωστές ως θυλακοειδή και περιλαμβάνουν την απορρόφηση του φωτός, τη μεταφορά της ενέργειας στα κέντρα αντίδρασης και τις αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων και πρωτονίων οι οποίες οδηγούν στην παραγωγή NADPH και ATP. Στη δεύτερη φάση διεξάγονται οι σκοτεινές αντιδράσεις οι οποίες πραγματοποιούνται στο στρώμα των χλωροπλαστών και δεν απαιτούν άμεσα την παρουσία φωτός. Οι αντιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν την αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα και τη σύνθεση υδατανθράκων, χρησιμοποιώντας το NADPH και το ATP που παράγονται κατά τις φωτεινές αντιδράσεις. Παράλληλα με τις παραπάνω βιοχημικές αντιδράσεις, τα φύλλα διαθέτουν ένα σύνολο από φυσιολογικούς μηχανισμούς και συγκεκριμένα μορφολογικά και ανατομικά χαρακτηριστικά, ώστε η όλη διαδικασία να πραγματοποιείται με τη μέγιστη απόδοση σε επίπεδο οργάνου (Αιβαλάκης κ.α., 2003).

I.1.1. Δομικά χαρακτηριστικά των φύλλων σχετιζόμενα με τη φωτοσύνθεση

Η δομή των φύλλων είναι στενά συνυφασμένη με τη λειτουργία τους. Πρόκειται για ελασματοειδείς κατασκευές, των οποίων η διάταξη και τοποθέτηση στο χώρο στοχεύει στην όσο το δυνατό αποτελεσματικότερη αξιοποίηση των πρώτων υλών της φωτοσύνθεσης, της φωτεινής ακτινοβολίας και του διοξειδίου του άνθρακα της ατμόσφαιρας. Ο στόχος αυτός επιτυγχάνεται με την ανάπτυξη μιας μεγάλης επιφάνειας, αναφορικά με τον όγκο του φύλλου, εκτεθειμένης στις ακτίνες του ήλιου.

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



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της τρισδιάστατης δομής ενός τυπικού φύλλου δικότυλου φυτού C_3 . Διακρίνονται οι κυριότεροι ιστοί.

Η αρχιτεκτονική κατασκευή των φύλλων στοχεύει αφενός μεν στην όσο το δυνατό αποτελεσματικότερη απορρόφηση φωτεινής ακτινοβολίας και αφετέρου στην ευχερέστερη διάχυση του διοξειδίου του άνθρακα προς τα φωτοσυνθετικά κύτταρα. Για το λόγο αυτό τα περισσότερα φύλλα είναι λεπτά, ώστε όλα τα φωτοσυνθετικά κύτταρα να δέχονται ικανή ένταση φωτεινής ακτινοβολίας έχοντας ταυτόχρονα ικανή πρόσβαση στο διοξείδιο του άνθρακα της ατμόσφαιρας (Αιβαλάκης κ.α., 2003).

Η επιδερμίδα λόγω του στρώματος της εφυμενίδας απαρτίζει έναν ιστό αδιαπέραστο στους υδρατμούς, ο οποίος αποτρέπει την εξάτμιση του νερού από το εσωτερικό του φύλλου προς την ατμόσφαιρα. Ταυτόχρονα όμως παρεμποδίζει και την είσοδο του διοξειδίου του άνθρακα στο εσωτερικό του ελάσματος. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος η επιδερμίδα φέρει κατά τόπους, εκτός από τα τυπικά επιδερμικά κύτταρα, ζεύγη ειδικευμένων κυττάρων, τα οποία ονομάζονται καταφρακτικά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά σχηματίζουν πόρους οι οποίοι αναφέρονται ως στόματα. Τα στόματα έχουν τη δυνατότητα του ενεργητικού ανοίγματος και κλεισίματος με

αποτέλεσμα, αφενός να ελέγχονται οι απώλειες νερού και αφετέρου να επιτρέπεται η ανταλλαγή των αερίων μεταξύ μεσοφύλλου και ατμόσφαιρας (Andersson and Barber, 1996).

Το μεσόφυλλο αποτελείται από τα κύτταρα του φωτοσυνθετικού παρεγχύματος, τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και τους στηρικτικούς ιστούς. Τα κύτταρα του φωτοσυνθετικού παρεγχύματος διαθέτουν πολυάριθμους χλωροπλάστες και άφθονους μεσοκυττάριους χώρους, ώστε να διευκολύνεται η ανταλλαγή αερίων (Taiz and Zeiger, 1998). Στα τυπικά φύλλα των δικότυλων το μεσόφυλλο απαρτίζεται από δύο τύπους φωτοσυνθετικού παρεγχύματος, το δρυφρακτοειδές ή πασσαλώδες και το σπογγώδες παρέγχυμα (Taiz and Zeiger, 1998). Τα πασσαλώδη κύτταρα παρουσιάζουν τη μορφή δοκών ή πασσάλων κάθετα προσανατολισμένων στην επιφάνεια του φύλλου. Διατάσσονται σε μία ή περισσότερες επάλληλες στοιβάδες προς την πλευρά της προσοξονικής επιφάνειας. Το σπογγώδες παρέγχυμα αποτελείται από έλοβα συνήθως, ακανόνιστα κύτταρα, με άφθονους μεσοκυττάριους χώρους (Αιβαλάκης κ.α., 2003).

Η επιμήκης κατασκευή των κυττάρων του πασσαλώδους παρεγχύματος, σε συνδυασμό με την τοποθέτηση των χλωροπλαστών στα αντικληνή τοιχώματα, διευκολύνει τη διείσδυση της ακτινοβολίας στο εσωτερικό του μεσοφύλλου. Από την άλλη πλευρά το σχήμα των κυττάρων του σπογγώδους παρεγχύματος ευνοεί την απορρόφηση της φωτεινής ακτινοβολίας, ενώ η αποοξονική επιδερμίδα συμπεριφέρεται ως εσωτερικός ανακλαστήρας που επιστρέφει τα φωτόνια προς το εσωτερικό του μεσοφύλλου. Η τελευταία, επιτρέπει επίσης την αύξηση του πάχους του φύλλου, κυρίως με την αύξηση των στοιβάδων του πασσαλώδους παρεγχύματος, χωρίς να δημιουργούνται σημαντικά προβλήματα φωτισμού στις κατώτερες στοιβάδες των κυττάρων του μεσοφύλλου (Αιβαλάκης κ.α., 2003).

1.2. Λεπτή δομή χλωροπλαστών

Οι χλωροπλάστες αποτελούν μικροσκοπικά υποκυτταρικά οργανίδια με δισκοειδή συνήθως μορφή και διάμετρο συνήθως μεταξύ 3 και 10 μm. Κάθε τυπικό φωτοσυνθετικό κύτταρο του μεσοφύλλου περιέχει 20-60 χλωροπλάστες. Κάθε χλωροπλάστης περιβάλλεται από μία διπλή μεμβράνη, τον φάκελο. Η εξωτερική χλωροπλαστική μεμβράνη είναι διαπερατή στους περισσότερους μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους, ενώ η εσωτερική μεμβράνη είναι επιλεκτικά διαπερατή στις περισσότερες ουσίες. Και τα δύο μεμβρανικά συστήματα του χλωροπλάστη παρουσιάζουν ικανή διαπερατότητα ως προς το διοξείδιο του άνθρακα, που αποτελεί το υπόστρωμα για τη σύνθεση των υδατανθράκων κατά τις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης. Ο χώρος μεταξύ εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης ονομάζεται διαμεμβρανικός χώρος. Το θεμελιώδες υλικό του πλαστιδίου ονομάζεται στρώμα και είναι ένα άμορφο ζελατινοειδές υλικό που περικλείεται στο φάκελο του χλωροπλάστη. Τα περισσότερα ένζυμα που καταλύουν τις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης εντοπίζονται στο στρώμα. Στον χώρο αυτό αναπτύσσεται ένα εκτεταμένο σύστημα μεμβρανών το οποίο αποτελεί συνέχεια της εσωτερικής χλωροπλαστικής μεμβράνης και χαρακτηρίζεται από πολυάριθμες αναδιπλώσεις οι οποίες ονομάζονται ελασμάτια (lamellae). Σε κανονικά διαστήματα, τα ελασμάτια διαπλατώνονται και δημιουργούν μεμβρανώδεις σάκους, τα θυλακοειδή, που οριοθετούν έναν εσωτερικό χώρο, γνωστό ως μικροχώρο (lumen). Κατά τόπους, τα θυλακοειδή οργανώνονται σε μεμβρανικές στιβάδες, οι οποίες καλούνται grana. Στα θυλακοειδή των grana πραγματοποιούνται οι φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης καθώς εκεί εντοπίζονται οργανωμένα τα φωτοσυστήματα. Κάθε φωτοσύστημα, αποτελείται από πρωτεΐνες καθώς και από κύριες και βοηθητικές φωτοσυνθετικές χρωστικές. Υπάρχουν δύο τύποι φωτοσυστημάτων, το φωτοσύστημα I και το φωτοσύστημα II. Τα δύο φωτοσυστήματα λειτουργούν συνεργατικά για την σύλληψη και μετατροπή της φωτονιακής ενέργειας σε

χημική. Κάθε φωτοσύστημα έχει διακριτό ρόλο και ελαφρώς διαφορετικά ενεργειακά χαρακτηριστικά. Έτσι, η οξειδωση του νερού (φωτόλυση), που αποτελεί μια σημαντική φωτοχημική αντίδραση, πραγματοποιείται στο φωτοσύστημα II ενώ η αναγωγή του NADP^+ προϋποθέτει την ροή ηλεκτρονίων μέσω του φωτοσυστήματος I. Επίσης, στο κέντρο κάθε φωτοσυστήματος βρίσκεται στρατηγικά τοποθετημένο ένα μόριο χλωροφύλλης *a* το οποίο εμφανίζει χαρακτηριστικό μέγιστο απορρόφησης της ακτινοβολίας και ονομάζεται φωτοχημικό κέντρο αντίδρασης (P700 με μέγιστο απορρόφησης τα 700 nm για το φωτοσύστημα I και P680 με μέγιστο απορρόφησης τα 680 nm για το φωτοσύστημα II).

I.2.1. Κύριοι βιοχημικοί παράγοντες των χλωροπλαστών

Στους χλωροπλάστες, μόρια των φωτοσυνθετικών χρωστικών είναι βυθισμένα στη διπλοστιβάδα των λιπιδίων των θυλακοειδών και σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες. Τα μόρια αυτά αναφέρονται ως φωτοσυνθετικές χρωστικές καθώς συμμετέχουν στην φωτοσύνθεση, είτε άμεσα απορροφώντας φωτόνια, είτε έμμεσα προστατεύοντας τη φωτοσυνθετική συσκευή. Από την άποψη τόσο της δομής, όσο και του ρόλου τους, οι φωτοσυνθετικές χρωστικές των ανώτερων φυτών κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες, τις χλωροφύλλες (κύριες και βοηθητικές φωτοσυνθετικές χρωστικές) και τα καροτενοειδή (βοηθητικές ή φωτοπροστατευτικές χρωστικές).

Οι χλωροφύλλες είναι οι χρωστικές που δίνουν στους χλωροπλάστες και κατ' επέκταση στα φύλλα, το χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα τους. Το μόριο της χλωροφύλλης αποτελείται από τέσσερις πυρολικούς δακτυλίους οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς άνθρακα-άνθρακα σχηματίζοντας έναν πορφυρινικό δακτύλιο. Ο πορφυρινικός δακτύλιος αποτελεί τη χρωμοφόρο ομάδα του μορίου, πρόκειται δηλαδή για το τμήμα του μορίου που είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση των φωτονίων. Μεταξύ των πυρολικών δακτυλίων III και IV σχηματίζεται ένας πέμπτος δακτύλιος κυκλοπεντανόνης. Τα

άζωτα των πυρολικών δακτυλίων συγκρατούν στο κέντρο του πορφυρινικού δακτυλίου ένα άτομο μαγνησίου. Ο πυρολικός δακτύλιος IV συνδέεται με ένα μόριο με λιπόφιλο χαρακτήρα, τη φυτόλη, η οποία αποτελεί την αλειφατική αλυσίδα του μορίου μέσω της οποίας η χλωροφύλλη προσδένεται στην μεμβράνη του θυλακοειδούς. Στους χλωροπλάστες των ανώτερων φυτών απαντώνται δύο είδη χλωροφυλλών, η χλωροφύλλη *a* και η χλωροφύλλη *b*, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την υποκατάσταση του πυρολικού δακτυλίου II. Τα φάσματα απορρόφησης των χλωροφυλλών παρουσιάζουν μέγιστα στην μπλε και κόκκινη περιοχή του ορατού φάσματος (Αιβλάκις κ.α., 2003).

Τα καροτενοειδή είναι κίτρινες έως ερυθρές χρωστικές, οι οποίες βρίσκονται σε όλα τα φωτοσυνθετικά κύτταρα. Πρόκειται για ευθείας αλυσίδας τετρατερπένια (C_{40}) τα οποία χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη συζυγιακών συστημάτων με κατά εναλλαγή απλούς και διπλούς δεσμούς. Διακρίνονται στους υδρογονάνθρακες (καροτένια) και τα οξυγονωμένα παράγωγά τους (καροτενόλες ή ξανθοφύλλες). Τα καροτενοειδή βρίσκονται συνήθως σε στενή επαφή με τις χλωροφύλλες επιτελώντας κυρίως φωτοπροστατευτικούς ρόλους σε συνθήκες έντονου φωτισμού. Επιπλέον, μέρος της ενέργειας που απορροφάται από τα καροτενοειδή μπορεί να μεταφερθεί στη χλωροφύλλη αυξάνοντας το φωτοσυλλεκτικό δυναμικό της φωτοσυνθετικής συσκευής (Γανωτάκης και Κοτζάμπασης, 2003).

Εκτός από την συμμετοχής τους στα φωτοσυστήματα, οι φωτοσυνθετικές χρωστικές εντοπίζονται και στην συνοδευτική δομή φωτοσυλλογής του κάθε φωτοσυστήματος που ονομάζεται αντέννα φωτοσυλλογής. Η αντέννα φωτοσυλλογής αυξάνει δραματικά το φωτοσυλλεκτικό δυναμικό των φωτοσυστημάτων με αποτέλεσμα η ροή ενέργειας μέσω των τελευταίων καθώς και η φωτοχημική ροή ηλεκτρονίων κατά μήκος της αλληλουχίας των φωτεινών αντιδράσεων να είναι συνεχής.

1.2.2. Οργάνωση των φωτοσυστημάτων στις χλωροπλαστικές μεμβράνες

Τα κέντρα αντίδρασης του φωτοσυστήματος II μαζί με τις χλωροφύλλες των αντεννών φωτοσυλλογής και τις συζευγμένες πρωτεΐνες μεταφοράς ηλεκτρονίων, εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στα θυλακοειδή των grana ενώ οι αντίστοιχες δομές του φωτοσυστήματος I εντοπίζονται σχεδόν αποκλειστικά στα θυλακοειδή του στρώματος και στα άκρα των θυλακοειδών των grana. Στα σημεία αυτά εντοπίζεται και ο παράγοντας σύζευξης, ενζυμικό σύστημα το οποίο είναι υπεύθυνο για την καταλυτική μετατροπή του ADP προς ATP. Η φωτοχημική ροή ηλεκτρονίων λαμβάνει χώρα μεταξύ των δύο φωτοσυστημάτων και συγκεκριμένα με φορά από το φωτοσύστημα II προς το I. Αντίθετα το κυτοχρωμικό σύμπλοκο b_6f , το οποίο αναλαμβάνει την μεταξύ των δύο φωτοσυστημάτων ροή ηλεκτρονίων, είναι ομοιογενώς κατανεμημένο. Έτσι, οι κύριες φωτοχημικές αντιδράσεις οι οποίες προωθούν τη ροή ηλεκτρονίων κατά την αερόβια φωτοσύνθεση είναι χωροταξικά διαχωρισμένες. Αυτός ο διαχωρισμός υποδηλώνει ότι ένας ή περισσότεροι ενδιάμεσοι φορείς ηλεκτρονίων λειτουργούν ως συζεύκτες ανάμεσα στα φωτοσυστήματα και διαχέονται από την περιοχή των grana προς την περιοχή του στρώματος, όπου τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο φωτοσύστημα I.

Ο πιθανός λειτουργικός ρόλος αυτού του διαχωρισμού ανάμεσα στα φωτοσυστήματα I και II, δεν είναι πλήρως διασαφηνισμένος, παρόλο που ορισμένοι ερευνητές πιστεύουν ότι ο διαχωρισμός εμπλέκεται στη ρύθμιση της κατανομής της φωτεινής ενέργειας στα δύο φωτοσυστήματα (Trissl και Wilhelm, 1993).

Επιπλέον, ο χωροταξικός διαχωρισμός ανάμεσα στα φωτοσυστήματα I και II υποδεικνύει ότι δεν απαιτείται μια αυστηρή στοιχειομετρία ένα προς ένα ανάμεσα στα δύο φωτοσυστήματα. Σύμφωνα με μετρήσεις του λόγου των δύο φωτοσυστημάτων, υφίσταται περίσσεια των φωτοσυστημάτων II στους χλωροπλάστες. Συνήθως,

η αναλογία του φωτοσυστήματος II προς το φωτοσύστημα I είναι περίπου 1.5:1. Ωστόσο, ο λόγος δεν είναι σταθερός και μεταβάλλεται ανάλογα με το φωτεινό καθεστώς στο οποίο αναπτύσσονται τα φυτά.

I.3. Φωτοσυνθετική λειτουργία

I.3.1. Οι φωτεινές αντιδράσεις

Οι φωτεινές αντιδράσεις συνιστούν το ένα από τα δύο κύρια στάδια της φωτοσύνθεσης και ευθύνονται για τη συλλογή της φωτονιακής ενέργειας και τη μετατροπή της σε χημική. Λαμβάνουν χώρα στις μεμβράνες των θυλακοειδών και η πραγματοποίησή τους απαιτεί την ύπαρξη φωτός. Η φωτονιακή ενέργεια που συλλέγεται από τα δύο φωτοσυστήματα χρησιμοποιείται για την προώθηση της φωτοχημικής ροής ηλεκτρονίων διαμέσου μιας σειράς οξειδοαναγωγικών ζευγών. Η πλειονότητα των ηλεκτρονίων χρησιμοποιούνται για την αναγωγή του NADP^+ σε NADPH . Ταυτόχρονα, μέσω των φωτοχημικών αντιδράσεων δημιουργείται μια διαφορά ηλεκτροχημικού δυναμικού πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης των θυλακοειδών, η απόσβεση της οποίας παρέχει την απαιτούμενη ενέργεια για την παραγωγή του ATP. Τα δύο υποστρώματα (ATP και NADPH) που παράγονται από τις φωτεινές αντιδράσεις απελευθερώνονται στο χλωροπλαστικό στρώμα ώστε να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση υδατανθράκων (Andersson και Barber, 1996).

I.3.1.1. Φωτοσυλλογή

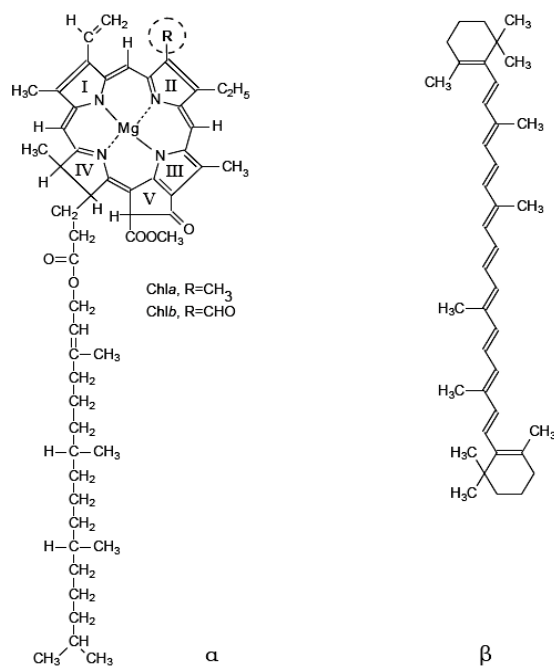
Ο φωτοσυλλεκτικός μηχανισμός κάθε φωτοσυστήματος απαρτίζεται από πολυάριθμα σύμπλοκα πρωτεϊνών και φωτοσυνθετικών χρωστικών (χλωροφύλλες *a* και *b* και καροτενοειδή) τα οποία αναφέρονται ως σύμπλοκα φωτοσυλλογής. Η χλωροφύλλη *a* βρίσκεται στο κέντρο αντίδρασης και των δύο φωτοσυστημάτων καθώς και στις αντέννες φωτοσυλλογής ενώ η χλωροφύλλη *b* απαντάται αποκλειστικά στις αντέννες φωτοσυλλογής. Εκτός από την

απευθείας απορρόφηση φωτονίων από τις χλωροφύλλες των ενεργών κέντρων, φωτόνια απορροφώνται και από τις χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή των αντεννών φωτοσυλλογής. Οι βοηθητικές φωτοσυνθετικές χρωστικές απορροφούν φωτόνια, διεγείρονται και μεταφέρουν τη διέγερση προς το κέντρο αντίδρασης.

