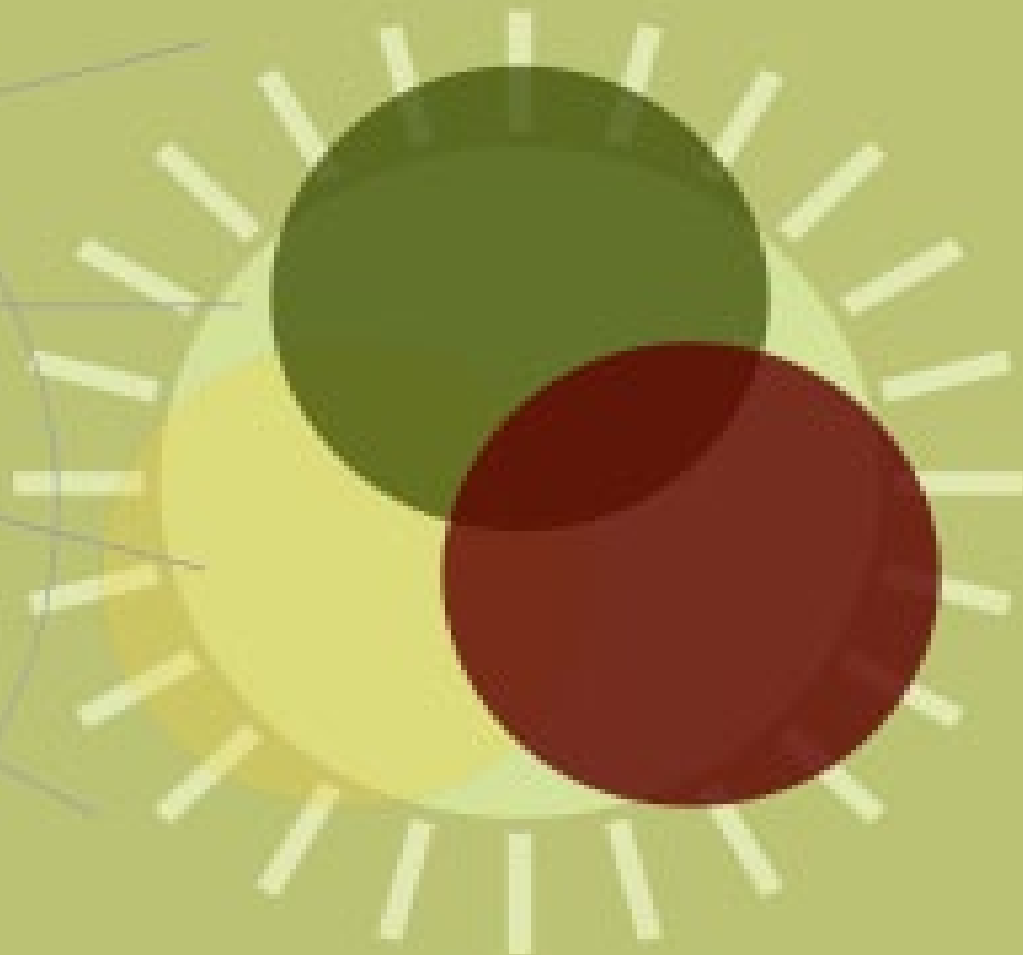


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ  
ΣΤΑ ΦΩΤΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΦΥΛΛΩΝ  
ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *PELARGONIUM SP.*



ΙΩΑΝΝΗΣ ΣΠΑΝΟΡΗΓΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2011

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

**Επίδραση της Συσσώρευσης Ανθοκυανινών στα Φωτοχημικά  
Χαρακτηριστικά Φύλλων του Φυτού *Pelargonium* sp.**

ΙΩΑΝΝΗΣ ΣΠΑΝΟΡΗΓΑΣ  
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2011



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γεώργιος Λιακόπουλος, Λέκτορας (Επιβλέπων)

Γεώργιος Καραμπουρνιώτης, Καθηγητής (Μέλος)

Γεώργιος Αϊβαλάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής (Μέλος)



## Περιεχόμενα

<b>Πρόλογος</b> .....	7
<b>I. Εισαγωγή</b> .....	9
I.1. Γενικά για τη φωτοσύνθεση.....	9
I.1.1. Η απορρόφηση του φωτός από τους φωτοσυνθετικούς ιστούς-οπτικές ιδιότητες των φύλλων, φάσματα απορρόφησης, σκέδασης, περατότητας.....	9
I.2. Οργάνωση των χλωροπλαστών.....	11
I.2.1. Λεπτή δομή των χλωροπλαστών.....	11
I.2.2. Χρωστικές των χλωροπλαστών.....	11
I.2.3. Οργάνωση των φωτοσυστημάτων στις χλωροπλαστικές μεμβράνες.....	13
I.3. Φωτοσυνθετική λειτουργία.....	13
I.3.1. Φωτεινές αντιδράσεις.....	13
I.3.1.1. Φωτοσυλλογή.....	13
I.3.1.2. Φωτοχημική ροή ηλεκτρονίων και παραγωγή χημικής ενέργειας.....	14
I.3.2. Οι σκοτεινές αντιδράσεις.....	16
I.3.2.1. Ο κύκλος αφομοίωσης του διοξειδίου του άνθρακα.....	16
I.3.2.2. Παραλλαγές στη βιοχημική οδό φωτοσυνθετικής ενσωμάτωσης του άνθρακα (κύκλος C4 και φωτοσύνθεση τύπου CAM).....	16
I.4. Καταπόνηση της φωτοσυνθετικής συσκευής από υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας, φωτοαναστολή και φωτοπροστασία.....	18
I.4.1. Ο κύκλος των ξανθοφυλλών.....	19
I.4.2. Άλλοι μηχανισμοί φωτοπροστασίας.....	20
I.4.2.1. Φωτοαναπνοή.....	20
I.4.2.2. Αντίδραση Mehler και χλωροπλαστική αναπνοή.....	20
I.4.2.3. Ο ρόλος των ανθοκυανιούχων ιστών ως οπτικών φωτοπροστατευτικών φραγμάτων.....	20
<b>II. Σκοπός της εργασίας</b> .....	23
<b>III. Υλικά και Μέθοδοι</b> .....	25
III.1. Φυτικό υλικό και συνθήκες καλλιέργειας.....	25
III.2. Φαινοτυπικές κατηγορίες των φυτών και δειγματοληπτικές κατηγορίες.....	25
III.3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης χλωροφυλλών και ανθοκυανινών.....	26
III.4. Φθορισμομετρία χλωροφύλλης.....	27
III.4.1. Μετρήσεις θεμελιώδους φωτοχημικής ικανότητας του PS II.....	27
III.4.2. Καταγραφή της καμπύλης βραδείας κινητικής επαγωγής φωτοσύνθεσης σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες.....	27
III.4.3. Καταγραφή της καμπύλης βραδείας κινητικής χαλάρωσης στο σκοτάδι σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες.....	27
III.4.4. Ανάλυση της καμπύλης βραδείας κινητικής επαγωγής φωτοσύνθεσης και υπολογισμός παραμέτρων απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης στο φως.....	28
III.4.5. Ανάλυση της καμπύλης βραδείας κινητικής χαλάρωσης και υπολογισμός παραμέτρων απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης.....	30
<b>IV. Αποτελέσματα</b> .....	33
IV.1. Συγκέντρωση χλωροφυλλών και ανθοκυανινών.....	33
IV.2. Φωτοχημικές παράμετροι των φύλλων.....	36
<b>V. Συζήτηση</b> .....	41
<b>VI. Βιβλιογραφία</b> .....	45



# Πρόλογος

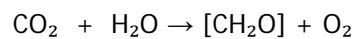




## I. Εισαγωγή

### I.1. Γενικά για τη φωτοσύνθεση

Η φωτοσύνθεση αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό γνώρισμα όλων των φωτοαυτότροφων οργανισμών. Αποτελεί μια διεργασία η οποία επιτρέπει στους οργανισμούς να συνθέτουν οργανικές ενώσεις από ανόργανα συστατικά εκμεταλλευόμενοι την ενέργεια της φωτεινής ακτινοβολίας. Ειδικότερα στα ανώτερα φυτά, η διεργασία αυτή περιλαμβάνει την **αφομοίωση διοξειδίου του άνθρακα** από την ατμόσφαιρα υπό μορφή υδατανθράκων με ταυτόχρονη **οξειδωση (φωτόλυση) του νερού** και παραγωγή μοριακού οξυγόνου. Η διαδικασία της φωτοσύνθεσης περιλαμβάνει πολυάριθμες φωτοχημικές και βιοχημικές αντιδράσεις οι οποίες διακρίνονται σε δυο φάσεις. Η πρώτη φάση περιλαμβάνει τις λεγόμενες **φωτεινές αντιδράσεις** όπου η παρουσία του φωτός είναι απαραίτητη και η δεύτερη φάση περιλαμβάνει τις λεγόμενες **σκοτεινές αντιδράσεις** των οποίων η διεξαγωγή δεν εξαρτάται άμεσα από την παρουσία του φωτός. Οι φωτεινές αντιδράσεις περιλαμβάνουν την απορρόφηση του φωτός, τη μεταφορά της ενέργειας στα κέντρα αντίδρασης δύο διακριτών λειτουργικών μονάδων που ονομάζονται φωτοσυστήματα και τις αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων και πρωτονίων με τελική έκβαση την παραγωγή πλούσιων ενεργειακά μορίων **NADPH** και **ATP**. Οι σκοτεινές αντιδράσεις περιλαμβάνουν την αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα και τη σύνθεση **υδατανθράκων**, χρησιμοποιώντας το NADPH και το ATP που παράγονται κατά τις φωτεινές αντιδράσεις. Η συνοπτική χημική αντίδραση της φωτοσύνθεσης είναι:



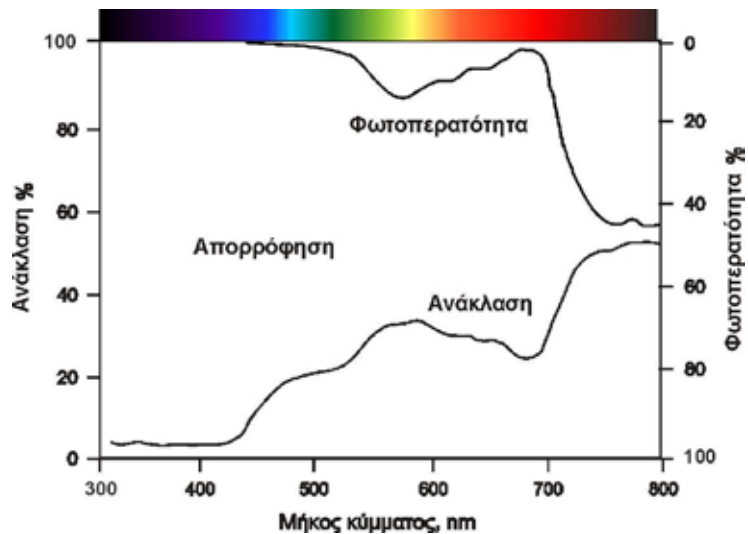
Στα ανώτερα φυτά, οι πιο δραστήριοι φωτοσυνθετικοί ιστοί είναι το αφομοιωτικό παρέγχυμα των φύλλων το οποίο εντοπίζεται στο μεσόφυλλο. Τα αντίστοιχα κύτταρα περιλαμβάνουν έναν μεγάλο αριθμό εξειδικευμένων κυτταρικών οργανιδίων, τους **χλωροπλάστες**. Στα οργανίδια αυτά πραγματοποιείται εξ' ολοκλήρου η αλληλουχία των φωτοχημικών και βιοχημικών σταδίων της φωτοσύνθεσης, από την αρχική δέσμευση της ενέργειας της ηλιακής ακτινοβολίας από εξειδικευμένες για το σκοπό αυτό πράσινες χρωστικές, τις **χλωροφύλλες** ως την βιοσύνθεση των υδατανθράκων (Hall and Rao, 1999).