Η διέγερση κάθε μορίου φωτοσυνθετικής χρωστικής και τελικά του κέντρου αντίδρασης κάθε φωτοσυστήματος προκαλεί ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις σε υψηλότερη ενεργειακή στάθμη. Η διαφορά ενέργειας μεταξύ των δύο ενεργειακών σταθμών αντικατοπτρίζει την ενέργεια του συγκεκριμένου φωτονίου που απορροφήθηκε. Μεταπτώσεις των ηλεκτρονίων μπορούν να συμβούν σε περισσότερες της μίας ενεργειακές στάθμες, δηλαδή καταστάσεις διέγερσης (Αϊβαλάκис κ.α., 2003). Για το λόγο αυτό, τα μόρια των χλωροφυλλών έχουν τη δυνατότητα να απορροφούν φωτόνια σε δύο φασματικές περιοχές και συγκεκριμένα στην μπλε και κόκκινη περιοχή με συνέπεια την εμφάνιση δύο μεγίστων στα φάσματα απορρόφησής τους (Lawlor, 2001).

Η κατάλληλη τοποθέτηση στο χώρο, σε συνδυασμό με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά διέγερσης κάθε επιμέρους μορίου φωτοσυνθετικής χρωστικής του φωτοσυλλεκτικού μηχανισμού καθιστά την απορρόφηση φωτονίων και τη διέγερση των κέντρων αντίδρασης εξαιρετικά αποτελεσματική. Η ενέργεια διέγερσης μεταφέρεται μέσω συντονισμού, ενός μη φωτονιακού φαινομένου, προς το κέντρο αντίδρασης. Κατά τη μεταφορά της διέγερσης, ένα ποσοστό της ενέργειας (περίπου 10%) χάνεται με τη μορφή θερμικών απωλειών (Αϊβαλάκис κ.α., 2003). Η ύπαρξη αυτών των ενεργειακών απωλειών σε κάθε βήμα μεταφοράς της ενέργειας διέγερσης αποτρέπει την δिकाτευθυντήρια ροή της ενέργειας. Έτσι, οι χρωστικές των φωτοσυλλεκτικών μηχανισμών είναι στρατηγικά διευθετημένες και με κατάλληλα ενεργειακά χαρακτηριστικά, ώστε η απορρόφηση ενός φωτονίου από τα μόριά τους να μεταφέρει τη διέγερση αναγκαστικά προς το κέντρο αντίδρασης (Lawlor, 2001). Σύμφωνα με τα

παραπάνω, από τη στιγμή που ένα μόριο βοηθητικής φωτοσυνθετικής χρωστικής συλλαμβάνει την ενέργεια ενός φωτονίου μέχρι να διεγερθεί το φωτοχημικό κέντρο αντίδρασης μπορεί να μεσολαβήσει ένας μεγάλος αριθμός μεταφορών διέγερσης από μόριο σε μόριο.

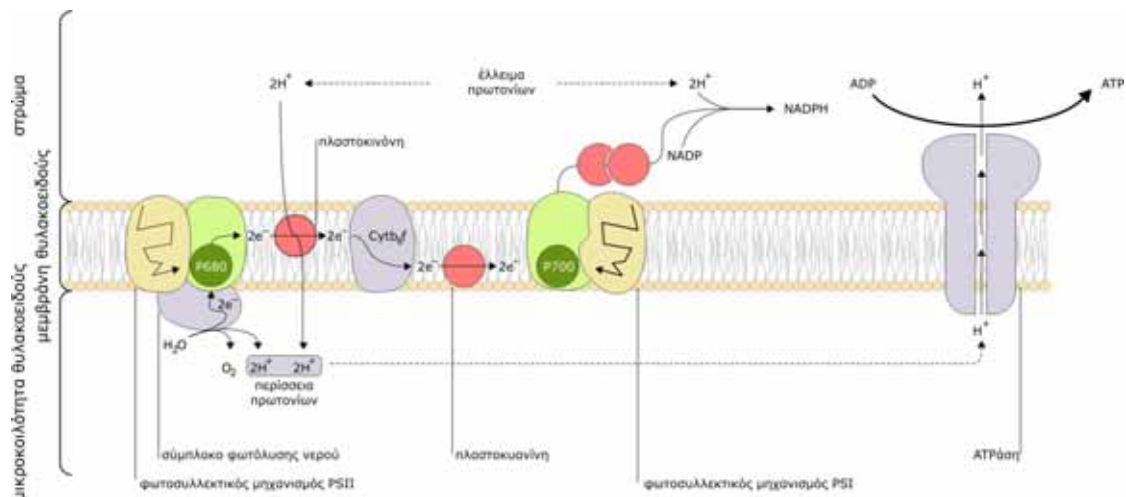


Εικόνα 2. α. Συντακτικός τύπος των δύο παραλλαγών του μορίου της χλωροφύλλης των ανώτερων φυτών. β. Συντακτικός τύπος τυπικού καροτενοειδούς.

1.3.1.2. Φωτοχημική ροή ηλεκτρονίων και παραγωγή χημικής ενέργειας

Πρόκειται για ροή ηλεκτρονίων μεταξύ ηλεκτρονιοδοτών και ηλεκτρονιοδεκτών, κυρίαρχη θέση στους οποίους κατέχουν οι χλωροφύλλες και συγκεκριμένα ένα ιδιαίτερο μόριο χλωροφύλλης α που βρίσκεται στον πυρήνα κάθε φωτοχημικού κέντρου των δύο φωτοσυστημάτων. Τα δύο φωτοσυστήματα αναπτύσσονται σε σειρά με το II να προηγείται στη φωτοχημική ροή ηλεκτρονίων και το I να ολοκληρώνει τη διαδικασία.

Η ενεργειακή κατάσταση του διεγερμένου ηλεκτρονίου της χλωροφύλλης *a* του φωτοχημικού κέντρου P680 καθιστά δυνατή την απόσπασή του μόνο στην περίπτωση που η φαιοφυτίνη, μια τροποποιημένη χλωροφύλλη η οποία αποτελεί ενδιάμεσο μόριο στη ροή ηλεκτρονίων στο φωτοσύστημα II, βρίσκεται σε οξειδωμένη κατάσταση. Η μεταφορά αυτή αποτελεί το πρώτο βήμα των φωτοχημικών αντιδράσεων στους χλωροπλάστες. Ακολούθως, η οξειδωμένη χλωροφύλλη *a* αναπληρώνει το ηλεκτρόνιο που έχασε από έναν ενδιάμεσο ηλεκτρονιοδότη, την τυροσίνη 161 της πρωτεΐνης D1. Παράλληλα, η ροή ηλεκτρονίων συνεχίζεται προς το οξειδοαναγωγικό ζεύγος των κινονών A και B και μετά προς το κυτοχρωμικό σύμπλοκο b_6f . Από το τελευταίο, μέσω μιας πλαστοκυανίνης, το ηλεκτρόνιο ανάγει την χλωροφύλλη *a* του ενεργού κέντρου P700 του φωτοσυστήματος I. Μέσω μιας ανάλογης φωτοχημικής αντίδρασης, το P700 οξειδώνεται με την μεταφορά ενός ηλεκτρονίου προς τον δέκτη A_0 και στη συνέχεια προς τον A_1 . Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων συνεχίζεται προς μια ομάδα τριών θειο-σιδηροπρωτεϊνών και ακολούθως προς την φερρεδοξίνη.



Εικόνα 3. Η διεύθυνση των κυριότερων πρωτεϊνικών συμπλόκων στη μεμβράνη των θυλακοειδών των grana και η ροή πρωτονίων και ηλεκτρονίων κατά τη λειτουργία των φωτεινών αντιδράσεων.

Τέλος, το ηλεκτρόνιο μεταφέρεται προς το NADP^+ μέσω της δράσης της αναγωγάσης του NADP . Μέσω της διαδικασίας αυτής, εκτός από την παραπάνω μεταφορά ηλεκτρονίων, λαμβάνει χώρα συσσώρευση πρωτονίων στον μικροχώρο των θυλακοειδών των grana με συνέπεια την ανάπτυξη ηλεκτροχημικού δυναμικού λόγω διαφοράς στη συγκέντρωση πρωτονίων μεταξύ του μικροχώρου και του στρώματος. Τα πρωτόνια προέρχονται από το στρώμα αλλά και από την φωτόλυση του νερού. Η διαδικασία αυτή προκαλείται από την δημιουργία ενός ισχυρού οξειδωτικού σώματος, αποτέλεσμα της σταδιακής μεταφοράς ηλεκτρονίων προς το φωτοχημικό κέντρο P680, το οποίο αποτελεί μέρος του συμπλόκου φωτόλυσης του νερού. Η απόσβεση του ηλεκτροχημικού δυναμικού πρωτονίων μέσω του παράγοντα σύζευξης παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για την φωσφορυλίωση του ADP προς ATP.

Από τα προηγούμενα διαπιστώνεται ότι υπάρχει μια συνεχής ροή ηλεκτρονίων από την φωτόλυση του νερού διαμέσου των φωτοσυστημάτων II και I προς τον τελικό αποδέκτη NADP^+ . Η συνολική αυτή διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων χαρακτηρίζεται ως μη κυκλική μεταφορά ηλεκτρονίων.

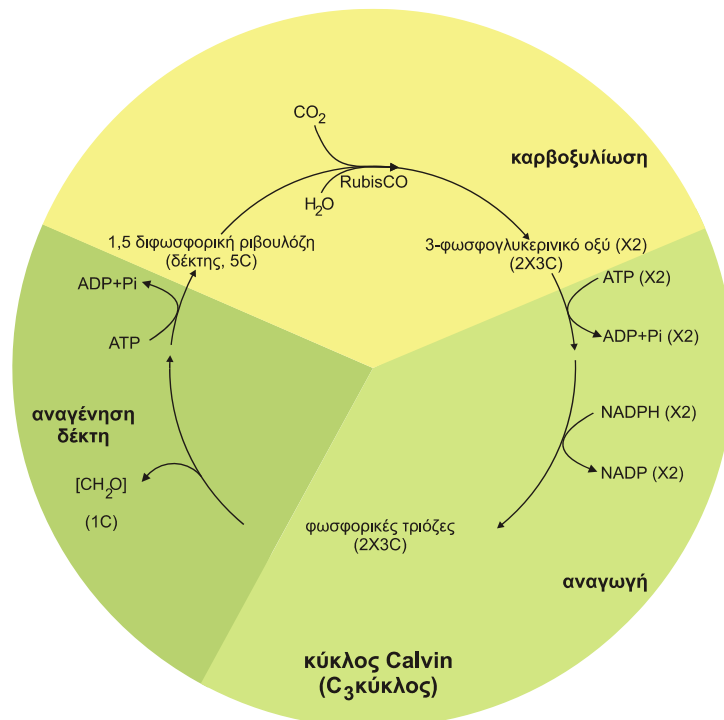
Τα δύο φωτοσυστήματα συνεργάζονται αρμονικά μεταξύ τους. Πέρα από τη συνεργασία αυτή το φωτοσύστημα I μπορεί να λειτουργήσει και ανεξάρτητα από το φωτοσύστημα II. Στην περίπτωση αυτή τα διεγερμένα μόρια της χλωροφύλλης του κέντρου αντίδρασης P700 ελευθερώνουν ηλεκτρόνια, τα οποία αντί να ακολουθήσουν γραμμική πορεία με τελικό αποδέκτη το NADP^+ , επανέρχονται στο οξειδωμένο κέντρο αντίδρασης P700. Η κυκλική ροή ηλεκτρονίων δεν παράγει NADPH αλλά συμβάλει, ωστόσο, στην ανάπτυξη ηλεκτροχημικού δυναμικού μέσω του οποίου μπορεί να συντεθεί ATP, μια διαδικασία που ονομάζεται κυκλική φωτοφωσφορυλίωση επειδή συνδυάζεται με κυκλική ροή ηλεκτρονίων.

1.3.2. Οι σκοτεινές αντιδράσεις

Τα πλούσια σε ενέργεια προϊόντα των φωτεινών αντιδράσεων, ATP και NADPH μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολυάριθμες βιοχημικές αντιδράσεις σύνθεσης και μεταφοράς, η προώθηση των οποίων απαιτεί τη δαπάνη ενέργειας. Ένα σημαντικό μέρος της ενέργειας των ATP και NADPH καταναλώνεται για τη δέσμευση του CO₂ της ατμόσφαιρας και την αναγωγή του μέχρι το επίπεδο του υδατάνθρακα (φωτοσυνθετική αφομοίωση του CO₂). Αυτό σημαίνει ότι, η ενέργεια που παράγεται στις φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης καταναλώνεται για τη δημιουργία του ανθρακικού σκελετού των φυτικών οργανισμών, δηλαδή την παραγωγή βιομάζας (Αιβαλάκης κ.α., 2003). Η αφομοίωση του CO₂ και η μετατροπή του σε υδατάνθρακες σε όλους τους φωτοσυνθέτοντες ευκαρυωτικούς οργανισμούς, είναι γνωστή ως αναγωγικός κύκλος των φωσφοροπεντοζών (RPPC) ή κύκλος του Calvin.

1.3.2.1. Ο κύκλος της αφομοίωσης του διοξειδίου του άνθρακα

Η δέσμευση του CO₂ και στη συνέχεια η αναγωγή του ως το επίπεδο του υδατάνθρακα πραγματοποιείται μέσω μιας κυκλικής διαδικασίας, η οποία ονομάζεται κύκλος του Calvin (εικόνα 4). Το CO₂ μετατρέπεται σε φωσφορυλιωμένα (ενεργοποιημένα) σάκχαρα ενώ ταυτόχρονα αναγεννάται ο δέκτης του CO₂ (η πεντόζη 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη). Ο κύκλος αυτός λειτουργεί σε όλους τους φωτοσυνθετικούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς καθώς και σε ορισμένους προκαρυωτικούς. Η όλη πορεία περιλαμβάνει επιμέρους αντιδράσεις οι οποίες καταλύονται από υδατοδιαλυτά ένζυμα που εντοπίζονται στο στρώμα των χλωροπλαστών (Αιβαλάκης κ.α., 2003). Ο κύκλος Calvin δεν περιλαμβάνει φωτοχημικές αντιδράσεις, ωστόσο η λειτουργία του εξαρτάται άμεσα από την διαθεσιμότητα του ATP και NADPH (τα προϊόντα των φωτεινών αντιδράσεων) καθώς και του CO₂. Ο κύκλος περιλαμβάνει τρία επιμέρους στάδια: καρβοξυλίωση, αναγωγή και αναγέννηση του δέκτη.



Εικόνα 4. Ο κύκλος του Calvin συνίσταται από τρία στάδια με τελική κατάληξη την αφομοίωση και αναγωγή ενός μορίου CO_2 και την αναγέννηση του αρχικού υποστρώματος.

Στο αρχικό και καθοριστικό στάδιο του κύκλου, το CO_2 ενσωματώνεται με τη μορφή μιας καρβοξυλομάδας στο μόριο-δέκτη, την 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη και παράγονται, ως το πρώτο προϊόν, δύο μόρια 3-φωσφογλυκερινικού οξέος. Την αντίδραση καταλύει το ένζυμο καρβοξυλάση-οξυγενάση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης (RubisCO). Στο δεύτερο στάδιο το 3PGA ανάγεται προς φωσφορικές τριόζες (3-φωσφορική γλυκεριναλδεΐδη ή φωσφορική διϋδροξυακετόνη) με κατανάλωση ATP και NADPH. Με την ολοκλήρωση του σταδίου αυτού το διοξείδιο του άνθρακα έχει πλέον αναχθεί στο επίπεδο του υδατάνθρακα με κέρδος μία υδατανθρακική μονάδα, ενώ για κάθε έξι περιστροφές του κύκλου το καθαρό προϊόν είναι ένα μόριο εξόζης. Στο τρίτο στάδιο επιτελούνται μια σειρά από αντιδράσεις, οι οποίες είναι απαραίτητες για την αναγέννηση του μορίου-δέκτη. Στο στάδιο αυτό καταναλώνεται ενέργεια με τη μορφή ATP. Με τη συμπλήρωση και του τρίτου σταδίου ο κύκλος του Calvin

έχει ολοκληρωθεί και η 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη είναι διαθέσιμη εκ νέου ως υπόστρωμα της RubisCO (Taiz and Zeiger, 1998).

1.3.2.2. Παραλλαγές στη βιοχημική οδό φωτοσυνθετικής ενσωμάτωσης του άνθρακα (C₃, C₄ και CAM φωτοσύνθεση)

Έως σήμερα έχουν αναγνωρισθεί τρεις κύριες βιοχημικές παραλλαγές του φωτοσυνθετικού μεταβολισμού του άνθρακα οι οποίες διαφοροποιούνται ως προς αρχική δέσμευση του CO₂ και την τροφοδοσία του προς την αντίδραση καρβοξυλίωσης της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης (Hall and Rao, 1999).

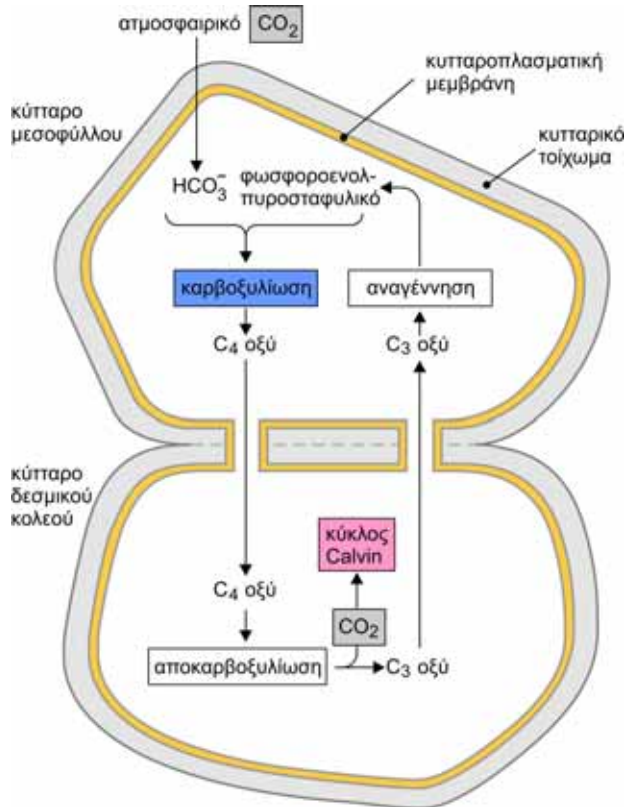
α. Η C₃ φωτοσύνθεση της οποίας η ονομασία υποδηλώνει ότι το πρώτο προϊόν της δέσμευσης του CO₂ είναι μια ένωση με τρία άτομα άνθρακα (3-φωσφογλυκερινικό οξύ, 3PGA).

β. Η C₄ φωτοσύνθεση στην οποία το πρώτο προϊόν της δέσμευσης του CO₂ είναι μια ένωση με τέσσερα άτομα άνθρακα, το οξαλοξικό οξύ (εικόνα 5), και

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

Στα C₃ φυτά, η φωτοσυνθετική αφομοίωση συνίσταται αποκλειστικά από τις αντιδράσεις του κύκλου του Calvin καθώς το πρώτο προϊόν ενσωμάτωσης του CO₂ είναι το φωσφορογλυκερινικό οξύ. Αντίθετα στα C₄ φυτά, η πρώτη αντίδραση η οποία ενσωματώνει το CO₂ δεν αποτελεί μέρος του κύκλου του Calvin αλλά προηγείται του κύκλου. Επιπλέον, η αρχική δέσμευση του υποστρώματος και η τελική απόδοσή του στον κύκλο λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικά κύτταρα. Συνέπεια του παραπάνω είναι ότι στα φυτά που ακολουθούν την C₄ οδό αφομοίωσης εντοπίζονται διαφορές στην ανατομία του φύλλου συγκριτικά με τα φυτά που ακολουθούν τον φωτοσυνθετικό κύκλο C₃. Εγκάρσια τομή ενός τυπικού C₃ φύλλου αποκαλύπτει ένα κύριο τύπο κυττάρων που φέρουν χλωροπλάστες, τα κύτταρα του

μεσοφύλλου. Αντίθετα, σε μια τομή ενός τυπικού C_4 φύλλου έχουμε δύο διαφορετικούς τύπους κυττάρων που φέρουν χλωροπλάστες, τα κύτταρα του μεσοφύλλου και αυτά του δεσμικού κολεού ενώ η λειτουργία του C_4 κύκλου απαιτεί τη συνεργασία και των δύο τύπων κυττάρων (Taiz and Zeiger, 2002, εικόνα 5).



Εικόνα 5. Ο κύκλος C_4 της φωτοσυνθετικής αφομοίωσης του CO_2 .

Το κλειδί του C_4 μηχανισμού αποτελεί το ένζυμο καρβοξυλάση του φωσφοροένολο-πυροσταφυλλικού οξέος, το οποίο καταλύει την καρβοξυλίωση του φωσφοροένολο-πυροσταφυλλικού οξέος (PEP). Το προϊόν της αντίδρασης αυτής είναι το οξαλοξικό οξύ (με 4 άτομα άνθρακα), το οποίο είναι ασταθές και γρήγορα ανάγεται σε ένα πιο σταθερό μόριο, όπως το μηλικό ή το ασπαραγινικό οξύ. Τα οξέα αυτά, μεταφέρονται από τα κύτταρα του μεσοφύλλου προς τα κύτταρα του κολεού, όπου υφίστανται αποκαρβοξυλίωση και το εκλυόμενο CO_2 αφομοιώνεται διαμέσου του κύκλου του Calvin σε φωσφοροτριόζες (3 άτομα C) στους χλωροπλάστες των κυττάρων του δεσμικού κολεού (Δροσόπουλος, 1998). Καθένα από τα ένζυμα που συμμετέχουν στον C_4 κύκλο, απαντάται μόνο σε ένα κυτταρικό

τύπο. Έτσι, η PEP-καρβοξυλάση και η κινάση του πυροσταφυλικού-ορθοφωσφορικού περιορίζονται στα κύτταρα του μεσοφύλλου, ενώ οι αποκαρβοξυλάσες και τα ένζυμα του κύκλου του Calvin εντοπίζονται στα κύτταρα του δεσμικού κολεού (Taiz and Zeiger, 2002). Με βάση τα παραπάνω, διατυπώθηκε το βασικό μοντέλο του κύκλου (εικόνα 5).

Συνοπτικά ο φωτοσυνθετικός κύκλος των C_4 φυτών αποτελείται από τέσσερα στάδια:

- Κατά το πρώτο στάδιο, πραγματοποιείται η δέσμευση του CO_2 με την καρβοξυλίωση της φωσφοροενολικής μορφής του πυροσταφυλικού οξέος στα κύτταρα του μεσοφύλλου για το σχηματισμό ενός C_4 οξέος (μηλικού ή ασπαραγινικού).
- Κατά το δεύτερο στάδιο γίνεται η μεταφορά των C_4 οξέων στα κύτταρα του δεσμικού κολεού.
- Στο τρίτο στάδιο πραγματοποιείται η αποκαρβοξυλίωση των C_4 οξέων μέσα στα κύτταρα του δεσμικού κολεού και η απελευθέρωση του CO_2 , το οποίο στη συνέχεια ανάγεται μέσω του κύκλου του Calvin.
- Τέλος, στο τέταρτο στάδιο γίνεται η μεταφορά των C_3 οξέων (πυροσταφυλικό ή αλανίνη) στα κύτταρα του μεσοφύλλου, με σκοπό την αναγέννηση του αποδέκτη του CO_2 που είναι το PEP (Taiz and Zeiger, 2002).

Υπάρχουν τρεις παραλλαγές του βασικού C_4 μονοπατιού που απαντώνται σε διαφορετικά είδη. Οι παραλλαγές αυτές, διαφέρουν κυρίως στο C_4 οξύ (μηλικό ή ασπαραγινικό) που μεταφέρεται στα κύτταρα του δεσμικού κολεού και στο είδος της αποκαρβοξυλίωσης (Taiz and Zeiger, 2002).

Ένα τρίτο μηχανισμό για τη συγκέντρωση του CO_2 στα σημεία καρβοξυλίωσης μέσω της RubisCO αποτελεί ο όξινος μεταβολισμός τύπου Crassulaceae (CAM). Τα φυτά CAM είναι προσαρμοσμένα να επιβιώνουν σε εξαιρετικά ξηρές συνθήκες περιβάλλοντος και είναι φυτά με παχιά σαρκώδη φύλλα ή βλαστούς των οποίων τα κύτταρα

περιέχουν μεγάλα χυμοτόπια. Το χαρακτηριστικό των φυτών αυτών είναι ότι τα στομάτια τους ανοίγουν κατά τη διάρκεια της νύχτας, ενώ είναι συνήθως κλειστά κατά τη διάρκεια της ημέρας ώστε να ελαχιστοποιήσουν τις απώλειες H_2O . Αυτό σημαίνει ότι η πρόσληψη του CO_2 και η τελική ενσωμάτωσή του διαφοροποιούνται χρονικά. Τα φυτά CAM χαρακτηρίζονται από συσσώρευση μηλικού κατά τη νύχτα και αντίστοιχα μείωση του κατά τη μέρα.

Το νυχτερινό άνοιγμα των στοματίων διευκολύνει την αντίδραση καρβοξυλίωσης από την οποία παράγονται οξέα με τέσσερα άτομα C, που αποταμιεύονται στα μεγάλα χυμοτόπια των κυττάρων των φωτοσυνθετικών ιστών. Το γεγονός αυτό προκαλεί σημαντική οξίνιση των κυττάρων κατά τη διάρκεια της νύχτας. Τα οξέα αποκαρβοξυλιώνονται κατά την ημέρα όπου υπάρχουν οι ενεργειακές προϋποθέσεις ώστε να αφομοιωθεί μέσω του κύκλου του Calvin το παραγόμενο CO_2 . Το κεντρικό ένζυμο του μηχανισμού των φυτών CAM είναι η καρβοξυλάση του PEP και το πρώτο προϊόν της αντίδρασης που καταλύει είναι το οξαλοξικό οξύ, το οποίο ανάγεται αμέσως σε μηλικό από την μηλική αφυδρογονάση, που απαιτεί την ταυτόχρονη παρουσία $NADH_2$. Μετά την παραγωγή του το μηλικό οξύ συσσωρεύεται στο χυμοτόπιο.

Κατά τη διάρκεια της ημέρας, το μηλικό επαναντλείται από το χυμοτόπιο στο κυτταρόπλασμα, όπου αποκαρβοξυλιώνεται από το σύμπλοκο μηλικό ένζυμο-NAD, προς πυροσταφυλικό οξύ. Το παραγόμενο CO_2 διαχέεται προς τους χλωροπλάστες, όπου αφομοιώνεται από τον κύκλο του Calvin. Η μεγάλη ποσότητα PEP που απαιτείται για τη συντήρηση της αντίδρασης καρβοξυλίωσης, προέρχεται από την διάσπαση του αμύλου δια μέσου των ενζύμων του γλυκολυτικού κύκλου. Το πυροσταφυλικό οξύ που παράγεται από την αποκαρβοξυλίωση του μηλικού, μετατρέπεται σε φωσφοροτριόζη, η οποία επιστρέφει στους χλωροπλάστες και μετατρέπεται σε γλυκόζη και άμυλο (Δροσόπουλος, 1998).

Συμπερασματικά, το μηλικό οξύ στα CAM φυτά λειτουργεί ως αποταμιευτικό μόριο του CO₂, ενώ αντίθετα στα C₄ φυτά λειτουργεί ως άμεσος δότης CO₂. Οι καρβοξυλιώσεις στα φυτά CAM διαχωρίζονται χρονικά (ημέρα-νύχτα), ενώ οι καρβοξυλιώσεις στη φωτοσύνθεση των C₄ φυτών απομονώνονται σε διαφορετικά κύτταρα, οι αντιδράσεις όμως γίνονται πάντα παρουσία φωτός καθώς το φως ασκεί σημαντική επίδραση στην ενεργότητα των ενζύμων που συμμετέχουν στον C₄ μηχανισμό.

1.4. Φωτοπροστασία της φωτοσυνθετικής συσκευής από υπερβολικές εντάσεις ακτινοβολίας

Τα φύλλα αποτελούν τα όργανα του φυτού που είναι υπεύθυνα για τη βελτιστοποίηση της φωτοσυνθετικής αφομοίωσης του CO₂. Οι δραστήριοι φωτοσυνθετικοί ιστοί των φύλλων, είναι εξειδικευμένοι στην απορρόφηση της ηλιακής ακτινοβολίας, η οποία αποτελεί την κινητήρια δύναμη της φωτοσύνθεσης. Ωστόσο, σε υψηλές εντάσεις η ηλιακή ακτινοβολία μπορεί να αποβεί καταστροφική για τη φωτοσυνθετική μηχανή και να προκαλέσει ελάττωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας εάν ο ρυθμός απορρόφησης της ενέργειας υπερβαίνει κατά πολύ το ρυθμό αξιοποίησής της από τις βιοχημικές αντιδράσεις (Hall and Rao, 1999). Το φαινόμενο της μείωσης της φωτοσυνθετικής ικανότητας ενός φυτού ονομάζεται φωτοαναστολή και εκδηλώνεται όταν τα φυτά εκτίθενται σε εντάσεις ακτινοβολίας υψηλότερες αυτών που επαρκούν για τον ενεργειακό κορεσμό της φωτοσυνθετικής συσκευής. Ακόμα και φυτά ταχείας ανάπτυξης με υψηλούς ρυθμούς αφομοίωσης του CO₂, δεν αξιοποιούν συνήθως περισσότερο από το μισό της έντασης του πλήρους ηλιακού φωτός. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η απορρόφηση φωτονίων από τα μόρια χλωροφύλλης αποτελεί μια καθαρά φωτοχημική διαδικασία, η αύξηση της έντασης της φωτεινής ακτινοβολίας προκαλεί υπερτροφοδότηση της φωτοσυνθετικής συσκευής με ενέργεια, η οποία υπερβαίνει αυτή που μπορεί να

αξιοποιηθεί κατά τη φωτοχημική ροή ηλεκτρονίων. Το πλεόνασμα ενέργειας που δημιουργείται, μπορεί υπό ορισμένες προϋποθέσεις να οδηγήσει, μέσω μιας πολύπλοκης αλληλουχίας φωτοχημικών αντιδράσεων στην παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου η οποία με τη σειρά της προκαλεί οξειδωτικές βλάβες σε κρίσιμα βιομόρια της φωτοσυνθετικής συσκευής όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Για την προστασία και κατ' επέκταση την λειτουργικότητα της φωτοσυνθετικής συσκευής, σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας, τα φυτά αναπτύσσουν ορισμένες φωτοπροστατευτικές στρατηγικές (Choudhury and Behera, 2001). Οι στρατηγικές αυτές αποβλέπουν είτε στην αποφυγή της υπερβολικής φωτοσυλλογής είτε στην διαχείριση της πλεονάζουσας ενέργειας των φωτοχημικών κέντρων μέσω της λειτουργίας κατάλληλων μηχανισμών απόσβεσής της (στρατηγική της ανθεκτικότητας). Η διαχείριση της πλεονάζουσας ενέργειας μπορεί να γίνει είτε στο στάδιο της φωτοσυλλογής (μη φωτοχημική, μη φωτοσυνθετική απόσβεση) είτε στο στάδιο της φωτοσυνθετικής ροής ηλεκτρονίων μεταξύ των δύο φωτοσυστημάτων (φωτοχημική, μη φωτοσυνθετική απόσβεση). Οι εναλλακτικές οδοί απόσβεσης της ενέργειας που απορροφάται από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές είναι τέσσερις:

α. Χρήση του παραγόμενου φωτοχημικού έργου για την αναγωγή οργανικών μορίων (κυρίως μέσω του κύκλου του Calvin). Η διαδικασία αυτή είναι η μόνη μέσω της οποίας παράγεται φωτοσυνθετικό έργο.

β. Επανεκπομπή των φωτονίων με τη μορφή φθορισμού. Η απόσβεση αυτή της ενέργειας διέγερσης των μορίων της χλωροφύλλης είναι ένα φυσικό, μη φωτοχημικό φαινόμενο.

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

ενεργητική μεταφορά ιόντων και η αντίδραση Mehler. Η απόσβεση αυτή της ενέργειας είναι φωτοχημική, μη φωτοσυνθετική.

δ. Η πλεονάζουσα ενέργεια των φωτοσυστημάτων αποσβένει με τη μορφή απωλειών θερμότητας (θερμική απόσβεση) (Καραμπουρνιώτης, 2003). Η θερμική απόσβεση είναι ένα φυσικό, μη φωτοχημικό φαινόμενο.

1.4.1. Η στρατηγική της αποφυγής: ανατομικά χαρακτηριστικά και κινήσεις φύλλων και χλωροπλαστών

Τα φυτά προκειμένου να αποφύγουν την υπερβολική συσσώρευση ενέργειας, αναπτύσσουν μορφολογικούς και βιοχημικούς μηχανισμούς, οι οποίοι αποβλέπουν στην εξισορρόπηση μεταξύ της απορρόφησης της ενέργειας και της κατανάλωσής της για την παραγωγή φωτοχημικού έργου.

Ορισμένοι μηχανισμοί αποφυγής αποβλέπουν στον περιορισμό της έντασης του προσπίπτοντος φωτισμού στους φωτοσυνθετικούς ιστούς και επομένως στη μείωση της ροής φωτονίων τα οποία τελικά απορροφώνται από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι η ανάπτυξη τριχώματος, η εναπόθεση επιεφυμενιδικών κηρών και η παρουσία χρωστικών στα επιδερμικά κύτταρα ή στα κύτταρα του μεσοφύλλου (Barker et al., 1997). Η παρουσία ανθοκυανινών στα νεαρά ή ανεπτυγμένα φύλλα έχει συσχετιστεί με την προστασία της φωτοσυνθετικής συσκευής από υπερβολικές εντάσεις ακτινοβολίας (Gould et al., 1995; Smillie and Hetherington, 1999; Gould et al., 2002; Steyn et al., 2002; Hughes et al., 2005; Liakopoulos et al., 2006). Ο προτεινόμενος μηχανισμός μέσω του οποίου οι ανθοκυανίνες δρουν φωτοπροστατευτικά σχετίζεται με την ιδιότητά τους να απορροφούν μέρος της ορατής ακτινοβολίας. Με τον τρόπο αυτό μειώνουν την ενεργειακή πίεση στα φωτοσυστήματα και συνεπώς την πιθανότητα συσσώρευσης βλαβών που οδηγούν στην φωτοαναστολή (Steyn et al., 2002). Ωστόσο, η απορρόφηση των ανθοκυανικών μορίων εντοπίζεται συνήθως στην

πράσινη περιοχή του φάσματος με συνέπεια να αμφισβητείται ο φωτοπροστατευτικός τους ρόλος μιας και τα φωτόνια αυτά δεν είναι αποδοτικά για την φωτοσύνθεση. Πιο συγκεκριμένα, θεωρείται πως τα φωτόνια της πράσινης περιοχής απορροφούνται κυρίως από τα κατώτερα στρώματα του μεσοφύλλου τα οποία έτσι και αλλιώς δεν χαρακτηρίζονται από υψηλή ενεργειακή πίεση (Sun et al., 1998; Manetas, 2006). Η παρουσία πυκνού τριχώματος σχετίζεται επίσης με την προστασία από τις έντονες απώλειες νερού και την είσοδο της υπεριώδους ακτινοβολίας στο εσωτερικό των φυτικών ιστών, ενώ ταυτόχρονα συμβάλλει και στη βελτίωση του θερμικού ισοζυγίου του ελάσματος επειδή ανακλά ένα μέρος της ακτινοβολίας που προσπίπτει στο φύλλο (Karabourniotis and Bornman, 1999; Karabourniotis et al., 1999; Manetas, 2003).

Ορισμένα φυτά μεταβάλλουν τη γωνία έκθεσης των φύλλων ως προς την προσπίπτουσα ηλιακή ακτινοβολία και την προσαρμόζουν, έτσι ώστε να βελτιστοποιούν την απορρόφηση του φωτός ανάλογα με τις ανάγκες τους. Επίσης, ο κυλινδρισμός των φύλλων έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της επιφάνειας του φύλλου που είναι εκτεθειμένη στην ηλιακή ακτινοβολία, και την παράλληλη αύξηση της έκθεσης της κάτω επιφάνειας, η οποία διαθέτει συνήθως υψηλότερη ανακλαστικότητα (Kyparissis and Manetas, 1993). Η μείωση της απορροφούμενης ενέργειας από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές μπορεί να επιτευχθεί και με κατάλληλες κινήσεις των χλωροπλαστών. Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί ότι τα υποκυτταρικά αυτά οργανίδια μετακινούνται είτε προς τα αντικλινή κυτταρικά τοιχώματα, ώστε να αποφεύγουν την έκθεση τους στο φως, είτε προς το κέντρο του κυττάρου, ώστε να είναι περισσότερο εκτεθειμένα στο φως και επομένως να αυξάνεται η απορρόφηση του. Είναι πιθανό επίσης, σε δυσμενείς περιόδους τα φυτά να μειώνουν τη συγκέντρωση των χλωροφυλλών, διατηρώντας παράλληλα τους φωτοπροστατευτικούς τους μηχανισμούς, έτσι ώστε να περιορίζεται η απορροφητική ικανότητα των κυττάρων (Kyparissis et al., 2000).

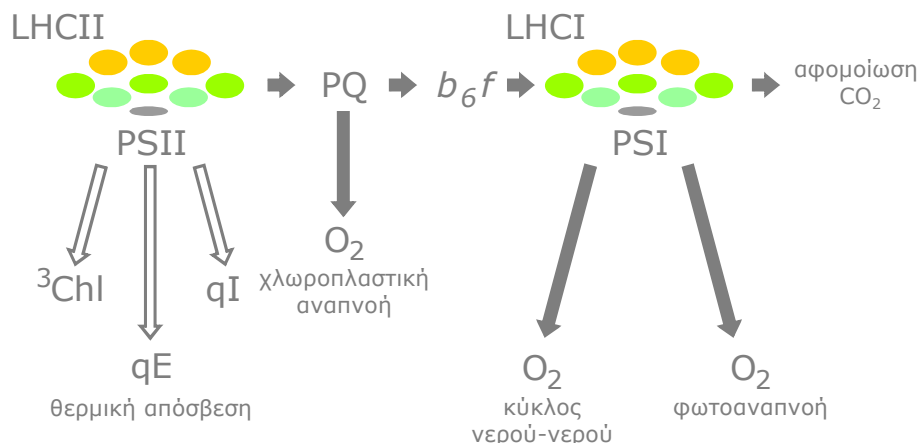
1.4.2. Η στρατηγική της ανθεκτικότητας: εναλλακτικές οδοί απόσβεσης της ενέργειας της φωτεινής ακτινοβολίας

Η αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη είναι ένα αντιστρεπτό φαινόμενο. Έτσι, τα μόρια των χρωστικών που βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση είναι ασταθή και παρουσιάζουν τη τάση να επανέλθουν ταχέως στην θεμελιώδη ενεργειακή κατάσταση αποδίδοντας την επιπλέον ενέργεια που απορροφήθηκε. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται αποδιέγερση των μορίων. Η απόσβεση της ενέργειας διέγερσης του μορίου της χλωροφύλλης μπορεί να συμβεί με διαφορετικούς τρόπους:

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

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

γ. Με μεταφορά της ενέργειας διέγερσης σε γειτονικά μόρια. Μέσω της διαδικασίας αυτής η ενέργεια μεταφέρεται στο κέντρο αντίδρασης κάθε φωτοσυστήματος, διαδικασία η οποία συνοδεύεται από παραγωγή φωτοχημικού έργου, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι εάν η αποδιέγερση συμβεί με τους δύο πρώτους τρόπους, δεν είναι δυνατόν να παραχθεί φωτοχημικό έργο (Αϊβαλάκης κ.α.,2003).



Εικόνα 6. Σύνοψη των φωτοπροστατευτικών μηχανισμών των χλωροπλαστών. Οι φωτοπροστατευτικοί μηχανισμοί κατανέμονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το στάδιο των φωτεινών αντιδράσεων κατά το οποίο λαμβάνει χώρα η απόσβεση της περίσσειας ενέργειας ή, ισοδύναμα, ανάλογα με το αν η απόσβεση αφορά σε ενέργεια διέγερσης (απόσβεση φωτονίων) ή σε απόσβεση ηλεκτρονίων: α. μηχανισμοί μη φωτοχημικής απόσβεσης (μέσω χλωροφύλλης τριπλότητας, θερμική απόσβεση μέσω του κύκλου των ξανθοφυλλών και μεσοπρόθεσμη απόσβεση) και β. μηχανισμοί μη φωτοσυνθετικής απόσβεσης (χλωροπλαστική αναπνοή, κύκλος νερού-νερού και φωτοαναπνοή).