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

Η κατασκευή των φύλλων μεγιστοποιεί την απορρόφηση φωτονίων κατάλληλης ενέργειας με σκοπό την ενεργειακή τροφοδοσία της φωτοσυνθετικής συσκευής. Παρόλα αυτά, το ποσοστό της ενέργειας της φωτεινής ακτινοβολίας το οποίο καταλήγει τελικά ως μεταβολική ενέργεια είναι αξιοσημείωτα χαμηλό και μάλλον δεν υπερβαίνει το 24%. Εάν εξαιρέσουμε τις φασματικές περιοχές οι οποίες δεν απορροφώνται από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές και περιοριστούμε έτσι στην φωτοσυνθετικά ενεργή ακτινοβολία (PAR), η απόδοση της φωτοσυνθετικής λειτουργίας ανεβαίνει στο 60% περίπου. Ωστόσο, ένα μεγάλο μέρος αυτής

## Εισαγωγή

της ενέργειας αντιστοιχεί στο μεταβολικό κόστος των φυτικών οργανισμών (περίπου 47%) αφήνοντας ένα μικρό μάλλον ποσοστό περίπου 12% ως καθαρό ενεργειακό κέρδος με τη μορφή χημικής ενέργειας των παραγόμενων φωτοσυνθετικών προϊόντων. Ένα σημαντικό μέρος της ενέργειας της PAR (περίπου 20%) δεν απορροφάται ποτέ από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές καθώς είτε ανακλάται είτε διέρχεται του ελάσματος του φύλλου (Taiz and Zeiger, 2002). Το ποσοστό αυτό της ενέργειας μπορεί να αυξηθεί αρκετά κυρίως οφειλόμενο στην ανάκλαση και σκέδαση της ακτινοβολίας λόγω της ύπαρξης στιλπνών φυλλικών επιφανειών, τριχώματος ή άλλων κατασκευαστικών λεπτομερειών των φύλλων. Από την άλλη μεριά, στην περίπτωση των φύλλων με μεγάλο πάχος, το ποσοστό της διερχόμενης ακτινοβολίας μπορεί να μειωθεί αισθητά (Karabourniotis, 1998).



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

Σε ένα τυπικό φύλλο, το ποσοστό της ακτινοβολίας το οποίο διέρχεται ή ανακλάται δεν είναι ίδιο ως ποσοστό σε όλες τις φασματικές περιοχές της PAR προφανώς λόγω της παρουσίας των χλωροφυλλών, κατά κύριο λόγο, αλλά και των υπόλοιπων χρωστικών, κυρίως των καροτενοειδών. Το διερχόμενο και ανακλούμενο φως είναι συγκριτικά περισσότερο στην πράσινη περιοχή μεταξύ 500 και 600 nm γεγονός στο οποίο οφείλεται και το πράσινο χρώμα των φωτοσυνθετικών ιστών (εικόνα 1). Ωστόσο, τροποποιήσεις στον φαινότυπο των φύλλων αλλάζουν τις οπτικές ιδιότητες των φύλλων. Μια τέτοια παραλλαγή είναι τα ανθοκυανιούχα φύλλα. Λόγω της παρουσίας ανθοκυανινών είτε στην επιδερμίδα είτε κυρίως στο μεσόφυλλο, σημαντικό, επιπλέον του ποσοστού που παρατηρείται στα τυπικά πράσινα φύλλα, μέρος της πράσινης ακτινοβολίας απορροφάται με συνέπεια το φύλλο να αποκτά μια καστανή έως ερυθροκάστανη απόχρωση. Προφανώς, εάν οι ανθοκυανίνες εντοπίζονται στους ανώτερους επιφανειακούς ιστούς (αποαξονική επιδερμίδα ή ανώτερα στρώματα του φωτοσυνθετικού παρεγγύματος) η επιπλέον απορρόφηση στην πράσινη και σε μικρότερο βαθμό στην μπλε περιοχή του φάσματος τροποποιεί την ποιότητα και την ποσότητα της ακτινοβολίας που φθάνει στους χλωροπλάστες των φύλλων αυτών (Steyn et al., 2002; Manetas, 2006).

## 1.2. Οργάνωση των χλωροπλαστών

### 1.2.1. Λεπτή δομή των χλωροπλαστών

Οι χλωροπλάστες έχουν σχήμα επίπεδο δισκοειδές, διάμετρο συνήθως από 2 έως 10 μm και πάχος περίπου έως 2,5 μm. Αποτελούνται από ένα συμπαγές σύστημα διπλής εξωτερικής μεμβράνης (**φάκελος**), η οποία ελέγχει την διακίνηση ουσιών από το κυτταρόπλασμα προς τον χλωροπλάστη και αντίστροφα. Στο εσωτερικό του χλωροπλάστη υπάρχει ένα άμορφο ζελατινώδες υλικό, το **στρώμα**, το οποίο περιέχει τα απαραίτητα ενζυμα για την μετατροπή του διοξειδίου του άνθρακα σε υδατάνθρακες. Στο στρώμα διεξάγεται το στάδιο των σκοτεινών αντιδράσεων. Εντός του στρώματος, κατά θέσεις, υπάρχουν συστήματα ελασματοειδών μεμβρανών, τα **θυλακοειδή**, όπου πραγματοποιείται το στάδιο των φωτεινών αντιδράσεων. Το τελευταίο περιλαμβάνει την οξειδωση του νερού και τον σχηματισμό των πλούσιων ενεργειακά μορίων ATP και NADPH, υπό την επίδραση φωτεινής ακτινοβολίας. Τα θυλακοειδή σε ορισμένες περιοχές του χλωροπλάστη σχηματίζουν πυκνούς σωρούς, τα **grana**. Κάθε στοιχείο των σχηματισμών αυτών καλείται **granum**. Εντός του στρώματος επίσης, οι ελασματοειδής μεμβράνες σχηματίζουν αραιότερα και περισσότερο επιμήκη θυλακοειδή, τα οποία καλούνται **θυλακοειδή του στρώματος**. Η μεμβράνη κάθε θυλακοειδούς οριοθετεί μια εσωτερική περιοχή ή **κοιλότητα** και περιέχει συγκεκριμένης σύστασης υδατικό διάλυμα ιδιαίτερης σημασίας για την φωτοσύνθεση. Στην κοιλότητα κατά την διάρκεια της φωτοχημικής μεταφοράς ηλεκτρονίων, μεταφέρονται πρωτόνια προερχόμενα από την φωτόλυση του νερού καθώς και από το στρώμα τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή μορίων ATP.

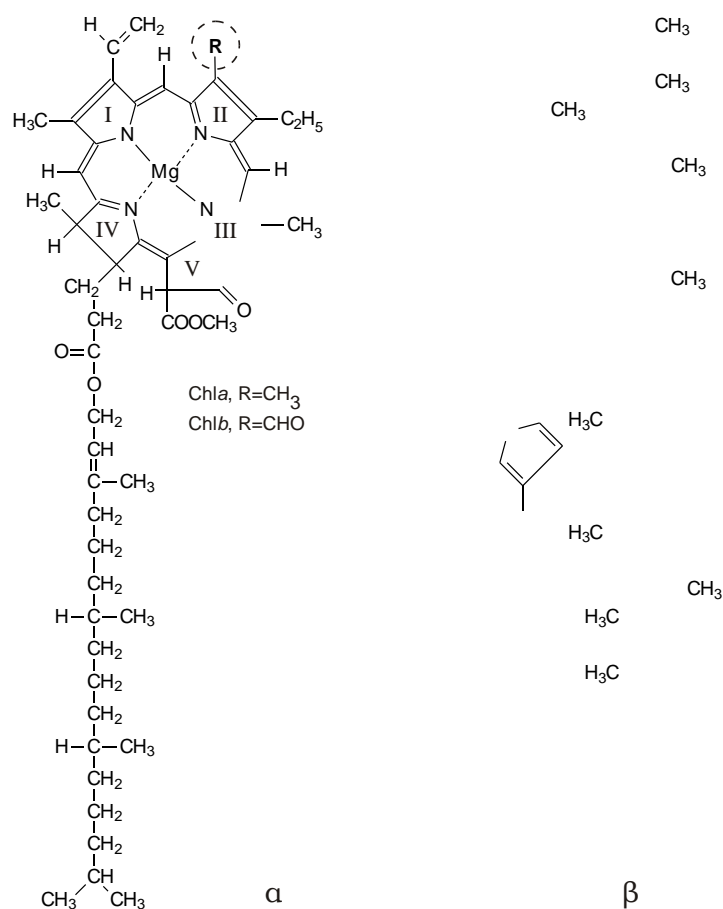
### 1.2.2. Χρωστικές των χλωροπλαστών

Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές των ανώτερων φυτών αποτελούν τη βάση της λειτουργικότητας της φωτοσυνθετικής συσκευής καθώς είναι επιφορτισμένες με την απορρόφηση της ενέργειας της φωτεινής ακτινοβολίας και την αξιοποίησή της για τη διεξαγωγή των φωτεινών αντιδράσεων. Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές των ανώτερων φυτών κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες, σύμφωνα με τη μοριακή δομή και το ρόλο που διαδραματίζουν: στις **χλωροφύλλες** (οι οποίες δρουν είτε ως κύριες είτε ως βοηθητικές φωτοσυνθετικές χρωστικές) και στα **καροτενοειδή** (τα οποία δρουν είτε ως βοηθητικές είτε ως φωτοπροστατευτικές χρωστικές). Οι χλωροφύλλες είναι χρωστικές που δίνουν στους χλωροπλάστες και κατ' επέκταση στα φύλλα, το χαρακτηριστικό πράσινο χρωματισμό. Στα ανώτερα φυτά διακρίνονται δύο χλωροφύλλες, η **χλωροφύλλη a** και η **χλωροφύλλη b** (εικόνα 2). Το μόριο της χλωροφύλλης αποτελείται από ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο τμήμα. Το υδρόφιλο τμήμα του μορίου αποτελείται από έναν πυρήνα πορφυρίνης ο οποίος σχηματίζεται από τέσσερα πυρόλια κυκλοπεντανόνης. Στο κέντρο της πορφυρίνης βρίσκεται ένα ιόν μαγνησίου, το οποίο σχηματίζει ιοντικούς δεσμούς με τα γειτονικά άτομα αζώτου των μορίων κάθε κυκλοπεντανόνης. Ο πορφυρινικός δακτύλιος αποτελεί τη χρωμοφόρο ομάδα του μορίου της χλωροφύλλης, και είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση των φωτονίων. Το