1.4.2.1. Φωτοχημική απόσβεση μέσω χλωροφύλλης τριπλότητας

Η απορρόφηση περίσσειας φωτονίων, μπορεί να προκαλέσει συσσώρευση ενέργειας στη φωτοσυνθετική συσκευή και επομένως παράταση της διάρκειας ζωής της χλωροφύλλης σε κατάσταση απλότητας (¹Chl). Η διεγερμένη αυτή χλωροφύλλη μπορεί, είτε να θέσει σε κίνηση τη φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων, είτε να επανέλθει στη βασική κατάσταση εκπέμποντας ακτινοβολία μέσω φθορισμού, είτε να μετατραπεί σε χλωροφύλλη σε κατάσταση τριπλότητας (³Chl), που δεν είναι ικανή να θέσει σε κίνηση τη φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων. Παρόλο που η ³Chl δεν μπορεί να προκαλέσει βλάβες, μπορεί να αλληλεπιδράσει με το μοριακό οξυγόνο, το οποίο σε κανονικές συνθήκες βρίσκεται σε κατάσταση τριπλότητας (³O₂), και με μεταφορά ενέργειας να το μετατρέψει σε οξυγόνο απλότητας (¹O₂). Το οξυγόνο απλότητας είναι μια

εξαιρετικά ενεργή μορφή οξυγόνου, η οποία μπορεί άμεσα να προκαλέσει βλάβες σε πρωτεΐνες, χρωστικές και λιπίδια της φωτοσυνθετικής συσκευής (Niyogi, 2000; Krieger-Liszkay, 2005). Εναλλακτικά, είναι δυνατόν να προκαλέσει σταδιακή αναγωγή του $^3\text{O}_2$ με μεταφορά ηλεκτρονίου σε αυτό, γεγονός που θα έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία των ενεργών μορφών οξυγόνου, ρίζα υπεροξειδίου (O_2^\bullet) και ρίζα υδροξυλίου (OH^\bullet), οι οποίες αντιδρούν άμεσα με βιομόρια (Niyogi, 2000; Krieger-Liszkay, 2005). Ακόμα και σε άριστες συνθήκες, το 10% της ενέργειας του φωτός που απορροφάται από το PSII, χάνεται λόγω της δημιουργίας ^3Chl (Baroli and Niyogi, 2000).

1.4.2.2. Ο κύκλος των ξανθοφυλλών

Ο κύκλος των ξανθοφυλλών, παρέχει τη δυνατότητα απόσβεσης της ενέργειας διέγερσης μέσω ορισμένων καροτενοειδών. Τα καροτενοειδή εκτελούν βασικούς φωτοπροστατευτικούς ρόλους στους χλωροπλάστες καθώς προκαλούν απόσβεση της χλωροφύλλης στην κατάσταση διέγερσης τριπλότητας, και αποτοξίνωση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου ή άλλων ενεργών μορφών οξυγόνου (Choudhury and Behera, 2001), που σχηματίζονται λόγω της έκθεσης σε υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας, μέσω εξειδικευμένων αντιδράσεων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η τοπολογία των καροτενοειδών στα φωτοσυστήματα. Στις μεμβράνες των θυλακοειδών, το β-καροτένιο εντοπίζεται κυρίως στα κέντρα αντίδρασης των PSII και PSI και στο τμήμα της φωτοσυλλεκτικής αντέννας που βρίσκεται κοντά στα κέντρα αντίδρασης, ενώ οι ξανθοφύλλες περιορίζονται στο εξωτερικό τμήμα της (Baroli and Niyogi, 2000; Trebst, 2003). Το β-καροτένιο προκαλεί άμεση απόσβεση τόσο των ελεύθερων ριζών οξυγόνου όσο και της χλωροφύλλης στην κατάσταση διέγερσης τριπλότητας αποτρέποντας το σχηματισμό της ελεύθερης ρίζας οξυγόνου (Cogdell and Frank, 1987), ενώ οι ξανθοφύλλες περιορίζουν το σχηματισμό της

χλωροφύλλης στην κατάσταση διέγερσης τριπλότητας αποσβένοντας την ενέργεια των μορίων σε κατάσταση απλότητας της ($^1\text{Chl}^+$) (Choudhury and Behera, 2001). Οι ξανθοφύλλες έχουν ως κύρια λειτουργία να αυξάνουν την μη φωτοχημική απόσβεση της πλεονάζουσας ενέργειας διέγερσης με τη μορφή θερμότητας και να προστατεύουν με τον τρόπο αυτό τους χλωροπλάστες από την καταπόνηση της πλεονάζουσας ακτινοβολίας (Demmig-Adams, 1990; Gilmore and Govindjee, 1999; Bukhov et al., 2001; Grudzinski et al., 2001).

Ο κύκλος των ξανθοφυλλών είναι ένας ενζυμικός μηχανισμός που περιλαμβάνει τη μετατροπή της βιολαξανθίνης σε ζεαξανθίνη και αντίστροφα, μέσω της ενδιάμεσης ξανθοφύλλης ανθεραξανθίνης. Τα ένζυμα που εμπλέκονται στις ενδομετατροπές στον κύκλο των ξανθοφυλλών είναι η απο-εποξειδάση της βιολαξανθίνης (VDE) και η εποξειδάση της ζεαξανθίνης (ZE).

Κατά τη διάρκεια της φωτοσυνθετικής ροής ηλεκτρονίων, αναπτύσσεται μια διαφορά συγκέντρωσης πρωτονίων μεταξύ του στρώματος και του εσωτερικού των θυλακοειδών. Η προκύπτουσα διαβάθμιση πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης των θυλακοειδών αποτελεί την κινητήρια δύναμη για τις διαδικασίες φωτοφωσφορυλίωσης και την παραγωγή ATP. Παρουσία περίσσειας φωτός, η συσσώρευση πρωτονίων στο εσωτερικό των θυλακοειδών είναι υψηλότερη του φυσιολογικού και αποτελεί το έναυσμα για την ενεργοποίηση της απο-εποξειδάσης της βιολαξανθίνης και τη δημιουργία ζεαξανθίνης. Η αντίθετη αντίδραση συμβαίνει σε χαμηλές εντάσεις φωτισμού ή στο σκοτάδι και καταλύεται από την εποξειδάση της ζεαξανθίνης, η οποία ενεργοποιείται σε ουδέτερες τιμές pH (Demmig-Adams and Adams, 1992, 1996; Demmig-Adams et al., 1996). Συνολικά τρεις παράγοντες φαίνεται να ρυθμίζουν τη μετατροπή της βιολαξανθίνης σε ζεαξανθίνη: η παρουσία του ασκορβικού οξέος (Hall and Rao, 1999), η ενεργοποίηση της απο-

εποξειδάσης από το χαμηλό pH (Demmig-Adams and Adams, 1996) και η διαθεσιμότητα της βιολαξανθίνης (Foyer et al., 1994). Η μετατροπή της βιολαξανθίνης σε ζεαξανθίνη έχει ως αποτέλεσμα δομικές μεταβολές στα συστατικά του συμπλόκου φωτοσυλλογής LHC (Choudhury and Behera, 2001). Τα παραπάνω φαινόμενα έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την κατευθυνόμενη απόσβεση της ενέργειας διέγερσης της χλωροφύλλης με τη μορφή θερμότητας (Choudhury and Behera, 2001). Η απόσβεση αυτή αναφέρεται ως ενεργειακά-εξαρτώμενη απόσβεση (qE) ή ως εξαρτώμενη από τη διαβάθμιση του pH, μη-φωτοχημική απόσβεση μέσω φθορισμού της χλωροφύλλης (Demmig-Adams, 1990). Υπάρχουν δύο θεωρίες σχετικά με τη φύση του μηχανισμού μέσω του οποίου οι αλληλομετατροπές των ξανθοφυλλών της φωτοσυλλεκτικής αντέννας, επηρεάζει την ισορροπία μεταξύ της δέσμευσης φωτονίων και της απόσβεσης της ενέργειας (Young et al., 1997; Horton et al., 1999). Σύμφωνα με την πρώτη, η ζεαξανθίνη μπορεί άμεσα να δεχτεί την ενέργεια από την ^1Chl και να την αποσβέσει ως θερμότητα. Η αυξημένη διαβάθμιση της συγκέντρωσης πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης των θυλακοειδών, πιθανόν να είναι απαραίτητη για να μεταβληθεί η οργάνωση της φωτοσυλλεκτικής αντέννας και να ελλατωθεί η φυσική απόσταση μεταξύ των μορίων της χλωροφύλλης και της ζεαξανθίνης, ώστε να είναι δυνατή η μεταξύ τους αλληλεπίδραση (Demmig-Adams, 1990; Gilmore, 1997). Έχει διαπιστωθεί ότι τα περισσότερα καροτενοειδή των ανώτερων φυτών διαθέτουν το κατάλληλο επίπεδο ενέργειας ώστε να δεχτούν την ενέργεια από τη διεγερμένη ^1Chl . Ο κύκλος των ξανθοφυλλών λειτουργεί ως ένας μοριακός μηχανισμός μετατροπής της βιολαξανθίνης σε ανθεραξανθίνη και ζεαξανθίνη που εν δυνάμει μπορούν να δεχτούν την ενέργεια διέγερσης από την χλωροφύλλη και να την αποσβέσουν ως θερμότητα (Demmig-Adams and Adams, 1996). Η δεύτερη θεωρία αποσαφηνίζει το ρόλο των χρωστικών του κύκλου των ξανθοφυλλών στο να προκαλούν μεταβολές στη διάταξη

της φωτοσυλλεκτικής αντέννας, η οποία καταλήγει στην μη φωτοχημική απόσβεση ενέργειας. Σύμφωνα με αυτή, προτείνεται ότι η ζεαξανθίνη προκαλεί δομικές αλλαγές στο φωτοσυλλεκτικό σύστημα των θυλακοειδών των μεμβρανών που συμβάλλουν στη μη φωτοχημική απόσβεση (Gilmore, 1997; Minkov et al., 1999). Ενώ οι πρωτεΐνες του φωτοσυλλεκτικού μηχανισμού παρέχουν, υπό κανονικές συνθήκες, ένα περιβάλλον που επιτρέπει στα μόρια της χλωροφύλλης να βρίσκονται σε μικρές μεταξύ τους αποστάσεις ενώ ταυτόχρονα να διαχωρίζονται από τα μόρια των ξανθοφυλλών (Searle et al., 1990), οι αλλαγές στην κατάσταση ιονισμού των πρωτεϊνών που συμβαίνουν λόγω της εμπλοκής του κύκλου των ξανθοφυλλών, οδηγούν στην προσέγγιση χλωροφυλλών και ξανθοφυλλών με αποτέλεσμα την αυθόρμητη απόσβεση της ενέργειας διέγερσης της ^1Chl από την ζεαξανθίνη προς θερμότητα (Eskling et al., 1997; Gilmore, 1997).

1.4.2.3. Μεσοπρόθεσμη απόσβεση

Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο παράγοντας που συνεισφέρει περισσότερο στη μη φωτοχημική απόσβεση της ενέργειας (NPQ) ονομάζεται απόσβεση φθορισμού υψηλής ενέργειας ή qE και θεωρείται ζωτικής σημασίας στην προστασία του φύλλου από τις βλάβες που προκύπτουν από την πλεονάζουσα ενέργεια. Η qE εξασθενεί μέσα σε λίγα λεπτά από την τοποθέτηση του φύλλου στο σκοτάδι. Μια δεύτερη διαδικασία που εξασθενεί μέσα σε μερικά λεπτά, ονομάζεται μεταβατική κατάσταση (qT). Η μεταβατική κατάσταση περιλαμβάνει την ταχεία και αντιστρεπτή φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών των φωτοσυλλεκτικών αντεννών και θεωρείται ότι συμβάλλει στην εξισορρόπηση της κατανομής της ακτινοβολίας μεταξύ των PSI και PSII (Maxwell and Johnson, 2000). Επίσης, επιτρέπει στη φωτοσυνθετική συσκευή να προσαρμόζεται σε ποιοτικές και ποσοτικές αλλαγές του φωτεινού καθεστώτος (Wollman, 2001). Η διάκριση μεταξύ των δύο αυτών μορφών

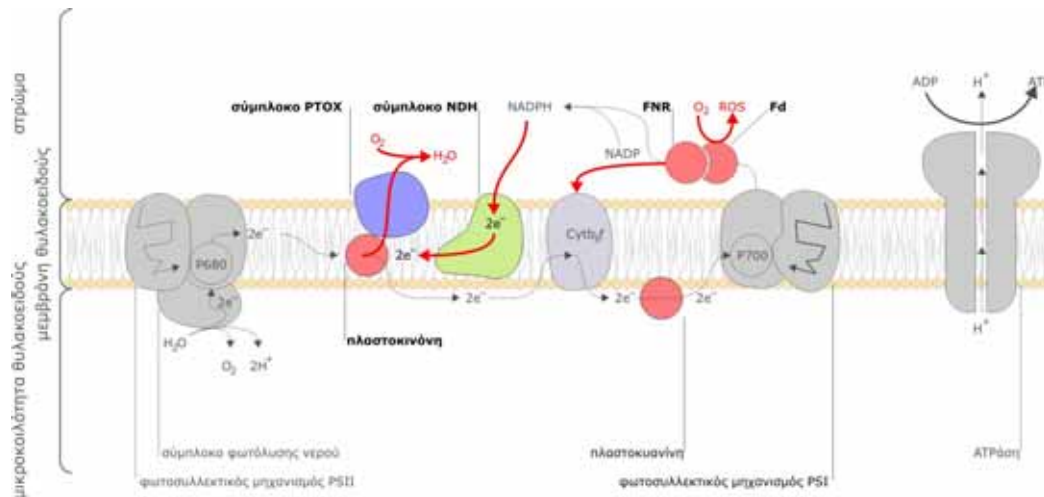
απόσβεσης (qE και qT) δεν είναι ευχερής, ωστόσο, θεωρείται ότι η qT έχει αμελητέα συμβολή στην ολική NPQ σε υψηλές εντάσεις φωτός, ενώ σε χαμηλές εντάσεις η συμβολή της είναι περισσότερο σημαντική (Maxwell and Johnson, 2000).

Στις περισσότερες περιπτώσεις, όλες οι διαδικασίες απόσβεσης του φθορισμού της χλωροφύλλης που εξασθενούν μέσα σε λίγα λεπτά μετά την παύση του φωτισμού, θεωρούνται φωτοπροστατευτικές. Ωστόσο, υπάρχει και μια άλλη συνιστώσα της NPQ που διατηρείται για αρκετό χρόνο μετά (τουλάχιστον 10 λεπτά μετά την προσαρμογή στο σκοτάδι ενός φωτιζόμενου φύλλου), η qI . Η qI , είναι συνήθως πολύ μικρότερη από την qE και αποδίδεται σε μόνιμη κυρίως επίδραση της περίσσειας φωτός. Το φαινόμενο το οποίο σχετίζεται με την συνιστώσα qI είναι η φωτοαναστολή η οποία αποδίδεται σε συσσωρευμένες βλάβες στα κέντρα αντίδρασης του PSII (Maxwell and Johnson, 2000). Η φωτοπροστατευτική δράση της qI συνίσταται στη μείωση των βλαβών του PSII με απόσβεση της επιπλέον ενέργειας που έχει απορροφηθεί (Stroch et al., 2004).

1.4.3. Εναλλακτικές βιοχημικές οδοί χρήσης της χημικής ενέργειας των φωτεινών αντιδράσεων

1.4.3.1. Χλωροπλαστική αναπνοή και κυκλική μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω του PSI

Η χλωροπλαστική αναπνοή συνιστά ένα σύνολο από αντιδράσεις μεταφοράς των ηλεκτρονίων από την πλαστοκινόνη προς το O_2 μέσω της δραστηριότητας της πλαστιδιακής οξειδάσης της κινόλης (PTOX) με τελικό προϊόν το H_2O (Bennoun, 1982; Niyogi, 2000; Rumeau et al., 2007, εικόνα 7). Η λειτουργία της χλωροπλαστικής αναπνοής μπορεί να αφορά σε ηλεκτρόνια προερχόμενα είτε από την γραμμική



Εικόνα 7. Αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων της φωτοσύνθεσης. Με κόκκινα βέλη παριστάνονται οι αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την κατά την φωτοαναπνοή και την κυκλική μεταφορά μέσω του PSI (με προσαρμογή από Rumeau et al., 2007).

ροή είτε από την κυκλική ροή μέσω του PSI μέσω οξειδωσης του NAD(P)H από το πλαστιδιακό σύμπλοκο της αφυδρογονάσης του NAD(P)H (NDH) (Rumeau et al., 2007). Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι παράγοντες PTOX και NDH συνεργάζονται στενά κατά την μη φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων μέσω της πλαστοκινόνης και ακόμα ότι μπορεί να λαμβάνει χώρα μεταφορά ηλεκτρονίων απευθείας από την NDH προς την PTOX αν και αυτό δεν έχει αποδειχθεί ακόμα (Rumeau et al., 2007). Ωστόσο, έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι η ύπαρξη του συμπλόκου NDH συνδέεται με την αναγωγή της πλαστοκινόνης. Η μελέτη της εμπλοκής των PTOX και NDH στη φωτοσύνθεση έδειξε ότι παρόλο που η NDH δεν φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στη φωτοσυνθετική διαδικασία, δεν συμβαίνει το ίδιο και με την PTOX, η οποία συνδέεται με τη διαδικασία σχηματισμού των καροτενοειδών στους χλωροπλάστες. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το εύρημα ότι τα καροτενοειδή είναι απαραίτητα για τη επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται στο PSII από τις υπερβολικές εντάσεις ακτινοβολίας, υποδηλώνει πως η χλωροπλαστική αναπνοή λειτουργεί ως βαλβίδα ασφαλείας στις περιπτώσεις υπερσυσώρευσης ενέργειας κατά την φωτοσυνθετική

ροή ηλεκτρονίων (Niyogi, 2000). Πειραματικά δεδομένα εμπλέκουν την χλωροπλαστική αναπνοή στον εγκλιματισμό των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης προκαλούμενες από υψηλές εντάσεις φωτισμού. Υπό αυτές τις συνθήκες, η μη φωτοχημική αναγωγή της πλαστοκινόνης ενισχύεται μέσω της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στη χλωροπλαστική αναπνοή (Rumeau et al., 2007). Συγκεκριμένα, η PTOX λειτουργεί προστατευτικά αποτρέποντας την παραμονή των δεκτών ηλεκτρονίων του PSII στην ανηγμένη κατάσταση με αποτέλεσμα να αποφεύγονται οι βλάβες στη φωτοσυνθετική συσκευή και τελικά η φωτοαναστολή (Niyogi, 2000). Ωστόσο, η δράση της PTOX αυτή καθαυτή δεν φαίνεται να παρέχει ικανή προστασία έναντι της φωτοαναστολής του PSII και έχει προταθεί ότι δεν μπορεί να θεωρηθεί ως κύριος μηχανισμός προστασίας (Rosso et al., 2006).

1.4.3.2. Φωτοαναπνοή

Η φωτοαναπνοή λειτουργεί ως μια βαλβίδα ασφαλείας στην περίπτωση περίσσειας ενέργειας διέγερσης της φωτοσυνθετικής συσκευής, ειδικά σε συνθήκες απουσίας CO₂. Ο όρος φωτοαναπνοή περιγράφει την εξαρτώμενη από το φως πρόσληψη O₂ και απελευθέρωση CO₂ και αποτελεί συνέπεια της λειτουργίας της RubisCO όχι μόνο ως καρβοξυλάσης αλλά και ως οξυγενάσης του υποστρώματος 1,5-διφωσφοροριβουλόζη. Η φωτοαναπνοή περιλαμβάνει τις μεταβολικές δραστηριότητες τριών κυτταρικών οργανιδίων, των χλωροπλαστών, των υπεροξυσωμάτων και των μιτοχονδρίων. Η οξυγενάση συμμετέχει σε μία αντίδραση από την οποία παράγεται γλυκολικό οξύ και 3-φωσφορογλυκερινικό οξύ. Η αντίδραση αυτή αποτελεί την αρχή μιας μεταβολικής ακολουθίας του μεταβολισμού του γλυκολικού οξέος, κατά την οποία το συνολικό αποτέλεσμα του μεταβολισμού δύο μορίων γλυκολικού οξέος είναι η πρόσληψη ενός O₂, η αποβολή ενός CO₂ και η παραγωγή ενός μορίου 3-φωσφορογλυκερινικού οξέος το οποίο μπορεί στη συνέχεια

να εισέλθει στον κύκλο του Calvin. Παράλληλα, καταναλώνεται η αναγωγική δύναμη ενός μορίου NADPH_2 και η ενέργεια ενός μορίου ATP (Foyer and Noctor, 2000; Wingler et al., 2000). Η μη φωτοσυνθετική δαπάνη της χημικής ενέργειας των παραπάνω μορίων αποτελεί την βάση του φωτοπροστατευτικού δυναμικού της φωτοαναπνοής. Επίσης, λόγω της τρανσαμίνωσης του γλυοξυλικού οξέος προς γλυκίνη και του σχηματισμού NH_3 , η φωτοαναπνοή συνδέεται στενά και με το μεταβολισμό του αζώτου στα φύλλα (Wingler et al., 2000), ενώ επιπλέον, παράγει μεταβολίτες όπως η γλυκίνη και η σερίνη, που μπορούν να εξαχθούν από το φύλλο ή να χρησιμοποιηθούν σε άλλες μεταβολικές οδούς. Έτσι, η φωτοσύνθεση, η φωτοαναπνοή και ο μεταβολισμός του αζώτου συνδέονται με τον κύκλο του γλυκολικού οξέος μέσω των τριών διαφορετικών κυτταρικών οργανιδίων.

1.4.3.3. Αντίδραση Mehler

Η αντίδραση Mehler αποτελεί έναν ακόμα φωτοπροστατευτικό μηχανισμό καθώς πιστεύεται ότι λειτουργεί ως εναλλακτικός τρόπος διοχέτευσης της περίσσειας ηλεκτρονίων. Σε συνθήκες έντονου φωτισμού, ακόμα και αν στο PSII διοχετεύεται ικανοποιητικά η φωτονιακή ενέργεια που βρίσκεται σε περίσσεια, είναι πιθανό να δημιουργηθούν ενεργές μορφές οξυγόνου στην αναγωγική πλευρά του φωτοσυστήματος I, όταν οι τελικοί αποδέκτες των ηλεκτρονίων δεν επαρκούν. Αυτό συμβαίνει επειδή η φερρεδοξίνη διαθέτει κατάλληλο αρνητικό ηλεκτροχημικό δυναμικό ώστε να μπορεί να μεταφέρει ηλεκτρόνια στο οξυγόνο με αποτέλεσμα να το ανάγει μερικώς προς ρίζα υπεροξειδίου (Foyer et al., 1994). Η αντίδραση αυτή αποτελεί την οδό Mehler ή κύκλο νερού-νερού, επειδή τα ηλεκτρόνια από το νερό στο PSII μεταφέρονται στο οξυγόνο, το οποίο ανάγεται τελικά επίσης σε νερό στο PSI.

Εκτός από τη διοχέτευση της πλεονάζουσας ενέργειας, ο κύκλος νερού-νερού είναι σημαντικός επειδή προκαλεί την άμεση

εξουδετέρωση των ριζών υπεροξειδίου στη θέση δημιουργίας τους, πριν αυτές αλληλεπιδράσουν με τα μόρια στόχους (Asada, 1999). Έχει διαπιστωθεί ότι η αντίδραση Mehler-υπεροξειδάσης συμβάλει στη δημιουργία διαβάθμισης πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης των θυλακοειδών και επομένως είναι σημαντική για την εμπλοκή του κύκλου των ξανθοφυλλών και την αύξηση της συνεισφοράς της συνιστώσας qE της μη φωτοχημικής απόσβεσης, ιδιαίτερα σε συνθήκες οι οποίες χαρακτηρίζονται ως περιοριστικές για την αφομοίωση του CO₂ (Neubauer and Yamamoto, 1992). Ωστόσο, η αντίδραση Mehler-υπεροξειδάσης ανταγωνίζεται με την αποοξειδάση της βιολαξανθίνης για το ασκορβικό οξύ με συνέπεια να περιορίζει την συνιστώσα qE μέσω της μείωσης της διαθεσιμότητας ασκορβικού οξέος (Neubauer and Yamamoto, 1994).

1.5. Η σημασία του φθορισμού της χλωροφύλλης *a* στη μελέτη της φωτοσύνθεσης

Η ενέργεια της φωτεινής ακτινοβολίας που απορροφάται από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές μπορεί να διοχετευτεί σε τρεις εναλλακτικές οδούς: (α) **φωτοχημικές αντιδράσεις** οι οποίες συνίστανται στη φωτόλυση του νερού και τη ροή ηλεκτρονίων προς διάφορους αποδέκτες (φωτοχημική απόσβεση), (β) απόσβεση της ενέργειας των διεγερμένων μορίων **υπό μορφή θερμότητας** (μη φωτοχημική απόσβεση) και (γ) επαναεκπομπή της ενέργειας διέγερσης **μέσω φθορισμού**. Καθώς η ενέργεια που απορροφάται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες είναι σταθερή, οι τρεις παραπάνω οδοί απόσβεσής της είναι ποσοτικά εξαρτώμενες με τέτοιο τρόπο ώστε αλλαγές σε μια από αυτές να επηρεάζει την συμβολή των υπολοίπων δύο. Πιο συγκεκριμένα, οι αλλαγές στην φωτοχημική ή / και στην μη φωτοχημική απόσβεση έχουν άμεσο αντίκτυπο στα επίπεδα του εκπεμπόμενου φθορισμού. Επομένως, μελετώντας τον φθορισμό που προέρχεται συγκεκριμένα από τα μόρια χλωροφύλλης *a* του φωτοσυστήματος II, είναι δυνατή η λήψη πληροφοριών για

την συμβολή της φωτοχημικής και μη φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας στους χλωροπλάστες (Maxwell and Johnson, 2000). Σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος το 90% περίπου του εκπεμπόμενου φθορισμού προέρχεται από το φωτοσύστημα II και πιο συγκεκριμένα από τα σύμπλοκα πρωτεϊνών-χλωροφύλλης *a* της αντέννας φωτοσυλλογής (Govindjee, 2004). Επιπλέον, μόνο το τμήμα του φθορισμού που προέρχεται από το φωτοσύστημα II ανταποκρίνεται στις αλλαγές των φωτοχημικών αντιδράσεων των θυλακοειδών με συνέπεια οι όποιες αλλαγές στα επίπεδα του εκπεμπόμενου φθορισμού να προέρχονται από το φωτοσύστημα II (Govindjee, 1995; Govindjee, 2004). Επειδή η αύξηση της φωτοχημικής ή / και μη φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας διέγερσης προκαλεί μείωση του εκπεμπόμενου φθορισμού, τα παραπάνω φαινόμενα περιγράφονται και υπό όρους απόσβεσης του φθορισμού, δηλαδή ως φωτοχημική και ως μη φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού.

Η μελέτη του φθορισμού χλωροφύλλης παρέχει πλήθος παραμέτρων οι οποίες σχετίζονται με τη συμβολή των διαφόρων παραγόντων φωτοσυλλογής και μεταφοράς της ενέργειας προς τα φωτοχημικά κέντρα, τους τρόπους απόσβεσης της ενέργειας, τον λειτουργικό πληθυσμό και το βαθμό αδρανοποίησης των φωτοσυστημάτων II. Ταυτόχρονα αποτελεί έναν έμμεσο τρόπο μελέτης της φωτοσυνθετικής λειτουργίας ως σύνολο καθώς η λειτουργία του φωτοσυστήματος II σχετίζεται άμεσα με την παροχή ενέργειας για την φωτοσυνθετική αφομοίωση του CO₂. Επίσης, ο φθορισμός που προέρχεται από το PSII αποτελεί έναν ευαίσθητο δείκτη για το βαθμό καταπόνησης του φυτικού οργανισμού εξαιτίας ορισμένων δυσμενών παραγόντων του περιβάλλοντος όπως ακτινοβολίες, τροφοπενίες και τοξικότητες, έλλειψη νερού, κ.ά.

Τα συνήθη πειράματα μελέτης του φθορισμού της χλωροφύλλης αποσκοπούν στον υπολογισμό δύο βασικών παραμέτρων: αυτού της φωτοχημικής απόδοσης της φωτοσυνθετικής συσκευής (Φ_{PSII} ή Yield) και αυτού της μη φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας από

τον φωτοσυλλεκτικό μηχανισμό (NPQ). Επιπλέον, επειδή ο δεύτερος τρόπος απόσβεσης λειτουργεί μόνο κάτω από συνθήκες επαγωγής της φωτοσύνθεσης, δηλαδή μόνο κάτω από συνθήκες φωτός, η μέτρηση του εκπεμπόμενου φθορισμού σε ένα δείγμα εγκλιματισμένο στο σκοτάδι για ορισμένο χρονικό διάστημα παρέχει την μέγιστη δυνατή φωτοχημική απόδοση ή αλλιώς την θεμελιώδη φωτοχημική ικανότητα (Φ_{PSII_0}). Σε συνθήκες φωτισμού του δείγματος, ο συνδυασμός της παραμέτρου της Φ_{PSII} με την φωτονική ροή παρέχει τον φαινόμενο ρυθμό ροής ηλεκτρονίων (ETR) κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ των δύο φωτοσυστημάτων (Genty et al, 1989). Η παράμετρος αυτή είναι χρήσιμη καθώς, κάτω από ορισμένες προϋποθέσεις, είναι ανάλογη του ρυθμού φωτοσυνθετικής αφομοίωσης του CO_2 (Logan et al., 2007).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

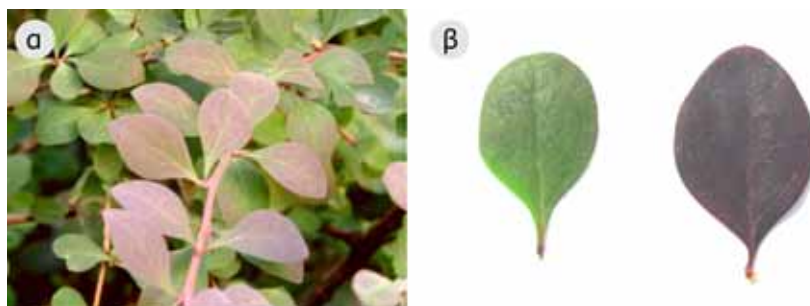
Μεταξύ των διαφόρων υποθέσεων για τους πιθανούς ρόλους των ανθοκυανινών στα φύλλα, η υπόθεση της φωτοπροστασίας είναι η επικρατέστερη από πλευράς όγκου πειραματικών δεδομένων (Steyn et al., 2002; Manetas, 2006). Ο πιθανός φωτοπροστατευτικός ρόλος των ανθοκυανινών παρουσιάζει ενδιαφέρον κυρίως ως χαρακτηριστικό εγκλιματισμού των φυτών καθώς προσφέρει αυξημένη ανθεκτικότητα σε υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας κυρίως όταν αυτές συνυπάρχουν με άλλους παράγοντες καταπόνησης όπως έλλειψη νερού ή χαμηλές θερμοκρασίες. Σύμφωνα με την υπόθεση της φωτοπροστασίας, οι ανθοκυανίνες λειτουργούν ως οπτικό φίλτρο, το οποίο απορροφά φωτόνια που διαφορετικά θα απορροφούσαν οι φωτοσυνθετικές χρωστικές, με αποτέλεσμα να μειώνεται η ενεργειακή πίεση των φωτοσυστημάτων και συνεπώς η πιθανότητα της φωτοαναστολής.

Στην εργασία αυτή, εξετάζεται το πιθανό φωτοπροστατευτικό πλεονέκτημα των ανθοκυανιούχων φύλλων του φυτού *Berberis cretica*. Η επιλογή του φυτού αυτού παρουσιάζει το πλεονέκτημα της ενδοειδικής ποικιλομορφίας στην έκφραση του χαρακτήρα “κόκκινα φύλλα”. Επιπλέον, επειδή τα ανθοκυανιούχα φύλλα βρίσκονται σε γειτνίαση με τα κανονικά πράσινα φύλλα, εξασφαλίζεται σχετική ομοιομορφία του πειραματικού υλικού. Τέλος, τα φύλλα του συγκεκριμένου φυτού διατηρούν το κόκκινο χρώμα τους και μετά το πέρας της ανάπτυξης γεγονός το οποίο επιτρέπει την αποφυγή της παραλλακτικότητας που οφείλεται στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης και εξασφαλίζει πράσινα και ανθοκυανιούχα φύλλα της ίδιας φυσιολογικής ηλικίας. Οι μετρήσεις της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και του φωτοπροστατευτικού δυναμικού πραγματοποιήθηκαν τόσο στο πεδίο όσο και στο εργαστήριο, όπου τα φύλλα εκτέθηκαν επιπλέον και σε έντονα φωτοανασταλτικές συνθήκες.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

I. Φυτικό υλικό

Ως φυτικό υλικό επιλέχθηκαν φυτά *Berberis cretica* σε γλάστρες ή φυτά στο έδαφος στο χώρο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Λόγω της ταυτόχρονης ύπαρξης πράσινων και ανθοκυανιούχων φύλλων στα ίδια άτομα (εικόνα 8), τα φύλλα που επιλέχθηκαν για τις μετρήσεις προέρχονταν από τα ίδια φυτά ενώ έγινε προσπάθεια ώστε να βρίσκονται στο ίδιο στάδιο ανάπτυξης ή ακόμα και στον ίδιο βλαστό ώστε να ελαχιστοποιηθεί η ποικιλομορφία του πειραματικού υλικού. Όλα τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα είχαν αναπτυχθεί κάτω από φυσικό φως.



Εικόνα 8. α. βλαστός του φυτού *Berberis cretica* όπου φύονται πράσινα και ανθοκυανιούχα φύλλα. β. οι δύο κατηγορίες φύλλων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

II. Ανατομικά χαρακτηριστικά και οπτικές ιδιότητες

II.1. Ανατομία των φύλλων

Τα φύλλα εξετάστηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο (Zeiss Axiolab (Carl Zeiss, Jena, Germany)) για την κατανομή των ανθοκυανινών από νωπές τομές που παρασκευάστηκαν με ξυράφι. Η παρατήρηση έγινε σε γλυκερίνη ώστε να ελαχιστοποιηθεί η διάχυση των χρωστικών. Το πάχος του ελάσματος μετρήθηκε σε ανάλογες τομές με τη βοήθεια μικρομετρικής κλίμακας.

II.2. Μέτρηση φωτοπερατότητας του ελάσματος

Η μέτρηση της φωτοπερατότητας του ελάσματος πραγματοποιήθηκε μέσω δύο διαφορετικών τεχνικών. Η πρώτη τεχνική επιτρέπει την

μελέτη των εντάσεων της εξερχόμενης ακτινοβολίας με τη βοήθεια μικροσκοπίου ώστε να διαπιστωθεί η τυχόν επίδραση των επιμέρους ανατομικών στοιχείων του φύλλου στην φωτοπερατότητα. Η δεύτερη τεχνική επιτρέπει την χρήση έγχρωμων φίλτρων ώστε να διαπιστωθεί η φωτοπερατότητα σε διαφορετικές φασματικές περιοχές της ορατής ακτινοβολίας.

II.2.1. Μέτρηση μέσω ανάλυσης εικόνας με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου

Για τις μετρήσεις αυτής της κατηγορίας το φύλλο τοποθετήθηκε σε ειδικό υποδοχέα στην τράπεζα ανάστροφου μικροσκοπίου (Zeiss Axiovert (Carl Zeiss, Jena, Germany)) και φωτίστηκε με λευκό φως εντάσεων 100-1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ μέσω οπτικής ίνας. Το εξερχόμενο από την αποαξονική επιφάνεια φως καταγράφηκε με τη βοήθεια ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής (CyberShot DSC-S75 (SONY Corporation, Japan)) η οποία ήταν προσαρμοσμένη στο μικροσκόπιο. Ακολούθως, οι ψηφιακές εικόνες αναλύθηκαν μέσω ανάλυσης εικόνας με το λογισμικό Image Pro Plus (version 2.0; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Η ανάλυση περιελάμβανε την διόρθωση των εικόνων λόγω ανομοιομορφίας πεδίου του μικροσκοπίου με την χρήση ψηφιακού φίλτρου και μετατροπή των τιμών κλίμακας γκριζου των εικονοστοιχείων σε εντάσεις φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε με τη χρήση πράσινου φίλτρου και φίλτρων ουδέτερης πυκνότητας στη θέση του δείγματος για μια περιοχή εντάσεων προσπίπτουσας και διερχόμενης ακτινοβολίας και την μέτρηση της διερχόμενης ακτινοβολίας με ραδιόμετρο (Li 188B, Li-COR, Lincoln, NE, USA).

II.2.2. Μέτρηση μέσω ραδιομέτρου με τη χρήση οπτικής ίνας και έγχρωμων φίλτρων

Οι μετρήσεις της κατηγορίας αυτής αφορούσαν σε άμεση μέτρηση της έντασης της διερχόμενης ακτινοβολίας από το φύλλο μέσω ραδιομέτρου (Li 188B, Li-COR, Lincoln, NE, USA). Το φύλλο

τοποθετήθηκε σε ειδικό υποδοχέα και φωτίστηκε με φως εντάσεων 130-2000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ μέσω οπτικής ίνας με ή χωρίς την παρεμβολή έγχρωμων φίλτρων. Ως φασματικές περιοχές επιλέχθηκαν, εκτός από το λευκό φως, η κόκκινη (με αποκλεισμό μηκών κύματος κάτω από 625 nm), η πράσινη (με κέντρο τα 550 nm) και η μπλε (με κέντρο τα 410 nm) περιοχή. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν φωτίζοντας την προσαξονική επιφάνεια του φύλλου και μετρώντας το διερχόμενο φως από την αποαξονική και αντίστροφα.

III. Μέτρηση συγκέντρωσης χρωστικών του ελάσματος

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις συγκέντρωσης ανθοκυανινών και χλωροφυλλών στα φύλλα. Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών ελήφθησαν δίσκοι φύλλων και λειοτριβήθηκαν σε γουδί με άμμο εκχύλισης. Στη συνέχεια έγινε εκχύλιση με 1% HCl σε μεθανόλη (5 ml). Το εκχύλισμα καθαρίστηκε από τα στερεά υπολείμματα με φυγοκέντρηση ($2570 \times g$, 5 λεπτά) και μετρήθηκε η απορρόφηση του υπερκειμένου στα 530 και 657 nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης τύπου Shimadzu UV-Vis 160A (Shimadzu Co, Tokyo, Japan). Από την απορρόφηση των ανθοκυανινών αφαιρέθηκε η συμβολή των χλωροφυλλών και η διορθωμένη απορρόφηση μετατράπηκε σε συγκέντρωση χρησιμοποιώντας τον τυπικό συντελεστή μοριακής απόσβεσης της κυανιδίνης ($34,7 \text{ AU mM}^{-1}$) κατά Murray and Hackett (1991). Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των χλωροφυλλών ελήφθησαν δίσκοι φύλλων και λειοτριβήθηκαν σε γουδί με άμμο εκχύλισης. Στη συνέχεια έγινε εκχύλιση με 1% CaCO_3 σε 80% ακετόνη (10 ml). Το εκχύλισμα καθαρίστηκε από τα στερεά υπολείμματα με φυγοκέντρηση ($2570 \times g$, 5 λεπτά) και μετρήθηκε η απορρόφηση του υπερκειμένου στα 646 και 663 nm. Οι απορροφήσεις μετατράπηκαν σε συγκεντρώσεις χλωροφυλλών σύμφωνα με τους Lichtenthaler and Wellburn (1983).

IV. *In vivo* φθορισμομετρία χλωροφύλλης

Η μελέτη του *in vivo* φθορισμού της χλωροφύλλης *a* πραγματοποιήθηκε με την χρήση του φορητού φθορισμομέτρου χλωροφύλλης PAM-2100 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). Το όργανο αυτό έχει την δυνατότητα να καταγράφει την απόκριση του φθορισμού της χλωροφύλλης σε διαφορετικές συνθήκες φυσικού ή τεχνητού φωτισμού. Οι δύο βασικές παράμετροι που καταγράφηκαν ήταν η θεμελιώδης φωτοχημική ικανότητα του φωτοσυστήματος II σε δείγματα τα οποία ήταν εγκλιματισμένα στο σκοτάδι (Φ_{PSII_0}) και η φωτοχημική απόδοση του φωτοσυστήματος II κάτω αυξανόμενες εντάσεις φωτισμού (Φ_{PSII}). 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 μεταξύ των δύο φωτοσυστημάτων είναι 0,5. Η παράμετρος NPQ υπολογίστηκε ως $NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$ (Maxwell and Johnson, 2000). Για την πρώτη ομάδα μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε ο υποδοχέας συσκότισης του φύλλου ενώ για την δεύτερη ο ειδικός υποδοχέας 2030-B leaf clip ο οποίος δίνει επιπλέον τη δυνατότητα καταγραφής της έντασης της προσπίπτουσας φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας και της θερμοκρασίας του φύλλου μέσω ενσωματωμένου φωτομέτρου και θερμοζεύγους αντίστοιχα. Στις περιπτώσεις όπου εφαρμόστηκε τεχνητό φως επί των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ανάλογα με την περίπτωση είτε η εσωτερική είτε η εξωτερική πηγή αλογόνου του οργάνου. Στην περίπτωση της εξωτερικής πηγής εφαρμόστηκε μεταξύ της λάμπας και του δείγματος ειδικό φίλτρο αποκλεισμού της υπέρυθρου περιοχής ώστε να περιοριστεί η θέρμανση του φύλλου. Η περίοδος εγκλιματισμού στο σκοτάδι ήταν περισσότερο από 20 min ενώ του εγκλιματισμού στις αλλαγές της έντασης της φωτεινής ακτινοβολίας 3 min. Η ακτινοβολία κορεσμού εφαρμόζόταν 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.