## Εισαγωγή

υδρόφοβο τμήμα του μορίου αποτελείται από ένα μόριο **φυτόλης** το οποίο συνδέεται με τον πορφυρινικό δακτύλιο μέσω του IV πυρολικού δακτυλίου. Τα μόρια της χλωροφύλλης παρεμβάλλονται μεταξύ των πρωτεϊνών και των λιπιδίων της μεμβράνης των θυλακοειδών, με τον πορφυρινικό δακτύλιο να είναι συνδεδεμένος με τις πρωτεΐνες και την αλυσίδα της φυτόλης να διευθετείται εντός του στρώματος των λιπιδίων. Τα φάσματα απορρόφησης των χλωροφυλλών παρουσιάζουν μέγιστα στην μπλε και κόκκινη περιοχή του φάσματος (Αϊβαλάκης κ.α., 2003).

Τα **καροτενοειδή** είναι κίτρινες έως ερυθρές χρωστικές, οι οποίες απαντώνται σε όλα τα φωτοσυνθετικά κύτταρα. Πρόκειται για γραμμικά τερπενοειδή (τετρατερπένια) με δομική μονάδα το ισοπρένιο (εικόνα 2). Ως εκ τούτου χαρακτηρίζονται από συζυγιακό σύστημα διπλών δεσμών. Περιλαμβάνουν είτε υδρογονάνθρακες (**καροτένια**) είτε οξυγονωμένα παράγωγα αυτών (**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).



**Εικόνα 2.** Ο συντακτικός τύπος των δυο μορφών της χλωροφύλλης και ενός τυπικού καροτενοειδούς.

***1.2.3. Οργάνωση των φωτοσυστημάτων στις χλωροπλαστικές μεμβράνες***

Η φωτοσυνθετική συσκευή είναι οργανωμένη στα θυλακοειδή των grana των χλωροπλαστών, όπου επιτελούνται συγκεκριμένα οι φωτεινές αντιδράσεις. Αποτελείται από δύο ξεχωριστά φωτοσυστήματα αποτελούμενα από πρωτεΐνες και κύριες και βοηθητικές φωτοσυνθετικές χρωστικές τα οποία λειτουργούν σε σειρά. Το φωτοσυστήμα II (PS II) προηγείται του φωτοσυστήματος I (PS I) στη φωτοχημική αλυσίδα ροής ηλεκτρονίων (εικόνα 3). Τα κέντρα αντίδρασης των PS II μαζί με τις χλωροφύλλες των αντεννών φωτοσυλλογής και τις συζευγμένες πρωτεΐνες μεταφοράς ηλεκτρονίων εδράζονται κατά κύριο λόγο στα θυλακοειδή των grana ενώ οι αντίστοιχες δομές των PS I εδράζονται σχεδόν αποκλειστικά στα θυλακοειδή του στρώματος και στις παρυφές των θυλακοειδών των grana. Στις θέσεις αυτές εντοπίζεται προεκβάλλοντας προς το στρώμα και ο παράγοντας σύζευξης, ένα ενζυμικό σύστημα το οποίο είναι υπεύθυνο για την καταλυτική μετατροπή του ADP προς ATP. Τα φωτοσυστήματα παρουσιάζουν συνεργιστική δράση για την συλλογή της ενέργειας των φωτονίων και την μετατροπή της σε χημική, ενώ κάθε φωτοσυστήμα έχει διακριτό ρόλο και ελαφρώς διαφορετικά ενεργειακά χαρακτηριστικά. Έτσι, η οξειδωση του νερού (φωτόλυση), που αποτελεί μια σημαντική φωτοχημική αντίδραση, πραγματοποιείται στο PS II ενώ η αναγωγή του NADP<sup>+</sup> προϋποθέτει την ροή ηλεκτρονίων μέσω του PS I. Στο κέντρο κάθε φωτοσυστήματος βρίσκεται στρατηγικά τοποθετημένο ένα μόριο χλωροφύλλης *a* το οποίο εμφανίζει χαρακτηριστικό μέγιστο απορρόφησης της ακτινοβολίας, στα 700 nm για το PS II και στα 680 nm για το PS I, και ονομάζεται για το λόγο αυτό P700 και P680 αντίστοιχα.

Η ροή των ηλεκτρονίων μεταξύ των δυο φωτοσυστημάτων επιτυγχάνεται με την παρουσία ομοιόμορφα κατανεμημένων ενδιάμεσων φορέων ηλεκτρονίων, της πλαστοκινόνης, του ενζυμικού κυτοχρωμικού συμπλέγματος *b<sub>6</sub>f* και της πλαστοκυανίνης. Ο πιθανός λειτουργικός ρόλος του διαχωρισμού των δυο φωτοσυστημάτων δεν είναι πλήρως γνωστός. Παρ' όλα αυτά, εικάζεται ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της κατανομής της φωτεινής ενέργειας στα δύο φωτοσυστήματα (Trissl και Wilhelm, 1993).

**1.3. Φωτοσυνθετική λειτουργία*****1.3.1. Φωτεινές αντιδράσεις******1.3.1.1. Φωτοσυλλογή***

Ο φωτοσυλλεκτικός μηχανισμός αποτελείται από έναν μεγάλο αριθμό μορίων χρωστικών (χλωροφύλλες *a* και *b* καθώς και καροτενοειδή) οργανωμένων με τη βοήθεια πρωτεϊνικών συμπλόκων. Τα μόρια των φωτοσυνθετικών χρωστικών απαντώνται σε ομάδες και κατά το μεγαλύτερο μέρος τους λειτουργούν ως μια αντέννα συλλογής φωτεινής ενέργειας. Η απορροφημένη ενέργεια μεταφέρεται στα κέντρα αντίδρασης των PS I και II. Κατά την απορρόφηση των φωτονίων, οι φωτοσυνθετικές χρωστικές διεγείρονται λόγω ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων και μεταπίπτουν σε μια κατάσταση υψηλότερης ενέργειας. Η ενέργεια διέγερσης μεταφέρεται μέσω συντονισμού, ενός μη φωτονιακού φαινομένου, από μόριο σε

## Εισαγωγή

μόριο με τελικό αποδέκτη το κέντρο αντίδρασης. Οι ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις μπορούν να συμβούν σε περισσότερες από μια ενεργειακές στάθμες ανάλογα με το ποσό της ενέργειας των φωτονίων που απορροφώνται (Αϊβαλάκης κ.α., 2003). Στο γεγονός αυτό οφείλεται το γεγονός ότι η απορρόφηση των χλωροφυλλών παρουσιάζει μέγιστο τόσο στην μπλε όσο και στην κόκκινη περιοχή του φάσματος (Lawlor, 2001). Κατά τη μεταφορά της διέγερσης, ένα ποσοστό της ενέργειας (περίπου 10%) χάνεται υπό τη μορφή θερμότητας (Αϊβαλάκης κ.α., 2003). Η ύπαρξη αυτών των θερμικών απωλειών σε κάθε βήμα μεταφοράς της ενέργειας διέγερσης προκαλεί ελάττωση της ενέργειας και αποτρέπει έτσι την ροή της ενέργειας προς την αντίθετη κατεύθυνση. Για το λόγο αυτό οι χρωστικές των αντενών φωτοσυνθέσης παρουσιάζουν τέτοια χωροταξική διευσθέτηση και κατάλληλα ενεργειακά χαρακτηριστικά ώστε η ηλεκτρονική διέγερση εξ' αίτιας της απορρόφησης κάθε φωτονίου να έχει κατεύθυνση πάντοτε προς το κέντρο αντίδρασης (Lawlor, 2001).

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

Οι φωτεινές αντιδράσεις αφορούν στις φωτοχημικές αντιδράσεις οι οποίες ξεκινούν από την απορρόφηση της φωτονιακής ενέργειας της φωτεινής ακτινοβολίας και καταλήγουν στην παράγωγη πλούσιων ενεργειακά μορίων NADPH και ATP (εικόνα 3).