V. Μέτρηση φωτοσυνθετικών παραμέτρων μέσω ανταλλαγής αερίων

Οι φωτοσυνθετικές παράμετροι μετρήθηκαν με τη μορφή καμπυλών εξάρτησης τους από την ένταση του φωτός με τη χρήση φορητού οργάνου μέτρησης φωτοσύνθεσης (LC Pro+, ADC Bioscientific Ltd., Herts, UK). Η λήψη των καμπυλών πραγματοποιήθηκε με ρύθμιση των κλιματολογικών παραμέτρων ως εξής: θερμοκρασία 30 ± 2 °C, σχετική υγρασία αέρα 31 ± 4 %, συγκέντρωση CO₂ 370 ppm. Χρησιμοποιήθηκε ο θάλαμος πλατύφυλλων (φωτιζόμενη επιφάνεια 6,25 cm²) και η τεχνητή πηγή LED του οργάνου σε εντάσεις από 0 έως 1840 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Επειδή τα φύλλα του συγκεκριμένου φυτού είναι μικρότερα από την επιφάνεια μέτρησης του θαλάμου, οι μετρήσεις διορθώθηκαν με βάση την επιφάνεια του δείγματος η οποία υπολογίστηκε από φωτογραφίες. Το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε μεταξύ διαδοχικών εντάσεων ήταν 3 min.

VI. Πείραμα επίδρασης χαμηλών θερμοκρασιών στις φωτοχημικές παραμέτρους των φύλλων

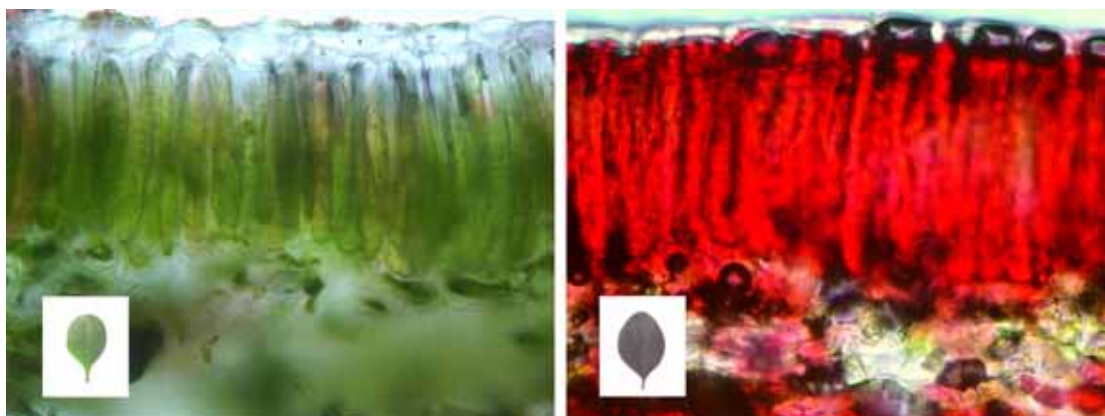
Μελετήθηκε η επίδραση χαμηλής θερμοκρασίας στα φύλλα των δύο κατηγοριών. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν βλαστοί με πράσινα ή και ανθοκυανιούχα φύλλα από φυτά στο χώμα οι οποίοι κόπηκαν μέσα σε νερό και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο. Ένας αριθμός βλαστών παρέμειναν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) ενώ άλλοι μεταφέρθηκαν σε θερμοκρασία 4 °C για τον ίδιο χρόνο (1 h). Καταγράφηκε η θεμελιώδης φωτοχημική ικανότητα του φωτοσυστήματος II ($\Phi_{\text{PSII}_0} = F_v/F_m$) με ένταση ακτινοβολίας κορεσμού 15000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και διάρκεια 0,8 s. Ακολούθως εφαρμόστηκε ακτινικό φως σε εντάσεις 250, 2000 και 4400 μmol

quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ για 3 min ανά τιμή έντασης και καταγράφηκε η φωτοχημική απόδοση του φωτοσυστήματος II (Φ_{PSII} ή Yield).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

I. Ανατομικά χαρακτηριστικά, συγκέντρωση χρωστικών και οπτικές ιδιότητες των φύλλων

Από την μακροσκοπική εξέταση των φύλλων (εικόνα 8) προκύπτει ότι τα ανθοκυανιούχα φύλλα φύονται σε σημεία του βλαστού τα οποία είναι εκτεθειμένα στο πλήρες ηλιακό φως ενώ τα πράσινα σε σημεία τα οποία βρίσκονται κάτω από καθεστώς μερικής σκίασης. Η μικροσκοπική εξέταση τομών του ελάσματος των δύο κατηγοριών φύλλων αποκαλύπτει ότι τα ανθοκυανιούχα φύλλα περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις ανθοκυανινών στα κύτταρα του μεσοφύλλου και κυρίως σε αυτά του δρυφρακτοειδούς παρεγχύματος. Σχετικά μικρότερη φαίνεται να είναι η συγκέντρωση των ανθοκυανινών στα κύτταρα του σπογγώδους παρεγχύματος. Αντίθετα, οι επιδερμικοί ιστοί δεν περιέχουν ανθοκυανίνες (εικόνα 9). Η ποσοτική ανάλυση του ανθοκυανικού περιεχομένου φαίνεται στον πίνακα I. Η συγκέντρωση ανθοκυανινών στα φύλλα εμφανίζεται αρκετά υψηλή, περίπου 10 φορές υψηλότερη αυτής των ανθοκυανιούχων φύλλων του αμπελιού (Liakourou et al., 2006). Τα πράσινα φύλλα δεν έδωσαν μετρήσιμη συγκέντρωση ανθοκυανινών με την μέθοδο που εφαρμόστηκε.



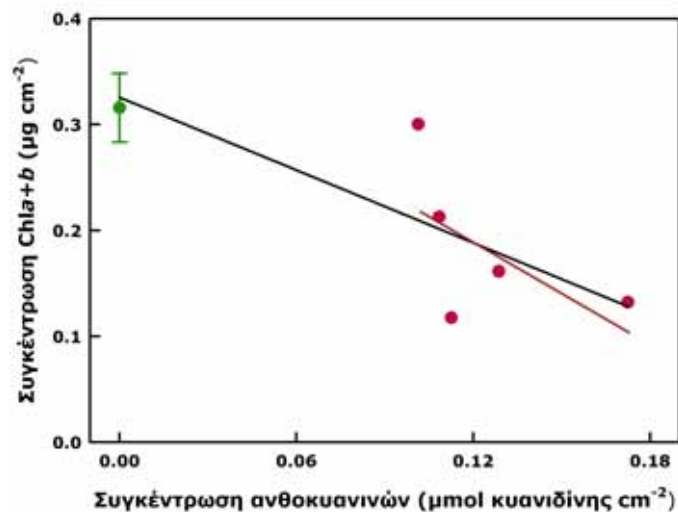
Εικόνα 9. Μικροφωτογραφίες τομών του ελάσματος των πράσινων και ανθοκυανιούχων φύλλων του είδους *Berberis cretica*.

Συνήθως, φύλλα τα οποία αναπτύσσονται σε διαφορετικό φωτεινό καθεστώς εμφανίζουν διαφορές στην ανατομία και την συγκέντρωση

των φωτοσυνθετικών χρωστικών. Σύμφωνα με τον πίνακα I, το πάχος των ανθοκυανιούχων φύλλων δεν διαφέρει σημαντικά από αυτό των πράσινων. Όσον αφορά στη συγκέντρωση των χλωροφυλλών, τα ανθοκυανιούχα φύλλα διαθέτουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις από τα πράσινα γεγονός το οποίο μπορεί να συσχετιστεί με το φωτεινό καθεστώς (Brugnoli et al., 1994; Bertamini and Nedunchezian, 2002). Ωστόσο, ο λόγος των δύο χλωροφυλλών εμφανίζεται ίδιος μεταξύ των δύο κατηγοριών φύλλων (πίνακας I). Επίσης εξετάστηκε η πιθανή ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ συγκέντρωσης χλωροφυλλών και ανθοκυανινών στα φύλλα (εικόνα 10) όπου προέκυψε ότι οι διαφορές στην συγκέντρωση των χλωροφυλλών δεν μπορεί να αποδοθούν σε σημαντικό ποσοστό στο ανθοκυανικό περιεχόμενο.

*Πίνακας I. Πάχος ελάσματος και συγκέντρωση χρωστικών για τα φύλλα των δύο κατηγοριών του φυτού Berberis cretica. Οι τιμές αποτελούν μέσο όρο 10 επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα του μέσου (-: μη σημαντικό, *: P<5%, **: P<1%).*

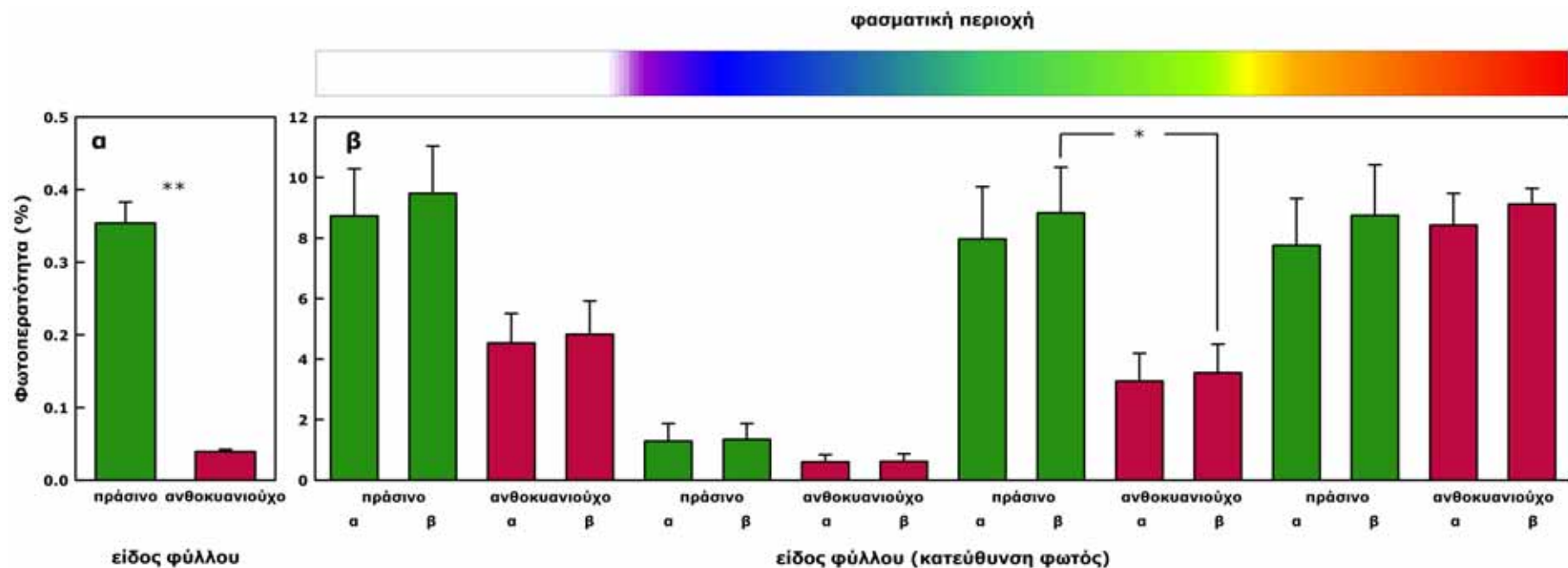
	πράσινα φύλλα		ανθοκυανιούχα φύλλα
πάχος ελάσματος (μm)	188 ± 8	-	211 ± 11
συγκέντρωση Chla+b (μg cm ⁻²)	0.307 ± 0.019	*	0.229 ± 0.025
λόγος Chla/Chlb	3.77 ± 0.08	-	3.72 ± 0.19
συγκέντρωση Anth (nmol κυανιδίνης cm ⁻²)	-	**	125 ± 13



Εικόνα 10. Γραμμική συσχέτιση μεταξύ ανθοκυανικού περιεχομένου των φύλλων και συγκέντρωσης χλωροφυλλών μεταξύ των δειγμάτων. r^2 0.5860 (για όλες τις τιμές), r^2 0.3422 (για τις τιμές των ανθοκυανιούχων φύλλων).

Η φωτοπερατότητα των φύλλων μετρήθηκε με δύο διαφορετικές μεθοδολογίες (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Η μέτρηση μέσω μικροσκοπίου έδωσε αρκετά διαφορετικές απόλυτες τιμές αλλά και σχετικές διαφορές μεταξύ των δύο κατηγοριών φύλλων συγκριτικά με την απευθείας μέτρηση μέσω φωτομέτρου (εικόνα 11). Ωστόσο, σύμφωνα με το σύνολο των αποτελεσμάτων, τα ανθοκυανιούχα φύλλα απορροφούν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό της προσπίπτουσας ακτινοβολίας συγκριτικά με τα πράσινα. Η διαφορά αυτή αποδίδεται κυρίως στην πράσινη και δευτερευόντως στην μπλε περιοχή του ορατού φάσματος (εικόνα 11). Το γεγονός αυτό συμφωνεί με την υπόθεση ότι η μείωση της φωτοπερατότητας στα ανθοκυανιούχα 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 μπλε περιοχή ενώ εμφανίζουν μηδενική απορρόφηση στην κόκκινη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Πράγματι, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, δεν παρατηρείται διαφορά στην φωτοπερατότητα των δύο κατηγοριών φύλλων στο κόκκινο φως

(εικόνα 11). Από την άλλη πλευρά, η μείωση της φωτοπερατότητας των ανθοκυανιούχων φύλλων δεν μπορεί να αποδοθεί σε οποιονδήποτε βαθμό σε διαφορές στο πάχος του ελάσματος ή σε διαφορές στο περιεχόμενο σε χλωροφύλλες καθώς δεν υπάρχουν διαφορές στο πάχος ενώ οι διαφορές στην συγκέντρωση των χλωροφυλλών μεταξύ πράσινων και ανθοκυανιούχων φύλλων είναι προς την αντίθετη κατεύθυνση. Τέλος, μικρές διαφορές εντός της ίδιας κατηγορίας φύλλων παρατηρήθηκαν όταν η κατεύθυνση του φωτός ήταν αντίθετη του φυσιολογικού, δηλαδή από την αποαξονική προς την προσαξονική επιφάνεια (εικόνα 11).



Εικόνα 11. Φωτοπερατότητα των πράσινων και ανθοκυανιούχων φύλλων όπως μετρήθηκε μέσω μικροσκοπίας / ανάλυσης εικόνας (α) ή απευθείας μέσω φωτομέτρου (β). Στην δεύτερη ομάδα μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε λευκό, μπλε, πράσινο ή κόκκινο φως ενώ οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν φωτίζοντας την προσαξονική επιφάνεια και μετρώντας το φως που εξέρχεται από την αποαξονική επιφάνεια (κατεύθυνση φωτός α) ή αντίστροφα φωτίζοντας την αποαξονική επιφάνεια και μετρώντας το φως που εξέρχεται από την προσαξονική επιφάνεια (κατεύθυνση φωτός β). Οι τιμές αποτελούν μέσο όρο 5 (α) ή 3 (β) επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα του μέσου (-: μη σημαντικό, *: $P < 5\%$, **: $P < 1\%$).

II. Φωτοχημική και φωτοσυνθετική απόδοση των φύλλων

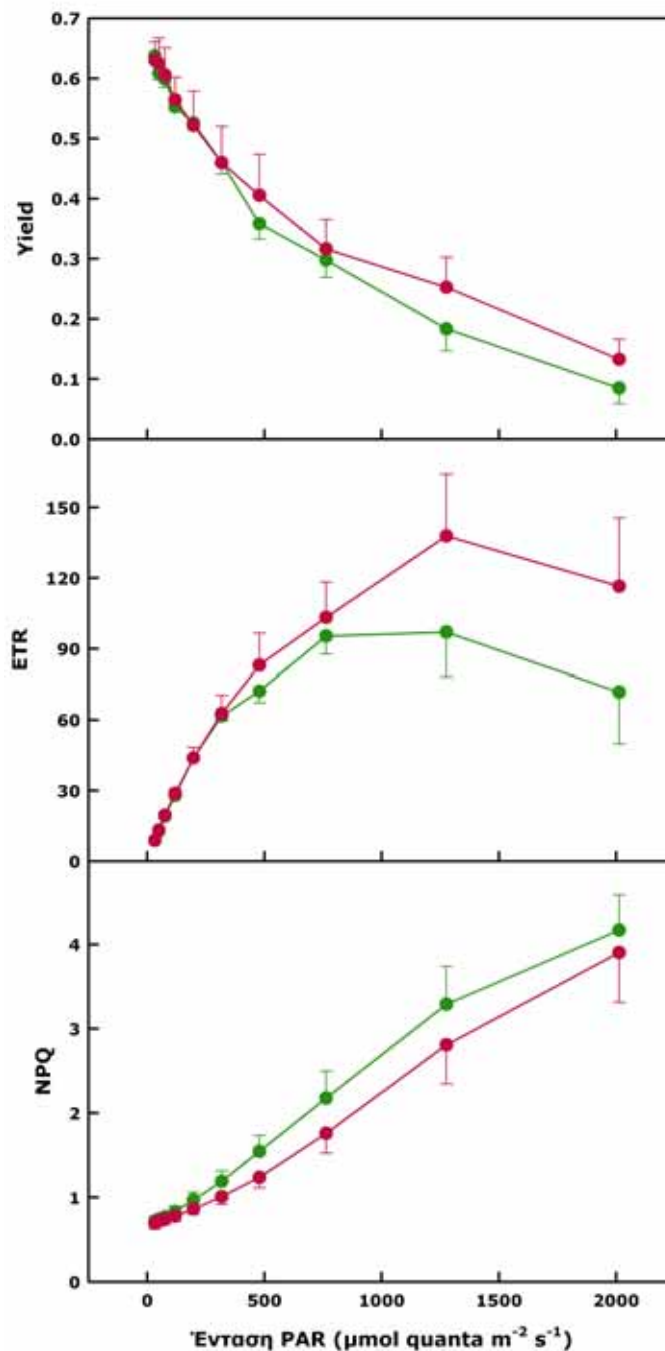
II.1. Μετρήσεις σε νεαρά φυτά σε γλάστρες

Πίνακας II. Αρχικός (F_o), μέγιστος φθορισμός χλωροφύλλης (F_m) και θεμελιώδης φωτοχημική ικανότητα (Φ_{PSII_0}) για τα φύλλα των δύο κατηγοριών του φυτού *Berberis cretica*. Οι τιμές ελήφθησαν από νεαρά φυτά σε γλάστρες και αποτελούν μέσο όρο 5 επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα του μέσου (-: μη σημαντικό, *: $P < 5\%$, **: $P < 1\%$).