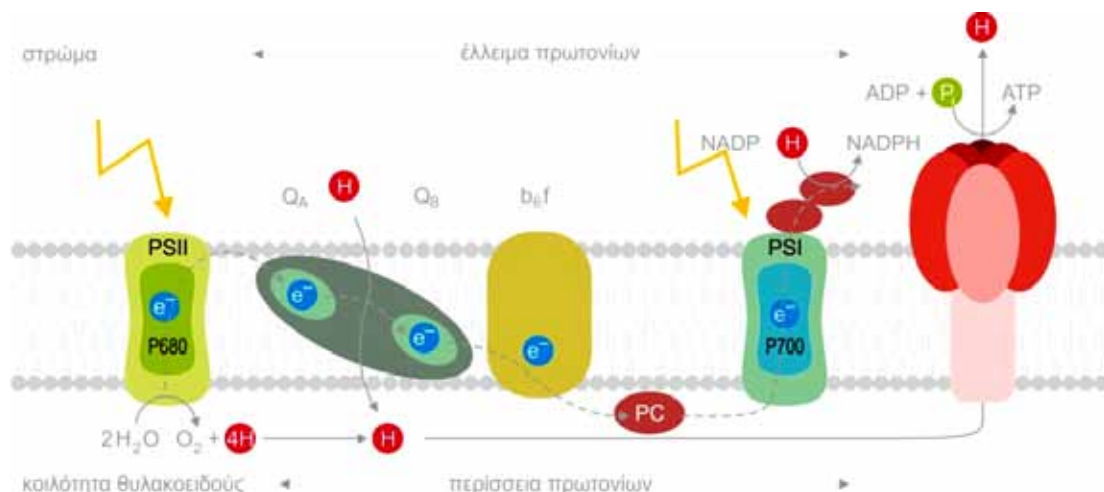
Η φωτονιακή ενέργεια της προσπίπτουσας ακτινοβολίας απορροφάται από τα μόρια των χλωροφυλλών και των καροτενοειδών της φωτοσυνθετικής συσκευής με αποτέλεσμα αυτά να διεγείρονται σε μια κατάσταση υψηλότερης ενέργειας λόγω ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων. Η ενεργειακή αυτή μεταβολή μεταβιβάζεται μέσω μεταφοράς ενέργειας μέσω συντονισμού και διαδοχικών ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων γειτονικών μορίων με ευνοϊκή ενεργειακή διαφορά και καταλήγει συνήθως στο κέντρο αντίδρασης του φωτοσυστήματος II, το οποίο με τη σειρά του διεγείρεται επίσης. Συνήθως, η διέγερση του P680 έχει ως αποτέλεσμα τον διαχωρισμό φορτίου ο οποίος συνίσταται στην μεταφορά ενός ηλεκτρονίου στον πρωταρχικό δέκτη ηλεκτρονίων, μία φαιοφυτίνη (Phe). Η φαιοφυτίνη αποτελεί μια ιδιαίτερη μορφή χλωροφύλλης *a* στην οποία το κεντρικό ιόν μαγνησίου έχει αντικατασταθεί από δύο άτομα υδρογόνου. Όταν συμβεί αυτή η φωτοχημική αντίδραση, το P680 οξειδώνεται και η Phe ανάγεται. Στη συνέχεια, το ηλεκτρόνιο μεταφέρεται προς την πλαστοκινόνη (PQ) η οποία συνδέεται με μια πρωτεΐνη του κέντρου αντίδρασης, την πρωτεΐνη D1 και τελικά ανάγεται σε πλαστοκινόλη (PQH). Η σύνδεση με την πρωτεΐνη D1 χαλαρώνει και η πλαστοκινόλη αρχίζει να μετακινείται στο θυλακοειδές του στρώματος. Εκεί, οξειδώνεται σε πλαστοκινόνη και παρέχει τα ηλεκτρόνια στο σύμπλοκο  $b_6f$  και εν συνεχεία σε μια χαλκοπρωτεΐνη, την πλαστοκυανίνη (PC). Το P680 ανάγεται με την μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από την πλευρά του συμπλόκου φωτόλυσης του νερού. Το σύμπλοκο εδράζεται στην πλευρά της κοιλότητας και βρίσκεται σε στενή σχέση με το κέντρο αντίδρασης P680. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται τέσσερις φορές έως ότου στο σύμπλοκο φωτόλυσης του νερού να δημιουργηθεί ένα ισχυρά οξειδωτικό σώμα το οποίο είναι ενεργειακά ικανό να οξειδώσει το νερό. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται φωτόλυση του νερού επειδή το νερό διασπάται σε

πρωτόνια και μοριακό οξυγόνο. Συνεπώς, η παραγωγή ενός μορίου  $O_2$  στο PS II απαιτεί θεωρητικά την απορρόφηση τεσσάρων φωτονίων και οδηγεί στην φωτοχημική ροή τεσσάρων ηλεκτρονίων και στην συσσώρευση στην κοιλότητα τεσσάρων πρωτονίων. Τα πρωτόνια αυτά, μαζί με επιπλέον πρωτόνια που μεταφέρονται μέσω του συμπλόκου  $b_6f$ , συσσωρεύονται στην κοιλότητα των θυλακοειδών δημιουργώντας ένα χημειοοσμωτικό δυναμικό πρωτονίων (εικόνα 3).

Η διαβάθμιση της συγκέντρωσης πρωτονίων μεταξύ στρώματος και κοιλότητας αποσβένεται με ταυτόχρονη απελευθέρωση ενέργειας η οποία χρησιμοποιείται για την φωσφορυλίωση του ADP προς ATP. Για το λόγο αυτό, η αντίστροφη των παραπάνω φωτοχημικών αντιδράσεων ροή πρωτονίων προς το στρώμα πραγματοποιείται μέσω του ενζυμικού συμπλόκου της συνθετάσης του ATP ή παράγοντα σύζευξης.

Παράλληλα με τις φωτοχημικές αντιδράσεις που διεξάγονται προς την πλευρά του PS II, η απορρόφηση φωτονίων από τα μόρια των χλωροφυλλών της φωτοσυλλεκτικής αντένας του PSI έχει ως αποτέλεσμα την διέγερση του P700 και τη μεταφορά ηλεκτρονίων στην φερεδοξίνη, μια σίδηρο-θειοπρωτεΐνη. Η τελευταία ανάγει το  $NADP^+$  σε NADPH με την βοήθεια του ενζύμου οξειδοαναγωγή της φερεδοξίνης- $NADP^+$ . Η αναγωγή του οξειδωμένου P700 πραγματοποιείται μέσω της πλαστοκυανίνης από ηλεκτρόνια τα οποία προέρχονται από το PSII (εικόνα 3).

Κάτω από ορισμένες συνθήκες, εκτός από την παραπάνω γραμμική φωτοχημική ροή ηλεκτρονίων, λαμβάνει χώρα και ένας άλλος τύπος φωτοχημικής ροής ηλεκτρονίων που ονομάζεται κυκλική ροή ηλεκτρονίων. Αυτή συνίσταται στην μεταφορά ηλεκτρονίων από την αναγωγική πλευρά του PSI προς το κέντρο αντίδρασης P700 μέσω του συμπλόκου  $b_6f$ . Κατά αυτόν τον τρόπο αναπτύσσεται χημειοοσμωτικό δυναμικό πρωτονίων μεταξύ στρώματος και



**Εικόνα 3.** Οι κυριότεροι παράγοντες των φωτεινών αντιδράσεων και η φωτοχημική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων.



## Εισαγωγή

κοιλότητας θυλακοειδούς το οποίο παρέχει την κινητήρια δύναμη για την φωσφορυλίωση του ADP προς ATP χωρίς όμως την αναγωγή του  $\text{NADH}^+$  η οποία λαμβάνει χώρα κατά την γραμμική ροή ηλεκτρονίων (Taiz and Zeiger, 2002).

### 1.3.2. Οι σκοτεινές αντιδράσεις

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

Οι χημικές αντιδράσεις που οδηγούν στην αφομοίωση του διοξειδίου του άνθρακα αναφέρονται ως **φωτοσυνθετικός κύκλος αναγωγής του άνθρακα** ή αλλιώς **κύκλος του Calvin** ή **κύκλος άνθρακα C3**. Το μονοπάτι αυτό αποτελεί χαρακτηριστικό όλων των φωτοσυνθέτοντων ευκαρυωτικών οργανισμών.

Το διοξείδιο του άνθρακα της ατμόσφαιρας εισέρχεται διαμέσου των στομάτων των φύλλων μέσω διάχυσης και καταλήγει στο στρώμα των χλωροπλαστών των κυττάρων του μεσόφυλλου. Η πρώτη φάση του κύκλου αφορά την αντίδραση καρβοξυλίωσης της διφωσφορικής ριβουλόζης από το  $\text{CO}_2$  η οποία καταλύεται από το ένζυμο **καρβοξυλάση-οξυγονάση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης** ή αλλιώς **Rubisco**. Η ενδιάμεση ένωση που σχηματίζεται διασπάται σε δύο μόρια 3-φωσφογλυκερινικού οξέος. Κατά την δεύτερη φάση το 3-φωσφογλυκερινικό οξύ ανάγεται σε 3-φωσφορική γλυκεριναλδεΐδη, με μια σειρά δύο ενζυμικών αντιδράσεων. Αρχικά, το 3-φωσφογλυκερινικό οξύ μετατρέπεται σε 1,3-διφωσφογλυκερινικό οξύ με την βοήθεια του ενζύμου κινάση του φωσφογλυκερινικού οξέος. Κατά την δεύτερη αντίδραση το παραγόμενο 1,3-διφωσφογλυκερινικό οξύ ανάγεται σε 3-φωσφορική γλυκεριναλδεΐδη από το NADPH σε μια αντίδραση που καταλύεται από μια  $\text{NADP}^+$ -εξαρτώμενη αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης. Αξίζει να σημειωθεί ότι ένα μέρος της παραγόμενης φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης μετατρέπεται στην ισομερή μορφή της φωσφορικής διυδροξυακετόνης υπό την επίδραση του ενζύμου ισομεράση της φωσφορικής τριόζης. Η τρίτη φάση του κύκλου περιλαμβάνει διεργασίες αναγέννησης της διφωσφορικής ριβουλόζης από φωσφορικές τριόζες και περιλαμβάνει δυο στάδια. Στο πρώτο στάδιο τα ένζυμα φωσφατάση της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης, φωσφατάση της 1,7-διφωσφορικής σεδοεπτουλόζης, τρανσακετυλάση και αλδολάση μετατρέπουν ένα μέρος των φωσφορικών τριοζών (φωσφορική γλυκεριναλδεΐδη και φωσφορική διυδροξυακετόνη) σε φωσφορικές πεντόζες. Στο δεύτερο στάδιο οι φωσφορικές πεντόζες μετατρέπονται σε 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη με μια σειρά ενζυμικών αντιδράσεων που καταλύονται από τα ένζυμα ισομεράση της 5-φωσφορικής ριβόζης, την επιμεράση της 5-φωσφορικής ριβουλόζης και την κινάση της 5-φωσφορικής ριβουλόζης.

#### 1.3.2.2. Παραλλαγές στη βιοχημική οδό φωτοσυνθετικής ενσωμάτωσης του άνθρακα (κύκλος C4 και φωτοσύνθεση τύπου CAM)

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, το προϊόν της φωτοσυνθετικής αφομοίωσης του  $\text{CO}_2$  αποτελεί το **3-φωσφορογλυκερινικό οξύ (3-PGA)**, ένα μόριο με τρία άτομα άνθρακα. Λόγω του παραπάνω, τα φυτά που ακολουθούν το μεταβολικό αυτό μονοπάτι ονομάζονται **φυτά C3**.

Εκτός όμως από την κατηγορία αυτή υπάρχουν ορισμένα φυτά (περίπου το 1% του συνόλου των ειδών), που έχουν αναπτύξει μηχανισμούς με τους οποίους αυξάνουν την συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> εντός των κυττάρων στα οποία δρά η Rubisco με σκοπό την αύξηση της φωτοσυνθετικής ταχύτητας και την καλύτερη διαχείριση του νερού.

Η Rubisco είναι ένα ένζυμο με διπλό χαρακτήρα: παρουσιάζει δράση καρβοξυλάσης αλλά και οξυγονάσης. Η οξειδωση του υποστρώματος πραγματοποιείται συνήθως με μικρότερο ρυθμό αυτού της καρβοξυλίωσης λόγω μικρότερης συνάφειας της Rubisco με το οξυγόνο συγκριτικά με το CO<sub>2</sub>. Ωστόσο, υπό συνθήκες έντονου φωτοσυνθετικού ρυθμού η συμβολή της στην μείωση του φωτοσυνθετικού έργου είναι σημαντική. Η αντίδραση αφομοίωσης του οξυγόνου και περαιτέρω τα μεταβολικά βήματα διαχείρισης των παραγώγων της αρχικής αντίδρασης αναφέρονται ως φωτοαναπνοή επειδή καταναλώνεται οξυγόνο και η διαδικασία ενεργοποιείται παρουσία φωτός. Αντίθετα όμως με την καταβολική αναπνοή, η φωτοαναπνοή δεν έχει ως αποτέλεσμα ενεργειακό κέρδος από το κύτταρο αλλά αντίθετα η φωτοαναπνοή δαπανά ενέργεια για την φωσφορυλίωση του γλυκερινικού οξέος. Είναι εύκολο να κατανοηθεί πως στα φυτά που λειτουργεί μηχανισμός υπερσυσσώρευσης CO<sub>2</sub> στα κέντρα καρβοξυλίωσης, η φωτοαναπνοή καταστέλεται σημαντικά ανάλογα με την συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> στο κυτταρικό διάλυμα. Συγκεκριμένα, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub>, τόσο ελαττώνεται η δράση οξυγονάσης του ενζύμου. Έτσι, στα φυτά αυτά, η δράση οξυγονάσης της Rubisco σχεδόν μηδενίζεται και το ένζυμο παρουσιάζει σχεδόν αποκλειστικά καρβοξυλιωτική δράση. Το πρώτο μόριο στο οποίο πραγματοποιείται η αποθήκευση του CO<sub>2</sub> είναι ένα οξύ με τέσσερα άτομα άνθρακα (C4 οξύ), το οξαλοξικό, και για λόγο αυτό τα φυτά της κατηγορίας αυτής ονομάζονται **φυτά C4**.

Τα C4 φυτά διαθέτουν ορισμένα ανατομικά χαρακτηριστικά που τα καθιστούν ικανά να δημιουργούν υψηλές συγκεντρώσεις CO<sub>2</sub> εντός των φωτοσυνθετικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα του κολεού ο οποίος περιβάλλει τις ηθμαγγειώδης δεσμίδες διαθέτουν χλωροπλάστες και συνδέονται με τα κύτταρα του μεσοφύλλου με πολυάριθμα πλασμοδέσματα. Οι ανατομικές αυτές ιδιαιτερότητες παρέχουν την δυνατότητα συγκέντρωσης του CO<sub>2</sub> σε υψηλά επίπεδα στα κύτταρα του περιεγχυματικού κολεού, τα οποία με τη σειρά τους δεν επιτρέπουν την προς τα έξω διάχυσή του, λόγω της ύπαρξης κυτταρικών τοιχωμάτων μεγάλου πάχους.

Ο μηχανισμός δέσμευσης του CO<sub>2</sub> στηρίζεται στην δράση του ενζύμου καρβοξυλάση του φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικού οξέος (**PEP**). Το υπόστρωμα του ενζύμου είναι το όξινο ανθρακικό ιόν (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) και όχι το CO<sub>2</sub>. Το προϊόν της αντίδρασης αυτής είναι ένα μόριο οξαλοξικού οξέος, το οποίο στη συνέχεια ανάγεται σε μηλικό. Τα μόρια αυτά εξάγονται από τα κύτταρα του μεσοφύλλου προς τα κύτταρα του κολεού και υφίστανται οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση, με ταυτόχρονη έκλυση CO<sub>2</sub>. Το τελευταίο αφομοιώνεται μέσω του κύκλου του Calvin σε φωσφορικές τριόζες στους χλωροπλάστες των κυττάρων του δεσμικού κολεού.

## Εισαγωγή

Εκτός από τα φυτά C4 υπάρχει και μια δεύτερη παραλλαγή του φωτοσυνθετικού μεταβολισμού του άνθρακα στην οποία η αρχική δέσμευση διαχωρίζεται από την φωτοσυνθετική αφομοίωσή του όχι στον χώρο (δηλ. μεταξύ δύο διακριτών ιστολογικών περιοχών όπως στα φυτά C4) αλλά στον χρόνο, δηλ. μεταξύ ημέρας και νύκτας. Στα φύλλα των φυτών αυτών παρατηρείται μεγάλη μεταβολή στη συγκέντρωση του μηλικού οξέος κατά την διάρκεια των ημερήσιων κύκλων. Οι μεταβολές αυτές της οξύτητας παρατηρήθηκαν πρώτα στα φυτά της οικογένειας **Crassulaceae** και για τον λόγο αυτό ονομάστηκαν **φυτά CAM (Crassulacean Acid Metabolism)**. Στο μεταβολισμό τύπου CAM η απορρόφηση του CO<sub>2</sub> γίνεται κατά τη διάρκεια της νύκτας κατά την οποία το άνοιγμα των στομάτων συνοδεύεται από συγκριτικά χαμηλότερες απώλειες νερού συγκριτικά με την ζεστή και ξηρή ημέρα. Το απορροφούμενο CO<sub>2</sub> δεσμεύεται με καρβοξυλίωση του οξαλοξικού οξέος μέσω της καρβοξυλάσης του PEP και ανάγεται σε μηλικό το οποίο αποθηκεύεται στο χυμοτόπιο των φωτοσυνθετικών κυττάρων. Κατά τη διάρκεια της ημέρας η δράση του μηλικού ενζύμου απελευθερώνει το CO<sub>2</sub> το οποίο αφομοιώνεται από τον κύκλο του Calvin. Με τον μεταβολισμό τύπου CAM επιτυγχάνονται δύο αποτελέσματα: αφενώς καταστέλεται αποτελεσματικά η φωτοαναπνοή και αφετέρου μειώνονται σημαντικά οι απώλειες νερού ανά μονάδα αφομοιώσιμου άνθρακα. Η φωτοσύνθεση CAM ακολουθείται από είδη τα οποία διαβιούν σε εξαιρετικά δυσμενή από πλευράς υψηλών θερμοκρασιών και χαμηλής ατμοσφαιρικής και εδαφικής υγρασίας περιβάλλοντα (Taiz and Zeiger, 2002).

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

Εξελικτικά τα φυτά έχουν διαμορφώσει ανατομικές και φυσιολογικές προσαρμογές για την όσο το δυνατόν αποδοτικότερη εκμετάλευση των χαμηλών εντάσεων φωτεινής ακτινοβολίας για την παραγωγή φωτοσυνθετικού έργου. Ταυτόχρονα, υπό φυσιολογικές συνθήκες περιβάλλοντος, η πλέον περιοριστική παράμετρος για την μεγιστοποίηση της φωτοσυνθετικής ταχύτητας στις υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας είναι η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> στα σημεία αφομοίωσής του. Οι συνθήκες αυτές δημιουργούν εύκολα, ειδικά στα φυτά που ακολουθούν την C3 φωτοσύνθεση, ενεργειακό πλεόνασμα υπό συνθήκες υψηλών εντάσεων ακτινοβολίας καθώς είναι δυσχερής η πλήρης εκμετάλευση της ενέργειας για την αφομοίωση του CO<sub>2</sub>. Αντίστοιχα, τα φυτά έχουν εξελίξει μηχανισμούς εναλλακτικής διοχέτευσης του ενεργειακού πλεονάσματος δεδομένου ότι η υπερδιέγερση των φωτοχημικών κέντρων μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή της φωτοσύνθεσης (φωτοαναστολή της φωτοσύνθεσης) και περαιτέρω σε οξειδωτικές βλάβες. Υπό τις συνθήκες αυτές, η φωτοσυνθετική συσκευή αποτρέπει την συσσώρευση βλαβών από υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας μέσω των παραπάνω μηχανισμών οι οποίοι αναφέρονται συλλογικά ως φωτοπροστατευτικοί μηχανισμοί. Η φωτοσυνθετική συσκευή είναι σε άρτια κατάσταση όσο η πλεονάζουσα ενέργεια αποσβένεται από τους φωτοπροστατευτικούς μηχανισμούς αλλά ακόμα και όσο ο ρυθμός συσσώρευσης βλαβών δεν ξεπερνά τον ρυθμό επιδιόρθωσής τους. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι ένας χαμηλός

ρυθμός απενεργοποίησης ορισμένων φωτοχημικών κέντρων είναι φυσιολογικός για τα δεδομένα μιας φωτοσυνθετικά παραγωγικής φωτοπεριόδου αλλά και ένας ακόμα τρόπος παθητικής φωτοπροστασίας. Υπό τις συνθήκες αυτές, ένα υγιές φυτό μπορεί να ανακάμψει πλήρως όσον αφορά στη μέγιστη φωτοσυνθετική του απόδοση κατά τη διάρκεια της σκοτοπεριόδου. Ωστόσο, η υπερβολική συσσώρευση βλαβών, ειδικά υπό την επίδραση περισσότερων παραγόντων καταπόνησης οι οποίοι δρουν συνεργιστικά, είναι μη αναστρέψιμη και οδηγεί σε καταπόνηση από υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας.

### ***1.4.1. Ο κύκλος των ξανθοφυλλών***

Ο κύκλος των ξανθοφυλλών αποτελεί τον σημαντικότερο από πλευράς ενεργειακής χωρητικότητας φωτοπροστατευτικό μηχανισμό και υλοποιείται από τρία καροτενοειδή την βιολαξανθίνη, την ανθεραξανθίνη και την ζεαξανθίνη. Η πλεονάζουσα ενέργεια αποσβένεται μέσω του κύκλου των ξανθοφυλλών στο επίπεδο της φωτοσυλλογής στην φωτοσυλλεκτική αντέννα του PSII και πιθανώς και του PSI (Demmig-Adams et al., 1996). Με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται η ενεργειακή υπερφόρτωση των κέντρων αντίδρασης των φωτοσυστημάτων και της φωτοχημικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και μειώνεται η πιθανότητα φωτοαναστολής.