	πράσινα φύλλα		ανθοκυανιούχα φύλλα
F_o	0.223 ± 0.006	-	0.207 ± 0.013
F_m	0.987 ± 0.020	-	0.959 ± 0.049
Φ_{PSII_0}	0.774 ± 0.004	-	0.785 ± 0.007

Στον πίνακα II παρουσιάζεται ο αρχικός όσο και ο μέγιστος φθορισμός καθώς και η θεμελιώδης φωτοχημική ικανότητα του PSII. Η παράμετρος F_o σχετίζεται με το βαθμό ενεργοποίησης των κέντρων αντίδρασης των PSII ή / και την ικανότητα μεταφοράς της ενέργειας διέγερσης από τις αντέννες φωτοσυλλογής προς τα φωτοχημικά κέντρα (Demmig and Björkman, 1987) ενώ η παράμετρος F_m με την ικανότητα διοχέτευσης της ενέργειας διέγερσης προς την φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων (Bolhàr-Nordenkampf and Öquist, 1993). Οι παράμετροι αυτές δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο κατηγορίες φύλλων. Η φωτοχημική απόδοση του PSII (Yield), ο ρυθμός γραμμικής ροής ηλεκτρονίων (ETR) καθώς και η μη φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού της χλωροφύλλης (NPQ) συναρτηθεί της έντασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (PAR) μεταξύ πράσινων και ανθοκυανιούχων φύλλων του φυτού *Berberis cretica*, παρουσιάζονται στην εικόνα 12. Παρατηρείται πως η ανά φωτόνιο απόδοση του PSII μειώνεται καθώς η ένταση της προσπίπτουσας φωτοσυνθετικά ενεργής ακτινοβολίας αυξάνεται. Το φαινόμενο αυτό είναι φυσιολογική αντίδραση του φωτοχημικού μηχανισμού και προκαλείται επειδή στις υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας η ενέργεια που απορροφάται από τις

φωτοσυνθετικές χρωστικές υπερβαίνει εκείνη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή φωτοσυνθετικού έργου. Αντίστοιχα, η ETR αυξάνεται προσεγγίζοντας μια μέγιστη τιμή κατά αντιστοιχία με την φωτοσυνθετική ταχύτητα συναρτήσει της έντασης της προσπίπτουσας φωτεινής ακτινοβολίας (συγκρ. εικόνα 12 με εικόνα 14). Αντίστοιχα, η NPQ αυξάνεται υποδηλώνοντας πως η περίσσεια ενέργειας αποσβένεται με τη μορφή θερμότητας, κυρίως μέσω του κύκλου των ξανθοφυλλών (Bilger and Bjorkman, 1990) (καμπύλη NPQ/PAR, εικόνα 12). Μεταξύ των δύο κατηγοριών φύλλων, παρατηρούμε πως τα ανθοκυανιούχα εμφανίζουν υψηλότερη φωτοχημική απόδοση στις υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας (καμπύλη Yield/PAR, εικόνα 12). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την καλύτερη απόδοση της φωτοχημικής συσκευής των ανθοκυανιούχων φύλλων η οποία οφείλεται στο μικρότερο βαθμό φωτοαναστολής στις υψηλές εντάσεις PAR σε σύγκριση με τα πράσινα φύλλα. Επιπλέον, ενώ η ETR παρουσιάζει την ίδια κλίση στις χαμηλές εντάσεις PAR, είναι υψηλότερη σε εντάσεις PAR υψηλότερες των 500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και εμφανίζει υψηλότερη τιμή φωτοκορεσμού για τα ανθοκυανιούχα φύλλα συγκριτικά με τα πράσινα (καμπύλη ETR/PAR, εικόνα 12). Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτά, τα ανθοκυανιούχα φύλλα δεν υστερούν στην διείσδυση της χαμηλής έντασης φωτοσυνθετικά αποδοτικής ακτινοβολίας στο εσωτερικό τους ενώ ταυτόχρονα εμφανίζονται περισσότερο ανθεκτικά στην φωτοαναστολή συγκριτικά με τα πράσινα φύλλα στις υψηλές εντάσεις PAR. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, η μη φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού αυξάνεται στα πράσινα φύλλα σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι στα ανθοκυανιούχα πιθανότατα λόγω συσσώρευσης περίσσειας ενέργειας στις αντέννες φωτοσυλλογής (καμπύλη NPQ/PAR).



Εικόνα 12. Καμπύλες εξάρτησης της φωτοχημικής απόδοσης, του ρυθμού γραμμικής ροής ηλεκτρονίων και της μη φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης από την ένταση της προσπίπτουσας φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας. Με πράσινα σύμβολα παριστάνονται τα πράσινα φύλλα και με κόκκινα σύμβολα τα ανθοκυανιούχα. Οι τιμές ελήφθησαν από νεαρά φυτά σε γλάστρες και αποτελούν μέσο όρο 5 επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα του μέσου.

II.2. Μετρήσεις σε ώριμα φυτά στο έδαφος

Αντίστοιχης κατεύθυνσης, αλλά εντονότερες διαφορές έδωσε η μελέτη των φωτοχημικών χαρακτηριστικών των φύλλων σε φυτά τα οποία αναπτύσσονταν στο πεδίο. Στα φυτά αυτά, τα ανθοκυανιούχα φύλλα παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη θεμελιώδη φωτοχημική ικανότητα σε σύγκριση με τα πράσινα φύλλα πιθανά λόγω μικρότερου βαθμού φωτοαναστολής από την επίδραση των φυσικών επιπέδων φωτεινής ακτινοβολίας (πίνακας III).

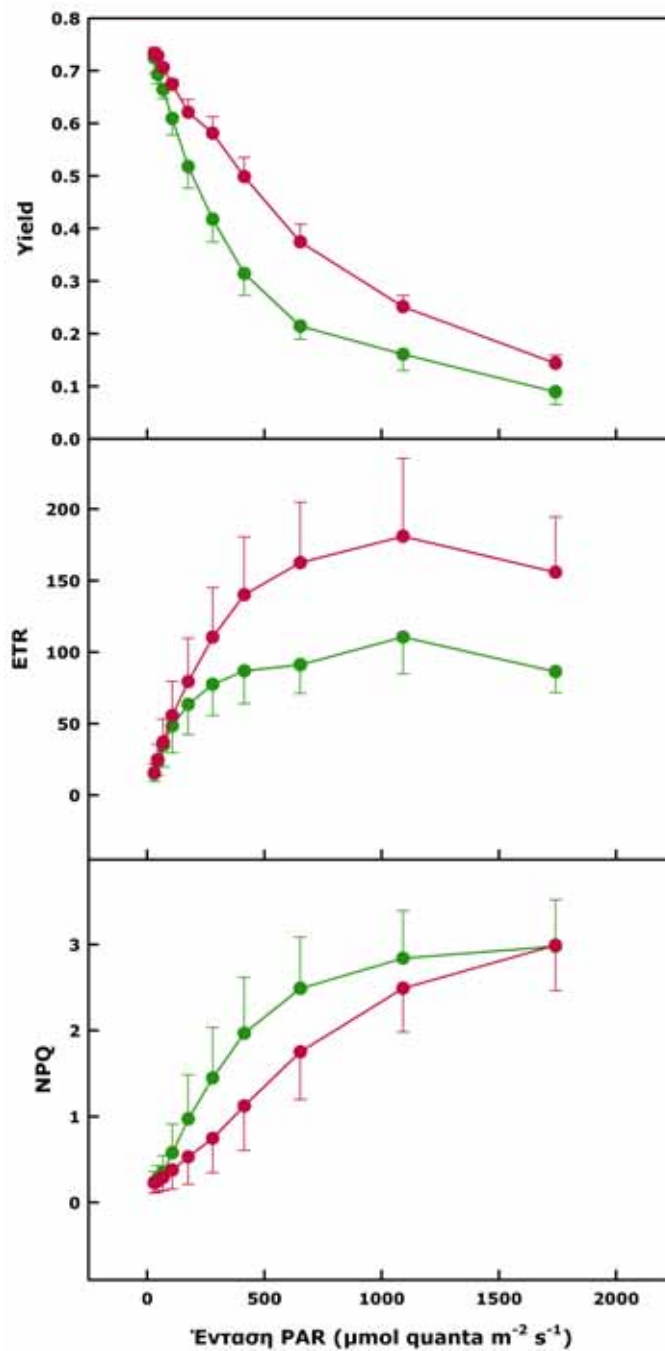
*Πίνακας III. Αρχικός (F_o), μέγιστος φθορισμός χλωροφύλλης (F_m) και θεμελιώδης φωτοχημική ικανότητα (Φ_{PSII_0}) για τα φύλλα των δύο κατηγοριών του φυτού *Berberis cretica*. Οι τιμές ελήφθησαν από ώριμα φυτά στο έδαφος και αποτελούν μέσο όρο 4 επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα του μέσου (-: μη σημαντικό, *: $P < 5\%$, **: $P < 1\%$).*

	πράσινα φύλλα		ανθοκυανιούχα φύλλα
F_o	0.302 ± 0.013	-	0.309 ± 0.026
F_m	1.355 ± 0.051	-	1.528 ± 0.115
Φ_{PSII_0}	0.777 ± 0.006	*	0.798 ± 0.006

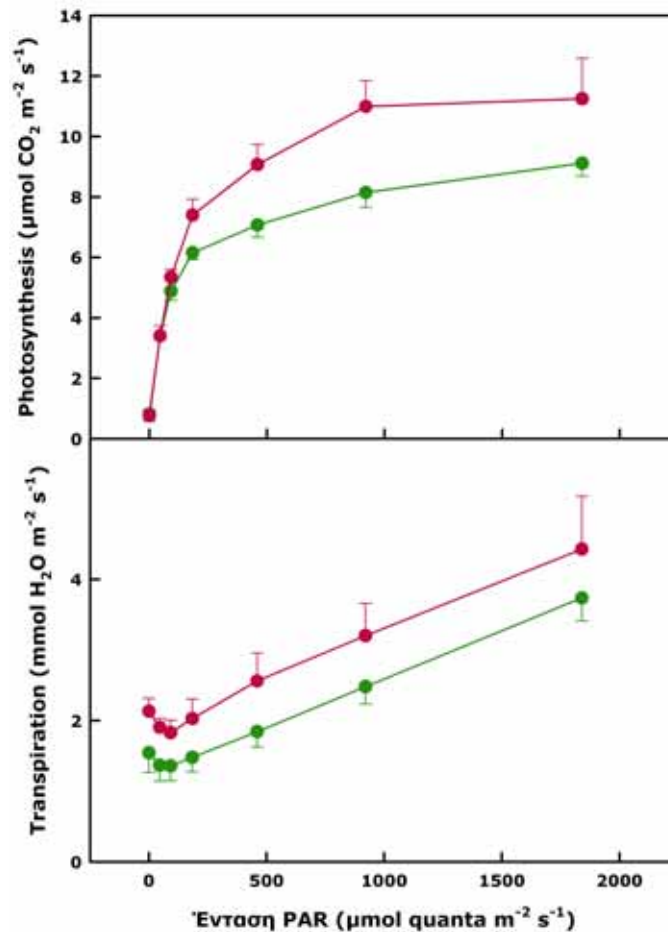
Επιπλέον, τα ανθοκυανιούχα φύλλα των φυτών του πεδίου εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα φωτοχημικής απόδοσης και ETR συγκριτικά με τα πράσινα φύλλα (καμπύλες Yield/PAR και ETR/PAR, εικόνα 13). Επιπλέον, η NPQ των πράσινων φύλλων ήταν σημαντικά υψηλότερη ακόμα και σε εντάσεις PAR πολύ χαμηλότερες της έντασης φωτοκορεσμού σε σύγκριση με τα ανθοκυανιούχα φύλλα (καμπύλη NPQ/PAR, εικόνα 13). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα πράσινα φύλλα των φυτών του πεδίου εμφανίστηκαν ιδιαίτερα επιρρεπή στην φωτοαναστολή αντίθετα με τα ανθοκυανιούχα φύλλα τα οποία παρουσίασαν ιδιαίτερη ανθεκτικότητα. Ωστόσο και τα ανθοκυανιούχα φύλλα εμφάνισαν φωτοαναστολή σε εντάσεις PAR υψηλότερες των $1100 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (εικόνα 13).

Η μέτρηση της φωτοσυνθετικής ταχύτητας των φύλλων των δύο κατηγοριών συναρτήσεως της έντασης της PAR (εικόνα 14) έδωσε αποτελέσματα τα οποία συνάδουν με τις μετρήσεις των φωτοχημικών

παραμέτρων. Τα ανθοκυανιούχα φύλλα έδειξαν σημαντικά υψηλότερες τιμές φωτοσυνθετικής ταχύτητας σε εντάσεις υψηλότερες των 200 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ περίπου συγκριτικά με τα πράσινα φύλλα (καμπύλη Photosynthesis/PAR, εικόνα 14). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαφορά που παρατηρήθηκε στον διαπνευστικό ρυθμό μεταξύ των δύο κατηγοριών φύλλων (καμπύλη Transpiration/PAR, εικόνα 14). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν πως η διαφορά στην φωτοσυνθετική ταχύτητα μπορεί να οφείλεται αφενός στην υψηλότερη φωτοχημική απόδοση των ανθοκυανιούχων φύλλων και αφετέρου στην υψηλότερη ταχύτητα διαπνοής των φύλλων αυτών.



Εικόνα 13. Καμπύλες εξάρτησης της φωτοχημικής απόδοσης, του ρυθμού γραμμικής ροής ηλεκτρονίων και της μη φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης από την ένταση της προσπίπτουσας φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας. Με πράσινα σύμβολα παριστάνονται τα πράσινα φύλλα και με κόκκινα σύμβολα τα ανθοκυανιούχα. Οι τιμές ελήφθησαν από ώριμα φυτά στο έδαφος και αποτελούν μέσο όρο 4 επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα του μέσου.



Εικόνα 14. Καμπύλες εξάρτησης της φωτοσυνθετικής ταχύτητας και του ρυθμού διαπνοής από την ένταση της προσπίπτουσας φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας. Με πράσινα σύμβολα παριστάνονται τα πράσινα φύλλα και με κόκκινα σύμβολα τα ανθοκυανιούχα. Οι τιμές ελήφθησαν από ώριμα φυτά στο έδαφος και αποτελούν μέσο όρο 4 επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα του μέσου.

II.3. Μετρήσεις φωτοχημικής απόδοσης του σπογγώδους παρεγχύματος των φύλλων

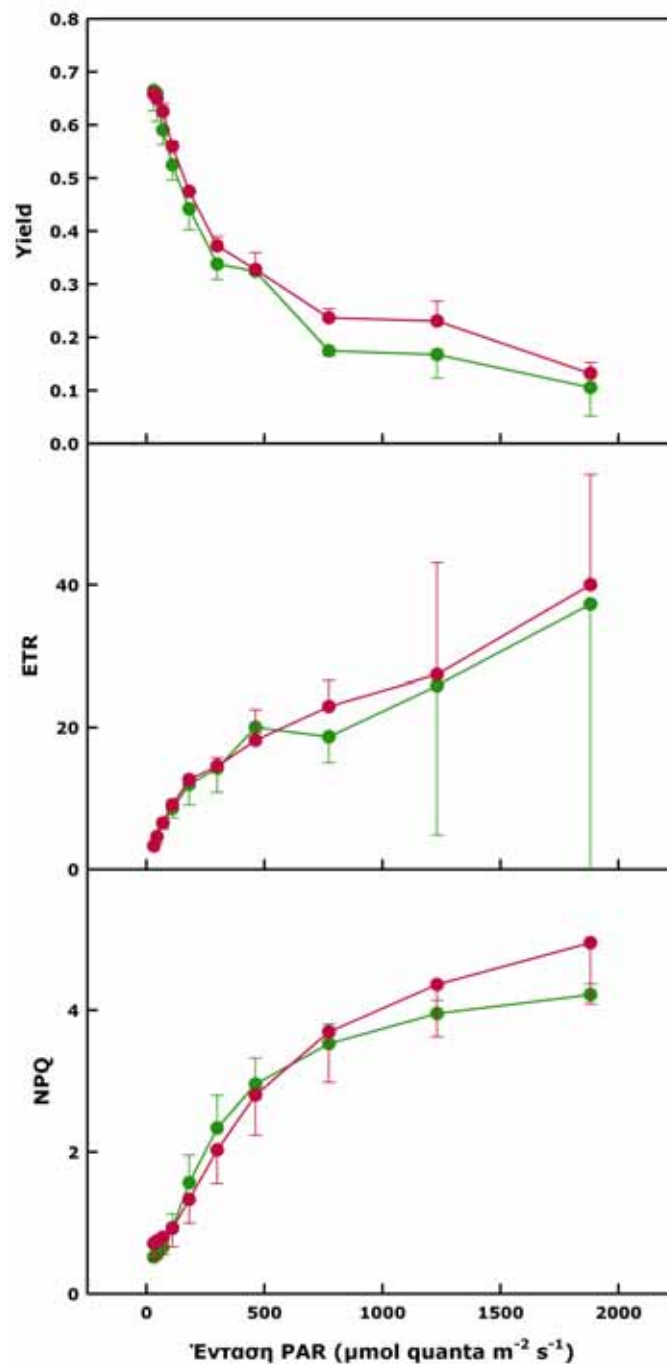
Οι μετρήσεις των φωτοχημικών παραμέτρων των κυττάρων του σπογγώδους παρεγχύματος των φύλλων πραγματοποιήθηκαν με την προσαρμογή του οπτικού μέρους του φθορισμομέτρου στην αποαξονική επιφάνεια των φύλλων. Με τον τρόπο αυτό η επαγωγή και η καταγραφή του φθορισμού γίνεται στα κατώτερα στρώματα του φωτοσυνθετικού παρεγχύματος των φύλλων τα οποία συνίστανται από κύτταρα του σπογγώδους παρεγχύματος. Η

διάκριση αυτή είναι εφικτή καθώς ο φθορισμός της χλωροφύλλης ο οποίος συλλέγεται από το οπτικό μέρος του οργάνου προέρχεται από τα επιφανειακά στρώματα του ιστού ο οποίος μετράται.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι δύο κατηγορίες φύλλων εμφανίζουν παρόμοιες τιμές των παραμέτρων του αρχικού και μέγιστου φθορισμού καθώς και της θεμελιώδους φωτοχημικής ικανότητας (πίνακας IV). Επίσης, οι φωτοχημικές παράμετροι συναρτήσεως της έντασης της PAR παρουσίασαν παρόμοια κινητική μεταξύ ανθοκυανιούχων και πράσινων φύλλων (εικόνα 15).

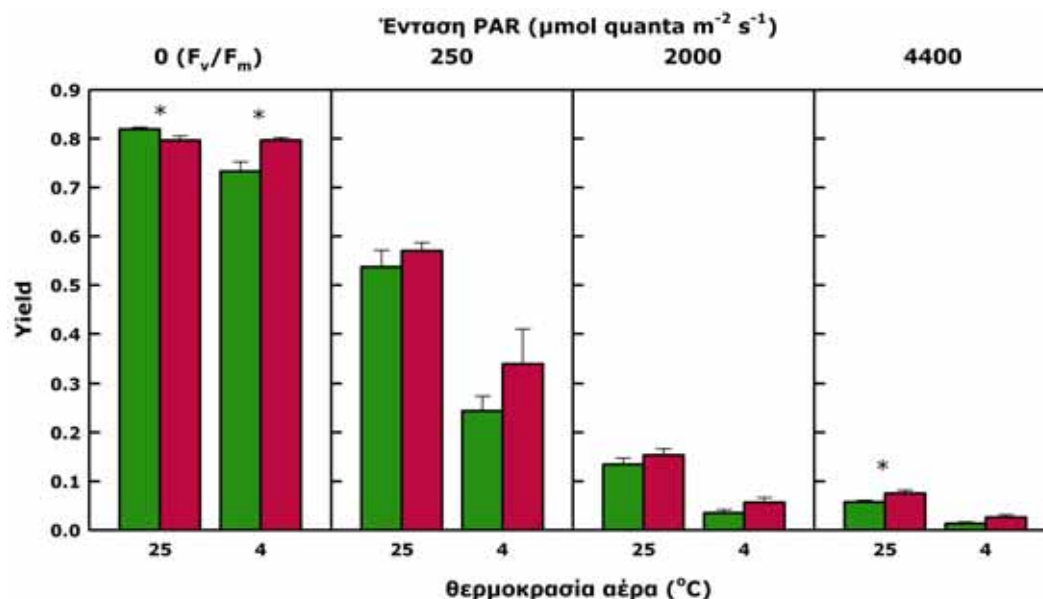
*Πίνακας IV. Αρχικός (F_o), μέγιστος φθορισμός χλωροφύλλης (F_m) και θεμελιώδης φωτοχημική ικανότητα (Φ_{PSII_o}) για τα φύλλα των δύο κατηγοριών του φυτού *Berberis cretica*. Οι τιμές ελήφθησαν φωτίζοντας και καταγράφοντας τον φθορισμό χλωροφύλλης της αποαξονικής επιφάνειας των φύλλων νεαρών φυτών σε γλάστρες και αποτελούν μέσο όρο 3 επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα του μέσου (-: μη σημαντικό, *: $P < 5\%$, **: $P < 1\%$).*

	πράσινα φύλλα		ανθοκυανιούχα φύλλα
F_o	0.309 \pm 0.008	-	0.304 \pm 0.008
F_m	1.410 \pm 0.035	-	1.435 \pm 0.069
Φ_{PSII_o}	0.780 \pm 0.011	-	0.788 \pm 0.005



Εικόνα 15. Καμπύλες εξάρτησης της φωτοχημικής απόδοσης, του ρυθμού γραμμικής ροής ηλεκτρονίων και της μη φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης από την ένταση της προσπίπτουσας φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας. Με πράσινα σύμβολα παριστάνονται τα πράσινα φύλλα και με κόκκινα σύμβολα τα ανθοκυανιούχα. Οι τιμές ελήφθησαν φωτίζοντας και καταγράφοντας τον φθορισμό χλωροφύλλης της αποαξονικής επιφάνειας των φύλλων νεαρών φυτών σε γλάστρες και αποτελούν μέσο όρο 3 επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα του μέσου

III. Μετρήσεις φωτοχημικής απόδοσης των φύλλων υπό συνθήκες φωτοαναστολής



Εικόνα 16. Θεμελιώδης φωτοχημική ικανότητα (F_v / F_m) και φωτοχημική απόδοση σε αυξανόμενες τιμές έντασης προσπίπτουσας φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας για τα φύλλα των δύο κατηγοριών του φυτού *Berberis cretica* υπό δύο διαφορετικές θερμοκρασίες αέρα. Οι τιμές ελήφθησαν από κομμένους κλάδους ώριμων φυτών στο έδαφος και αποτελούν μέσο όρο 5 επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα του μέσου (-: μη σημαντικό, *: $P < 5\%$, **: $P < 1\%$).

Για να ελεγχθεί κατά πόσο η ύπαρξη ανθοκυανινών στα φύλλα συμβάλλει στην φωτοπροστασία, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της θεμελιώδους φωτοχημικής ικανότητας και της φωτοχημικής απόδοσης μεταξύ των δύο κατηγοριών φύλλων υπό συνθήκες οι οποίες αυξάνουν την πιθανότητα φωτοαναστολής. Δύο παράμετροι του περιβάλλοντος ρυθμίστηκαν σε επίπεδα δυσμενή για την φωτοσυνθετική λειτουργία των φύλλων. Η πρώτη αφορούσε στην θερμοκρασία του αέρα (4 °C με μάρτυρα στους 25 °C) ενώ η δεύτερη, η οποία εφαρμόστηκε σε συνδυασμό με την πρώτη, ήταν η ένταση της PAR η οποία προοδευτικά αυξήθηκε στα 4400 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Απουσία φωτός, η φωτοχημική ικανότητα των πράσινων φύλλων μειώθηκε αισθητά όταν η θερμοκρασία μειώθηκε από τους 25 °C στους 4 °C ενώ αυτή των ανθοκυανιούχων φύλλων παρέμεινε σταθερή (εικόνα 16). Υπό την παρουσία φωτός και σε όλες τις τιμές έντασης, η φωτοχημική απόδοση των φύλλων σε

θερμοκρασία 25 °C ήταν φανερά υψηλότερη αυτής των φύλλων σε θερμοκρασία 4 °C ανεξαρτήτως της παρουσίας ή όχι του ανθοκυανικού φίλτρου. Ωστόσο, η παρουσία των ανθοκυανινών είχε ως αποτέλεσμα την διατήρηση της φωτοχημικής απόδοσης σε υψηλότερα επίπεδα. Το φαινόμενο αυτό ήταν εντονότερο στην χαμηλή θερμοκρασία και επίσης εντονότερο στο συνδυασμό χαμηλής θερμοκρασίας και υψηλών εντάσεων PAR (εικόνα 16).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Προκαταρκτικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι στο φυτό *Berberis cretica* συνυπάρχουν πράσινα και ανθοκυανιούχα φύλλα. Συγκεκριμένα, ο χαρακτήρας “κόκκινα φύλλα” εμφανίζεται σε φύλλα τα οποία βρίσκονται εκτεθειμένα στο πλήρες ηλιακό φως ενώ φύλλα τα οποία βρίσκονται κάτω από μερική σκίαση παραμένουν πράσινα. Λόγω αυτής της ιδιαιτερότητας, εξετάστηκαν συγκεκριμένες ανατομικές παράμετροι καθώς και η συγκέντρωση των χλωροφυλλών ώστε να αποκλειστεί πιθανή παραλλακτικότητα μεταξύ των δύο κατηγοριών φύλλων και συγκεκριμένα ύπαρξη του συνδρόμου σκίασης στα πράσινα φύλλα. Οι μετρήσεις κατέδειξαν ότι οι δύο κατηγορίες φύλλων δεν εμφανίζουν διαφορές λόγω διαφορετικού φωτεινού καθεστώτος. Συγκεκριμένα, τόσο το πάχος του ελάσματος όσο και ο λόγος των δύο χλωροφυλλών εμφανίστηκε ίδιος γεγονός το οποίο υποδηλώνει πως οι δύο κατηγορίες φύλλων είναι ομοιογενείς από πλευράς του φωτεινού περιβάλλοντος στο οποίο έχουν εγκλιματιστεί (Brugnoli et al., 1994; Bertamini and Nedunchezian, 2002).

Σύμφωνα με τις μετρήσεις φωτοπερατότητας, η ύπαρξη ανθοκυανινών έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της έντασης του φωτός το οποίο διέρχεται από το έλασμα του φύλλου. Πιο συγκεκριμένα, η μείωση αυτή οφείλεται κυρίως στην απορρόφηση φωτονίων της πράσινης και μπλε περιοχής (Neill and Gould, 1999). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως η ύπαρξη ανθοκυανινών δεν αποβαίνει εις βάρος της περατότητας τουλάχιστον των φωτονίων της φωτοσυνθετικά ενεργής κόκκινης περιοχής του φάσματος.

Περαιτέρω, η μελέτη των φωτοχημικών και φωτοσυνθετικών χαρακτηριστικών των φύλλων των δύο κατηγοριών έδειξε ότι τα ανθοκυανιούχα φύλλα όχι μόνο δεν υστερούν όσον αφορά στην φωτοχημική και φωτοσυνθετική τους απόδοση συγκριτικά με τα πράσινα αλλά παρουσιάζουν σε όλες τις περιπτώσεις υψηλότερες τιμές, ιδιαίτερα σε εντάσεις ακτινοβολίας κοντά στον φωτοκορεσμό. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν ληφθεί και σε ανθοκυανιούχα φύλλα

άλλων φυτικών ειδών (Gould et al., 1995; Liakopoulos et al., 2006). Το γεγονός αυτό μπορεί να σχετίζεται με την αποτροπή ή την μείωση της φωτοαναστολής στις υψηλές εντάσεις φωτεινής ακτινοβολίας. Από την άλλη πλευρά, το ενδεχόμενο της υψηλότερης τιμής φωτοκορεσμού των ανθοκυανιούχων φύλλων λόγω μείωσης της φωτοπερατότητας δεν φαίνεται να ισχύει καθώς σε χαμηλές εντάσεις ακτινοβολίας τα φύλλα αυτά παρουσιάζουν πανομοιότυπες τιμές φωτοχημικής ροής ηλεκτρονίων και φωτοσυνθετικού ρυθμού με τα πράσινα. Ωστόσο, ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατηρούμενη υψηλότερη διαπνευστική δραστηριότητα των ανθοκυανιούχων φύλλων συγκριτικά με τα πράσινα. Η διαφορά αυτή δικαιολογεί σε μεγάλο βαθμό την παρατηρούμενη υψηλότερη φωτοσυνθετική ταχύτητα των φύλλων αυτών. Το ενδεχόμενο να αποδίδονται αυτές οι διαφορές στην ύπαρξη των ανθοκυανινών ή σε άλλο παράγοντα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Η συγκριτική μελέτη των φωτοχημικών παραμέτρων των κυττάρων του σπογγώδους παρεγχύματος κατέδειξε πως δεν υφίστανται εγγενείς διαφορές μεταξύ των δύο κατηγοριών φύλλων και πως οι όποιες διαφορές εμφανίζονται στα φωτοχημικά χαρακτηριστικά των κυττάρων του δρυφρακτοειδούς παρεγχύματος ή στα φωτοσυνθετικά χαρακτηριστικά των φύλλων είναι πιθανότερο να οφείλονται στην ύπαρξη του ανθοκυανικού φίλτρου. Πιο συγκεκριμένα, από τις μετρήσεις των φωτοχημικών παραμέτρων των κυττάρων του σπογγώδους παρεγχύματος των φύλλων διασαφηνίστηκε ότι οι διαφορές στις φωτοχημικές παραμέτρους μεταξύ των δύο κατηγοριών φύλλων είναι πιθανότερο να οφείλονται στην μείωση της έντασης ή / και της φασματικής σύστασης της φωτεινής ακτινοβολίας ως αποτέλεσμα της παρουσίας των ανθοκυανινών. Αυτό το συμπέρασμα προκύπτει από το γεγονός ότι τα κύτταρα του σπογγώδους παρεγχύματος δεν εμφάνισαν διαφορές αντίστοιχες με αυτές που εμφανίζουν τα κύτταρα του δρυφρακτοειδούς παρεγχύματος σε συνδυασμό με το ότι η παρουσία του

ανθοκυανικού φίλτρου στην αποαξονική επιφάνεια είναι πολύ λιγότερο έντονη συγκριτικά με την προσαξονική επιφάνεια και επομένως η διέλευση του φωτός από την αποαξονική επιφάνεια του φύλλου και μέχρι την απορρόφησή του από τα κύτταρα του σπογγώδους παρεγχύματος δεν συνοδεύεται από έντονες αλλαγές λόγω απορρόφησης από τα μόρια των ανθοκυανινών, αντίστοιχες με αυτές που υφίσταται κατά την διέλευσή του από την προσαξονική επιφάνεια έως την απορρόφησή του από τα κύτταρα του δρυφρακτοειδούς παρεγχύματος. Εάν οι διαφορές στις φωτοχημικές παραμέτρους μεταξύ των δύο κατηγοριών φύλλων οφείλονταν σε θεμελιώδεις διαφορές μεταξύ τους προερχόμενες στις συνθήκες εγκλιματισμού των φύλλων όπως το φωτεινό περιβάλλον, τα κύτταρα του σπογγώδους παρεγχύματος θα εμφάνιζαν διαφορές αντίστοιχες με αυτές των κυττάρων του δρυφρακτοειδούς παρεγχύματος καθώς θα είχαν δεχθεί αντίστοιχα ερεθίσματα εγκλιματισμού.

Το φωτοπροστατευτικό δυναμικό των ανθοκυανιούχων φύλλων εκτιμήθηκε επιπλέον μέσω πειραμάτων φωτοαναστολής. Χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό δύο φωτοανασταλτικές συνθήκες, αυτή των υψηλών εντάσεων ακτινοβολίας και αυτή της χαμηλής θερμοκρασίας. Και οι δύο χειρισμοί είχαν ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση της φωτοχημικής απόδοσης των φύλλων ενώ σε κάθε περίπτωση τα ανθοκυανιούχα φύλλα παρουσίασαν χαμηλότερο βαθμό φωτοαναστολής συγκριτικά με τα πράσινα. Το αποτέλεσμα αυτό συνδέει την ύπαρξη ανθοκυανινών με την αυξημένη αντοχή στην φωτοαναστολή των φύλλων του φυτού *Berberis cretica*, ιδιαίτερα κάτω από δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Andersson, B. and Barber, J. 1996. Mechanisms of photodamage and protein degradation during photoinhibition of photosystem II. In: N.R. Baker (ed) *Photosynthesis and the environment*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp 101-121
- Anderson, J.M., Park, Y.-I., Chow, W.S. 1997. Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in nature. *Physiologia Plantarum*, 100:214-223
- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50:601-639
- Barker, D.H., Seaton, G.G.R., and Robinson, S.A. 1997. Internal and external photoprotection in developing leaves of the CAM plant *Cotyledon orbiculata*. *Plant, Cell and Environment* 20:617-624
- Baroli, I. and Niyogi, KK. 2000. Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 355:1385-1394
- Bertamini, M., Nedunchezian, N. 2002. Leaf pigments, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, nitrate reductase and photosynthetic efficiency of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir) grown under different light conditions. *Vitis*, 41:169-175
- Bilger, W., Bjorkman, 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*. *Photosynthesis Research*, 25: 173-185.
- Bolhàr-Nordenkamp, H.R. and G.O. Öquist. 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In *Photosynthesis and Production in a Changing Environment: A Field and Laboratory Manual*. Eds. D.O. Hall, J.M.O. Scurlock, H.R. Bolhàr-Nordenkamp, R.C. Leegood and S.P. Long. Chapman and Hall, London, pp 193-206
- Brugnoli, E., Cona, A., Lauteri, M. 1994. Xanthophyll cycle components and capacity for non-radiative energy dissipation in sun and shade leaves of *Ligustrum ovalifolium* exposed to conditions limiting photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 41:451-463.

Bukhov, N.G., Kopecky, J., Pfundel, E.E., Klughammer, C. and Heber, U. 2001. A few molecules of zeaxanthin per reaction center of photosystem II permit effective thermal dissipation of light energy in photosystem II of a poikilohydric moss. *Planta*, 212:739-748

Choudhury, N.K. and Behera, N.K. 2001. Photoinhibition of photosynthesis: Role of carotenoids in photoprotection of chloroplast constituents. *Photosynthetica* 39:481-488

Cogdell, R.J. and Frank, H.A. 1987. How carotenoids function in photosynthetic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 895:63-79

Demmig-Adams, B. 1990. Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1020:1-24

Demmig-Adams, B. and Adams, W.W. 1996. The role of xanthophylls cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, 1:21-26

Demmig, B., Björkman, O. 1987. Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77K) and photon yield of O₂ evolution in leaves of higher plants. *Planta*, 171: 171-184.

Eskling, M., Arvidsson, P.-O. and Akerlund, H.-E. 1997. The xanthophylls cycle, its regulation and components. *Physiologia Plantarum*, 100:806-816

Foyer CH., Lelandais M. and Knnert KJ. 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 92:696-717

Foyer, C.H. and Noctor, G. 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytologist*, 146:359-388

Genty, B., Brintais, J.-M., Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990: 87-92.

Gilmore, A.M. 1997. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiologia Plantarum*, 99:197-209

Gilmore, A.M. and Govindjee 1999. How higher plants respond to excess light: Energy dissipation in photosystem II. In: G.S.Singhal,

G. Renger, S.K. Sopory, K.-D. Irrang, Govindjee (eds), Concepts in photobiology: Photosynthesis and photomorphogenesis, New Delhi: Narosa Publishing House, pp. 513-548

Gould, K.S., Kuhn, D.N., Lee, D.W., Oberbauer, S.F. 1995. Why leaves are sometimes red. *Nature*, 378:241-242

Gould, K.S., Neill, S.O., Vogelmann, T.C. 2002. A unified explanation for anthocyanins in leaves? *Advances in Botanical Research*, 37:167-192

Govindjee 1995. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22:131-160

Govindjee 2004. Chlorophyll a fluorescence: a bit of basics and history. Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, C. Papageorgiou and Govindjee (eds.), Springer, pp. 1-42.

Grudzinski, W., Matula, M., Siewiewiesiuk, J., Kerner, P., Krupa, Z. and Gruszecki, W.I. 2001. Effect of 13-cis violaxanthin on organization of light harvesting complex II in monomolecular layers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1503:291-302

Hall, D.O. and Rao, K.K. 1999. Photosynthesis. Cambridge: Cambridge University Press

Horton, P., Ruban, A.V., Young, A.J. 1999. Regulation of the structure and function of the light-harvesting complexes of photosystem II by the xanthophyll cycle. In: H.A. Frank, A.J. Young, G. Britton, R.J. Cogdell (eds), The photochemistry of carotenoids, Vol. 8, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 271-291

Hughes, N.M., Neufeld, H.S., Burkey, K.O. 2005. Functional role of anthocyanins in high-light winter leaves of the evergreen herb *Galax urceolata*. *New Phytologist*, 168:575-587

Karabourniotis, G., Bornman, J.F. 1999. Penetration of UV-A, UV-B and blue light through the leaf trichome layers of two xeromorphic plants, olive and oak, measured by optical fibre probes. *Physiologia Plantarum*, 105:655-661

Karabourniotis, G., Bornman, J.F., Liakoura, V. 1999. Different leaf surface characteristics of three grape cultivars affect leaf optical properties as measured with fibre optics: possible implication in stress tolerance. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26:47-53

Krieger-Liszkay, A. 2005. Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 56:337-346

Kyparissis, A. and Manetas, Y. 1993. Seasonal leaf dimorphism in a semi-deciduous Mediterranean shrub: ecophysiological comparisons between winter and summer leaves. *Acta Oecologia* 14:23-32

Kyparissis, A. Drilias, P. and Manetas, Y. 2000. Seasonal fluctuations in photoprotective (xanthophyll cycle) and photosynthetic (chlorophylls) capacity in eight Mediterranean plant species belonging to two different growth forms. *Australian Journal of Plant Physiology* 27:265-272

Lawlor, D.W. 2001. Photosynthesis. Oxford: Bios Scientific Publishers

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

Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. 603rd Meeting of Biochemical Society Transactions, Liverpool, 11: 591-592

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

Manetas, Y. 2003. The importance of being hairy: the adverse effects of hair removal on stem photosynthesis of *Verbascum speciosum* are due to solar UV-B radiation. *New Phytologist*, 158:503-508

Manetas, Y. 2006. Why some leaves are anthocyanic and why most anthocyanic leaves are red? *Flora*, 201:163-177

Maxwell, K. and Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51:659-668

Minkov, I.N., Janoubjan, G.T., Denev, I.D. and Toneva, V.T. 1999. Photooxidative stress in higher plants. In: M. Pessarakli (ed), Handbook of plant and crop stress, New York: Marcel Dekker, pp. 499-525

Murray, J.R., Hackett, W.P. 1991. Dihydroflavonol reductase-activity in relation to differential anthocyanin accumulation in juvenile and mature phase *Hedera helix* L.. *Plant Physiology*, 97: 343-351.

Neill, S., Gould, K.S. 1999. Optical properties of leaves in relation to anthocyanin concentration and distribution. *Canadian Journal of Botany*, 77:1777-1782

Neubauer, C. and Yamamoto, H.Y. 1992. Mehler-peroxidase reaction mediates zeaxanthin formation and zeaxanthin-related fluorescence quenching in intact chloroplasts. *Plant Physiology*, 99:1354-1361

Neubauer, C. and Yamamoto, H.Y. 1994. Membrane barriers and Mehler-peroxidase reaction limit the ascorbate available for violaxanthin de-epoxidase activity in intact chloroplasts. *Photosynthesis Research*, 39:137-149

Niyogi KK. 2000. Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 3:455-460

Rosso, D., Ivanov, A.G., Fu A., et al. 2006. Immutants does not act as stress-induced safety valve in the protection of the photosynthetic apparatus of *Arabidopsis* during steady-state photosynthesis. *Plant physiology*, 142:574-585

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.

Searle, G., Brody, S. and Hoek, A.V. 1990. Evidence for the formation of a chlorophyll a/ zeaxanthin complex in lecithin liposomes from fluorescence decay kinetics. *Photochemistry and Photobiology*, 52:401-407

Smillie, R.M., Hetherington, S.E. 1999. Photoabatement by anthocyanin shields photosynthetic systems from light stress. *Photosynthetica*, 36:451-463

Štroch, M., Špunda, V. and Kurasová, I. 2004. Non-radiative dissipation of absorbed excitation energy within photosynthetic apparatus of higher plants. *Photosynthetica* 42:323-337

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

Sun, J., Nishio, J.N., Vogelmann, T.C. 1998. Green light drives CO₂ fixation deep within leaves. *Plant and Cell Physiology*, 39(10):1020-1026

Taiz, L and Zeiger, E. 1998. *Plant Physiology*. Sunderland: Sinauer Associates

Trebst, A. 2003. Function of β -carotene and tocopherol in photosystem II. *Z. Naturforsch.* 58:609-620

Trissl, H.W., and Wilhelm, C. 1993. Why do thylakoid membranes from higher plants form grana stacks? *Trends Biochem*, 18:415-419

Wingler, A., Lea, P.J., Quick, W.P. and Leegood R.C. 2000. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences*, 26:2005-2014

Wollman, F-A. 2001. State transition reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *The EMBO Journal*, 20:3623-3630

Young, A.J., Philip, D., Frank, H.A., Ruban, A.V. and Horton, P. 1997. The xanthophylls cycle and carotenoid mediated dissipation of excess excitation energy in photosynthesis. *Pure and Applied Chemistry*, 69:2125-2130

Αιβαλάκης, Γ., Καραμπουρνιώτης, Γ. και Φασσέας, Κ. 2003. Σημειώσεις Γενικής Βοτανικής. Αθήνα: Γεωπονικό Παναπιστήμιο Αθηνών

Γανωτάκης, Δ., Κοτζαμπάσης, Κ. 2003. Φωτοσύνθεση I: Μετατροπή της ηλιακής ακτινοβολίας σε χημική ενέργεια. Εντός: Φυσιολογία Φυτών. Από το μόριο στο περιβάλλον (Ρουμπελάκη- Αγγελάκη, Κ.Α., επιμ.). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σσ: 145-190

Δροσόπουλος, Ι. 1998. Φυσιολογία Φυτών. Αθήνα: Γεωπονικό Παναπιστήμιο Αθηνών

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