Ο τρόπος λειτουργίας του κύκλου των ξανθοφυλλών συνίσταται στην μεταφορά της ενέργειας διέγερσης της χλωροφύλλης στην ξανθοφύλλη ζεαξανθίνη η οποία στη συνέχεια αποδιεγείρεται αποσβένοντας με ασφάλεια την ενέργεια υπό μορφή θερμότητας. Η ενεργειακή αυτή σύνδεση μεταξύ ζεαξανθίνης και χλωροφύλλης δεν είναι σταθερή καθώς αυτό θα μειώνει την αποδοτικότητα της φωτοσυνθετικής συσκευής στις χαμηλές εντάσεις ακτινοβολίας αλλά εγκαθίσταται όταν υπάρχει πλεόνασμα ενέργειας. Η εμπλοκή του κύκλου στην απόσβεση της πλεονάζουσας ενέργειας συνίσταται στην ενζυμική μετατροπή του ανενεργού συστατικού της βιολαξανθίνης σε ζεαξανθίνη μέσω ενός ενδιάμεσου παραγώγου, αυτού της ανθεραξανθίνης. Η μετατροπή καταλύεται από το ένζυμο αποεποξειδάση της βιολαξανθίνης το οποίο ενεργοποιείται από την οξίνιση του ενδοθυλακοειδούς χώρου. Η συσσώρευση της ζεαξανθίνης προκαλεί με τη σειρά της αλλαγές στον τρόπο οργάνωσης των τμημάτων της φωτοσυλλεκτικής αντέννας, αλλαγές οι οποίες προάγονται και από την χαμηλή τιμή του pH. Το ποσοστό συμμετοχής της ζεαξανθίνης σχετίζεται με το βαθμό εμπλοκής του κύκλου. Η ζεαξανθίνη είναι ο ενεργός αποσβέστης της ενέργειας ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι και η ανθεραξανθίνη συμμετέχει άμεσα στην απόσβεση της ενέργειας. Υπό συνθήκες απουσίας ενεργειακής υπερφόρτωσης (π.χ. στο σκοτάδι) η ζεαξανθίνη μετατρέπεται σταδιακά ξανά σε βιολαξανθίνη μέσω του ενζύμου εποξειδάση της ζεαξανθίνης και ο βαθμός εμπλοκής του κύκλου μειώνεται.

## **Εισαγωγή**

### ***1.4.2. Άλλοι μηχανισμοί φωτοπροστασίας***

#### ***1.4.2.1. Φωτοαναπνοή***

Παρόλο που η φωτοαναπνοή έχει συσχετιστεί κυρίως με την μείωση της φωτοσυνθετικής ταχύτητας, η λειτουργία της προσφέρει αναμφίβολα μια βαλβίδα εκτόνωσης της ενεργειακής υπερφόρτωσης της φωτοσυνθετικής συσκευής για τους παρακάτω λόγους: **α)** η φωτοαναπνοή έχει ενεργειακό κόστος συμβάλλοντας έτσι στην αποφόρτωση πλεονάζουσας ενέργειας υπό τη μορφή ATP όταν η φωτοσυνθετική αφομοίωση του CO<sub>2</sub> ως κύρια διεργασία ανάλωσής του δεν μπορεί να διεξαχθεί με υψηλούς ρυθμούς. **β)** η φωτοαναπνοή αυξάνεται όταν οι συνθήκες για τη φωτοσυνθετική αξιοποίηση της παραγόμενης ενέργειας είναι δυσμενείς, δηλ. υπό συνθήκες υψηλών εντάσεων ακτινοβολίας ή/και υπό συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> στα σημεία αφομοίωσης.

#### ***1.4.2.2. Αντίδραση Mehler και χλωροπλαστική αναπνοή***

Οι δύο αυτοί φωτοχημικοί φωτοπροστατευτικοί μηχανισμοί στηρίζονται στην εναλλακτική διοχέτευση ηλεκτρονίων προς το οξυγόνο. Στην αντίδραση Mehler, που ονομάζεται εναλλακτικά κύκλος νερού-νερού, το οξυγόνο ανάγεται προς υπεροξειδικό ανιόν (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) το οποίο μπορεί ακολούθως να μετατραπεί προς υπεροξειδίο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) μέσω της δισμουτάσης του υπεροξειδίου. Ακολούθως, το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μετατρέπεται προς H<sub>2</sub>O μέσω της υπεροξειδάσης του ασκορβικού οξέος. Το μονο-δεϋδρο-ασκορβικό οξύ μπορεί στη συνέχεια να αναχθεί από το PSI με δαπάνη NADPH το οποίο επιπλέον παρέχει οξειδωμένο NADP<sup>+</sup> με συνέπεια την περαιτέρω ενεργειακή αποφόρτιση του PSI. Η χλωροπλαστική αναπνοή είναι ακόμα μια ακολουθία φωτοχημικών αντιδράσεων κατά την οποία τα ηλεκτρόνια της φωτοχημικής αλυσίδας, συγκεκριμένα προερχόμενα από την πλαστικινόνη, ανάγουν το O<sub>2</sub> με συνέπεια την ενεργειακή αποφόρτιση της φωτοσυνθετικής συσκευής (Niyogi, 2000).

#### ***1.4.2.3. Ο ρόλος των ανθοκυανιούχων ιστών ως οπτικών φωτοπροστατευτικών φραγμάτων***

Μια σειρά πειραματικών δεδομένων δείχνουν ότι οι ανθοκυανίνες μειώνουν την φωτοαναστολή και την φωτολέυκανση των χλωροφυλλούχων ιστών υπό συνθήκες υψηλών εντάσεων ακτινοβολίας. Οι ανθοκυανίνες συχνά εμφανίζονται σε επιφανειακούς ιστούς οι οποίοι εκτίθενται σε υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας. Η συσσώρευσή τους απαιτεί την παρουσία φωτός και συχνά συμπίπτει χρονικά με περιόδους κατά τις οποίες η ενεργειακή πίεση στους χλωροπλάστες μεγιστοποιείται λόγω συνδυασμού περιβαλλοντικών, όπως π.χ. επικράτηση χαμηλών θερμοκρασιών ή τροφοπενιών θρεπτικών στοιχείων, και ενδογενών, κυρίως αναπτυξιακών, παραμέτρων των φυτών (Steyn et al., 2002).

Η παρουσία των ανθοκυανινών σε επιφανειακούς ή εσωτερικούς ιστούς των φύλλων μεταβάλλει σημαντικά την ποσότητα και ποιότητα του φωτός το οποίο τελικά προσπίπτει στους χλωροπλάστες των φωτοσυνθετικών κυττάρων. Τα ανθοκυανικά μόρια απορροφούν κυρίως στην υπεριώδη και πράσινη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος ενώ πολύ

μικρότερη απορρόφηση παρουσιάζεται στην κυανή περιοχή και σχεδόν μηδενική στην κόκκινη περιοχή του φάσματος. Τα παραπάνω φασματικά χαρακτηριστικά έχουν οδηγήσει στην διατύπωση του κύριου επιχειρήματος κατά του φωτοπροστατευτικού ρόλου των ανθοκυανικών φίλτρων σύμφωνα με το οποίο το φάσμα απορρόφησης των ανθοκυανινών είναι σχεδόν εκ διαμέτρου αντίθετο με το φάσμα δράσης της φωτοαναστολής (Manetas, 2006). Σε γενικές γραμμές, η πειραματική διερεύνηση του πιθανού φωτοπροστατευτικού ρόλου των ανθοκυανινών περιορίζεται από την δυσκολία εύρεσης πράσινων και ανθοκυανιούχων φυτών ή τμημάτων φυτών τα οποία να είναι όμοια ως προς τις υπόλοιπες ιδιότητές τους όπως ο βαθμός εγκλιματισμού στο φως και η θεμελιώδης φωτοχημική απόδοση της φωτοσυνθετικής συσκευής (Steyn et al., 2002).



## II. Σκοπός της εργασίας

Το φυτό *Pelargonium* sp. χαρακτηρίζεται από άτομα με πράσινο φύλλωμα σε όλη την έκταση του ελάσματος, άτομα με πράσινο φύλλωμα και ανθοκυανιούχο δακτύλιο και άτομα με ανθοκυανιούχο φύλλωμα και ανθοκυανιούχο δακτύλιο. Στις τρεις αυτές μορφοτυπικές κατηγορίες μπορούν συνεπώς να βρεθούν περιοχές του ελάσματος με τρία διαφορετικά επίπεδα συσσώρευσης ανθοκυανινών εκ των οποίων στο πρώτο επίπεδο οι ανθοκυανίνες απουσιάζουν πλήρως (επίπεδο Π) ενώ το δεύτερο (Α) και τρίτο (ΑΑ) επίπεδο συσσώρευσης διαφέρουν όσον αφορά στην συγκέντρωση. Επιπλέον, τα επίπεδα συσσώρευσης ανθοκυανινών μπορούν να βρεθούν ανά δύο στο ίδιο φύλλο (επίπεδα Π και Α ή επίπεδα Α και ΑΑ). Τα δύο αυτά χαρακτηριστικά (πράσινο ή ανθοκυανιούχο έλασμα του φύλλου με δύο διαφορετικά επίπεδα συσσώρευσης ανθοκυανινών καθώς και ταυτόχρονη παρουσία ανθοκυανιούχων και μη ανθοκυανιούχων περιοχών στο ίδιο φύλλο) προσδίδουν στο πειραματικό αυτό υλικό ιδιαίτερη αξία για την μελέτη της επίδρασης των ανθοκυανινών στην φωτοπροστασία καθώς είναι δυνατή σύγκριση πράσινων και ανθοκυανιούχων περιοχών τα κύτταρα των οποίων έχουν ελάχιστες διαφορές όσον αφορά στον εγκλιματισμό τους στο φως και καμία διαφορά όσον αφορά στο γονότυπο. Επίσης, είναι δυνατή η μελέτη της συμβολής των ανθοκυανινών σε ποσοτική βάση συγκρίνοντας τις περιοχές Α και ΑΑ του ελάσματος.

Με βάση τα παραπάνω, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση του πιθανού φωτοπροστατευτικού ρόλου των ανθοκυανινών των φύλλων του φυτού *Pelargonium* sp. Για την προσέγγιση της υπόθεσης εργασίας τέθηκαν τα παρακάτω ερωτήματα: α) πως επιδρά το επίπεδο συσσώρευσης των ανθοκυανινών στη σύσταση των φωτοσυνθετικών χρωστικών των φύλλων; β) πως επιδρά το επίπεδο συσσώρευσης των ανθοκυανινών στις παραμέτρους απόδοσης της φωτοσυνθετικής συσκευής υπό συνθήκες υψηλής έντασης προσπίπτουσας ακτινοβολίας; γ) πως επιδρά το επίπεδο συσσώρευσης των ανθοκυανινών στις παραμέτρους των φωτοπροστατευτικών μηχανισμών του φύλλου όπως αυτές εκφράζονται μέσω της μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού της χλωροφύλλης; και τέλος, δ) αλλάζει η πιθανή συμβολή του ανθοκυανικού φίλτρου στην φωτοπροστασία κάτω από υψηλή ένταση προσπίπτουσας ακτινοβολίας και χαμηλή θερμοκρασία, συνθήκες οι οποίες αυξάνουν την πιθανότητα φωτοανατολής;





### III. Υλικά και Μέθοδοι

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

Η προμήθεια γλαστρικών φυτών του είδους *Pelargonium* sp. (Geraniaceae) έγινε από εμπορικό φυτώριο. Η επιλογή των φαινοτύπων έγινε βάσει της παρουσίας ανθοκυανινών στα φύλλα. Τα φυτά τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης με φωτοπερίοδο 16 h, θερμοκρασία 20/25 °C και σχετική υγρασία 50/70% (ημέρα/νύκτα). Ο φωτισμός προερχόταν από λαμπτήρες Powerstar HQI-BT-400W/D (OSRAM, GmbH, Munich, Germany) και η ένταση της φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας στο επίπεδο των φυτών ήταν κατά μέσο όρο 330  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Τα φυτά ποτίζονταν ανά ημέρα με νερό βρύσης.

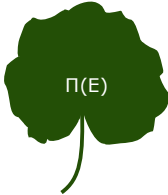
#### III.2. Φαινοτυπικές κατηγορίες των φυτών και δειγματοληπτικές κατηγορίες

Το είδος αυτό χαρακτηρίζεται από άτομα με πράσινο φύλλωμα σε όλη την έκταση του ελάσματος (φυτά Π), άτομα με πράσινο φύλλωμα και ανθοκυανιούχο δακτύλιο (φυτά Α) και άτομα με ανθοκυανιούχο φύλλωμα και ανθοκυανιούχο δακτύλιο (φυτά ΑΑ). Επισημαίνεται πως στα φυτά ΑΑ είχαν παρουσία ανθοκυανινών σε όλη την έκταση του ελάσματος συγκρίσιμη οπτικά με αυτή του ανθοκυανιούχου δακτυλίου των φυτών Α ενώ η παρουσία ανθοκυανινών στον ανθοκυανιούχο δακτύλιο των φυτών ΑΑ ήταν υψηλότερη όλων των άλλων ιστολογικών περιοχών όλων των φαινοτυπικών κατηγοριών (πίνακες 1 και 2). Με βάση τις μορφοτυπικές κατηγορίες, οι δειγματοληπτικές κατηγορίες ορίστηκαν σύμφωνα με τον πίνακα 1.

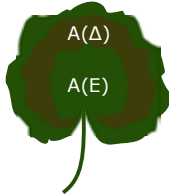
**Πίνακας 1.** Δειγματοληπτικές κατηγορίες ανά περιοχή του ελάσματος ανάλογα με τη μορφοτυπική κατηγορία των φύλλων.

μορφοτυπική κατηγορία	ιστολογική περιοχή	δειγματοληπτική κατηγορία
Π	έλασμα	Π(Ε)
Α	έλασμα	Α(Ε)
Α	ανθοκυανιούχος δακτύλιος	Α(Δ)
ΑΑ	έλασμα	ΑΑ(Ε)
ΑΑ	ανθοκυανιούχος δακτύλιος	ΑΑ(Δ)

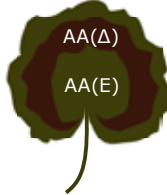
  



φυτά Π



φυτά Α



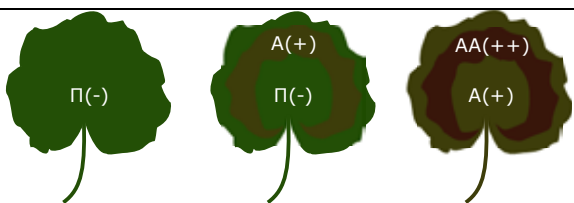
φυτά ΑΑ

## Υλικά και Μέθοδοι

Στα πειράματα της φθορισμομετρίας χλωροφύλλης και βάσει της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών έγινε συγχώνευση των δειγματοληπτικών κατηγοριών όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 2.** Αντιστοίχιση δειγματοληπτικών κατηγοριών για τα πειράματα της φθορισμομετρίας χλωροφύλλης με τις αρχικές δειγματοληπτικές κατηγορίες και τη φαινόμενη συγκέντρωση ανθοκυανινών ανά περιοχή του ελάσματος ανάλογα με τη μορφοτυπική κατηγορία των φύλλων.

δειγματοληπτική κατηγορία	φαινόμενη συγκέντρωση ανθοκυανινών	δειγματοληπτική κατηγορία φθορισμομετρίας Chl
Π(Ε)	-	Π
Α(Ε)	-	Π
Α(Δ)	+	Α
ΑΑ(Ε)	+	Α
ΑΑ(Δ)	++	ΑΑ

φυτά Π                      φυτά Α                      φυτά ΑΑ

### III.3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης χλωροφυλλών και ανθοκυανινών

Ο προσδιορισμός των χλωροφυλλών και ανθοκυανινών έγινε στο ίδιο εκχύλισμα. Για το σκοπό αυτό προτιμήθηκε η μεθανολική εκχύλιση. Δίσκοι φύλλων συνολικής επιφάνειας 2-3 cm<sup>2</sup> αφαιρέθηκαν με τη βοήθεια φελοτρυπητήρα και λειοτριβήθηκαν με παγωμένη μεθανόλη (1 ml) σε παγωμένο πορσελάνινο γουδί στο οποίο επιπλέον προστέθηκε άμμος εκχύλισης και μικρή ποσότητα CaCO<sub>3</sub> για την αποφυγή μετατροπής της χλωροφύλλης σε φαιοφυτίνη. Μετά την ομογενοποίηση, η εκχύλιση και μεταφορά του εκχυλίσματος σε δοκιμαστικό σωλήνα πραγματοποιήθηκε με επιπλέον 7 ml μεθανόλη. Τα εκχυλίσματα παρέμειναν σε πάγο έως την φυγοκέντρηση (2600 × g, 10 min) και το υπερκείμενο συμπληρώθηκε με μεθανόλη έως τελικού όγκου (συνήθως 10 ml). Όλοι οι χειρισμοί έγιναν σε χαμηλό φωτισμό.

Η φωτομέτρηση για χλωροφύλλες πραγματοποιήθηκε σε μήκη κύματος 665,2 και 652,4 nm. Ακολούθως, το εκχύλισμα οξινίστηκε με HCl (136 μl διαλύματος 6 N HCl ανά 3 ml εκχυλίσματος – τελική συγκέντρωση HCl 1% κ.β.) για την σταθεροποίηση του φάσματος απορρόφησης των ανθοκυανικών μορίων και φωτομετρήθηκε στα 657 και 530 nm.

Η ποσοτικοποίηση των χλωροφυλλών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον Lichtenthaler (1987) και των ανθοκυανινών σύμφωνα με τους Mancinelli et al. (1975). Στην τελευταία περίπτωση, η συμβολή των χλωροφυλλών στην απορρόφηση στα 530 nm αφαιρέθηκε βάσει της απορρόφησής τους στα 657 nm.

### III.4. Φθορισμομετρία χλωροφύλλης

Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το φθορισμόμετρο χλωροφύλλης PAM-2100 (Walz, Efeltrich, Germany). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της φωτοπεριόδου σε σειρά με πρώτο την μέτρηση της θεμελιώδους φωτοχημικής ικανότητας του PS II, δεύτερο την ανάλυση απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης μετά την επαγωγή της φωτοσύνθεσης και τρίτο την μελέτη της κινητικής χαλάρωσης στο σκοτάδι.

#### III.4.1. Μετρήσεις θεμελιώδους φωτοχημικής ικανότητας του PS II

Για τη μέτρηση της θεμελιώδους φωτοχημικής ικανότητας του PS II ( $\Phi_{PSII_0}$ ) τα δείγματα προσυσκοτίστηκαν για 30 min με χρήση των υποδοχών συσκότισης του οργάνου μέτρησης. Ακολούθως, εφαρμόστηκε ακτινοβολία μέτρησης (ML, 650 nm, PAR < 0,15  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) η ένταση της οποίας ρυθμίστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του οργάνου μέτρησης. Για τις εντάσεις της ML οι οποίες εφαρμόστηκαν δεν παρατηρήθηκε ακτινικό αποτέλεσμα βάσει της παρακολούθησης της σταθερότητας της έντασης του φθορισμού βάσης ( $F_0$ ) (Logan et al., 2007). Η φθορισμός βάσης καταγράφηκε τρεις φορές αρχικά και τρεις φορές μετά την εφαρμογή σκοτεινού ερυθρού φωτός (FR, 10 s, 730 nm,  $E < 15 \text{ W m}^{-2}$ ). Από τις έξι τιμές  $F_0$  επιλέχθηκε για τους υπολογισμούς η μικρότερη τιμή. Ακολούθως εφαρμόστηκε παλμός κορεσμού (SP, 0,8 s, λευκό φως, PAR 15000  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) για την καταγραφή του μέγιστου φθορισμού ( $F_m$ , εικόνα 4). Η  $\Phi_{PSII_0}$  υπολογίστηκε ως  $F_v / F_m$  όπου  $F_v = F_m - F_0$ .

#### III.4.2. Καταγραφή της καμπύλης βραδείας κινητικής επαγωγής φωτοσύνθεσης σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες

Μετά την μέτρηση της  $\Phi_{PSII_0}$  εφαρμόστηκε ακτινικό φως (AL, λευκό φως, PAR 1600  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) για χρονικό διάστημα 14 min στη διάρκεια του οποίου εφαρμόζονταν παλμοί κορεσμού (SP, 1,2 s, ανά 30 s, λευκό φως, PAR 15000  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) για τον προσδιορισμό του μέγιστου φθορισμού ( $F'_m$ ). Αμέσως μετά την ακολουθία των παλμών κορεσμού και την παύση του ακτινικού φωτός έγινε προσδιορισμός του φθορισμού βάσης ( $F'_0$ ) χρησιμοποιώντας σκοτεινό ερυθρό φως (FR, 3 s, 730 nm,  $E < 15 \text{ W m}^{-2}$ , εικόνα 4).

#### III.4.3. Καταγραφή της καμπύλης βραδείας κινητικής χαλάρωσης στο σκοτάδι σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες

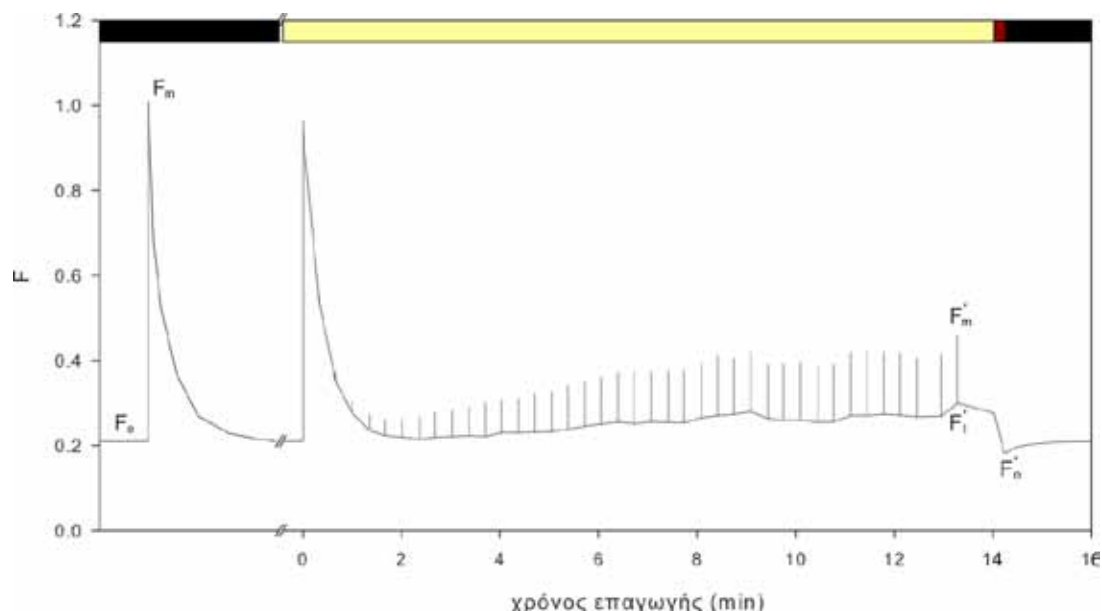
Για την καταγραφή της κινητικής της απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης στο σκοτάδι το δείγμα φωτίστηκε με όμοια χαρακτηριστικά ακτινοβολίας με αυτά της επαγωγής της φωτοσύνθεσης της αμέσως προηγούμενης ανάλυσης και εφαρμόστηκε ακολουθία παλμών κορεσμού (SP, 1,2 s, σε χρόνους 15, 45, 75, 105 και 135 s, λευκό φως, PAR 15000  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ώστε να προσδιοριστεί η παράμετρος  $F'_m$  υπό συνθήκες φωτισμού με σκοπό τον προσδιορισμό του συντελεστή μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης ( $q_N$ ). Αμέσως μετά, το δείγμα παρέμεινε στο σκοτάδι για χρονικό διάστημα 30 min στην αρχή του οποίου εφαρμόστηκε σκοτεινό ερυθρό φως (FR, 3 s, 730 nm,  $E < 15 \text{ W m}^{-2}$ ) και ακολούθως παλμοί κορεσμού (SP, 1,2 s, σε χρόνους 10, 22, 36, 53, 74, 99, 129, 165, 208,

## Υλικά και Μέθοδοι

260, 322, 396, 485, 592, 699, 806, 913, 1020, 1127, 1234, 1341, 1448, 1555 και 1662 s, λευκό φως, PAR 15000  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) για τον προσδιορισμό του μέγιστου φθορισμού ( $F'_m$ ). Σε χρόνους 380, 900 και 1646 s καθώς και μετά το πέρας της ακολουθίας των παλμών κορεσμού έγινε προσδιορισμός του φθορισμού βάσης ( $F'_o$ ) χρησιμοποιώντας σκοτεινό ερυθρό φως (FR, 3 s, 730 nm,  $E < 15 \text{ W m}^{-2}$ ).

### III.4.4. Ανάλυση της καμπύλης βραδείας κινητικής επαγωγής της φωτοσύνθεσης και υπολογισμός παραμέτρων απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης στο φως

Στην εικόνα 4 φαίνεται μια τυπική καμπύλη βραδείας κινητικής της επαγωγής της φωτοσύνθεσης σε ένα φύλλο *Pelargonium* sp. σε ένταση ακτινικού φωτός  $1600 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Από την ανάλυση της καμπύλης κινητικής διαπιστώθηκε ότι η σταθερή κατάσταση επιτυγχάνεται σε χρόνο περίπου 10 min. Η  $\Phi_{\text{PSII}}$  υπολογίστηκε ως  $\Delta F / F'_m = (F'_m - F'_t) / F'_m$ . Οι συντελεστές φωτοχημικής και μη φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού υπολογίστηκαν ως  $qP = \Delta F / (F'_m - F'_o) = (F'_m - F'_t) / (F'_m - F'_o)$  και  $qN = (F_m - F'_m) / (F_m - F'_o)$  αντίστοιχα. Ο ρυθμός μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού υπολογίστηκε ως  $\text{NQP} = (F_m - F'_m) / F'_m$ .



**Εικόνα 4.** Καταγραφή ελάχιστου φθορισμού βάσης ( $F_o$ ) και απόλυτα μέγιστου φθορισμού ( $F_m$ ) σε φύλλο εγκλιματισμένο στο σκοτάδι και εκτέλεση καμπύλης επαγωγής της φωτοσύνθεσης όπου καταγράφονται ο μέγιστος ( $F'_m$ ), ο σταθερός ( $F'_t$ ) και ο ελάχιστος φθορισμός βάσης ( $F'_o$ ).

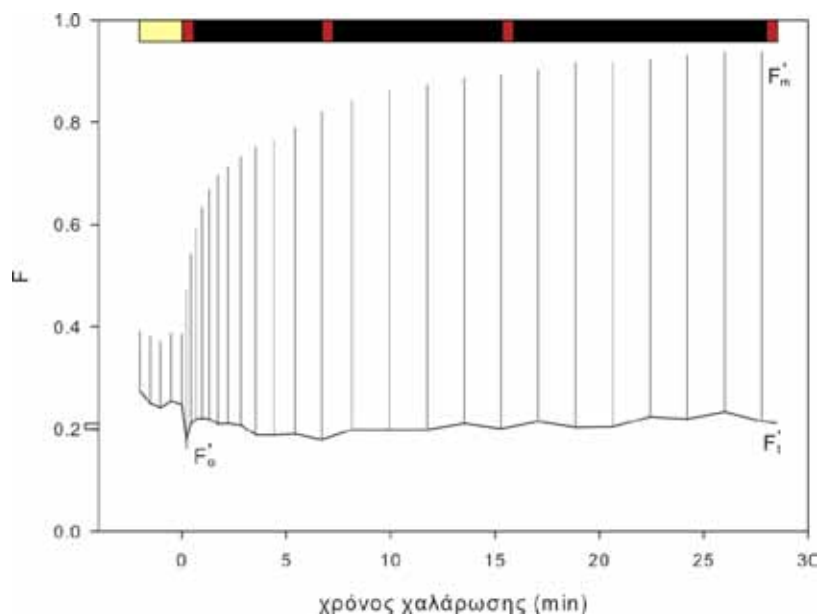
Στον πίνακα 3 συνοψίζονται οι παράμετροι της κινητικής του φθορισμού και οι παράμετροι της ανάλυσης απόσβεσης του φθορισμού που μετρήθηκαν ή υπολογίστηκαν στη διάρκεια των δύο πειραμάτων.

**Πίνακας 3.** Παράμετροι κινητικής του φθορισμού χλωροφύλλης, απόσβεσης του φθορισμού της χλωροφύλλης και λειτουργικών χαρακτηριστικών του PSII κατά την ανάλυση των καμπυλών βραδείας κινητικής επαγωγής του φθορισμού στο φως και χαλάρωσης του φθορισμού στο σκοτάδι (Maxwell and Johnson, 2000; Baker, 2008).

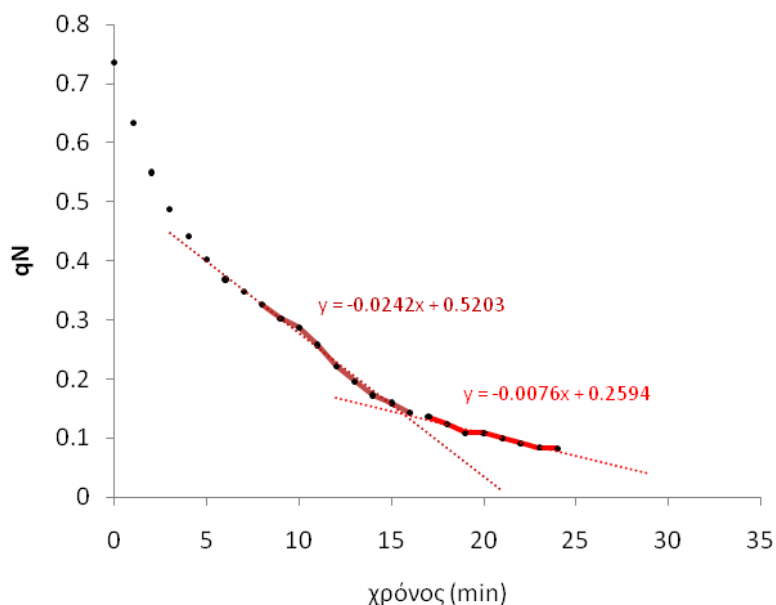
Συμβολισμός	υπολογίζεται ως	ονομασία	περιγραφή / φυσιολογική σημασία	συνθήκες φωτισμού κατά την μέτρηση
$F, F'$	-	απόδοση φθορισμού	η σχετική ένταση του φθορισμού όπως καταγράφεται από το όργανο μέτρησης	ML και επιπλέον οποιοδήποτε άλλο είδος ακτινοβολίας
$F'_t$	-	απόδοση φθορισμού σε σταθερές συνθήκες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

**III.4.5. Ανάλυση της καμπύλης βραδείας κινητικής χαλάρωσης και υπολογισμός παραμέτρων απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης**

Στην εικόνα 5 φαίνεται μια τυπική καμπύλη βραδείας κινητικής χαλάρωσης σε ένα φύλλο *Pelargonium* sp. μετά από την παύση της εφαρμογής ακτινικού φωτός έντασης 1600  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Από την καμπύλη αυτή υπολογίζεται αρχικά η μεταβολή του  $qN$  συναρτήσει



**Εικόνα 5.** Καταγραφή φθορισμού βάσης ( $F_v'$ ), σταθερού ( $F_t'$ ) και μέγιστου φθορισμού ( $F_m'$ ) σε καμπύλη χαλάρωσης μετά την παύση του ακτινικού φωτός.



**Εικόνα 6.** Μεταβολή του  $qN$  με το χρόνο χαλάρωσης μετά την παύση ακτινικού φωτός. Στην καμπύλη προσαρμόζονται δύο ευθείες οι οποίες αντιστοιχούν στα εύρη γραμμικής μεταβολής των συνιστωσών ( $qT+qI$ , η πρώτη) και ( $qI$ , η δεύτερη). Με προβολή των ευθειών προς τον κατακόρυφο άξονα μπορεί να υπολογιστεί η αρχική τιμή των συνιστωσών.

του χρόνου (εικόνα 6). Ακολούθως προσδιορίζονται οι δύο ευθύγραμμες περιοχές της καμπύλης οι οποίες αντιστοιχούν στην μεταβολή με το χρόνο των συνιστωσών  $q_T+q_I$  και  $q_I$  και προσαρμόζονται ευθείες σε αυτές. Από την προβολή των ευθειών προς τον κατακόρυφο άξονα υπολογίζεται η αρχική τιμή για κάθε συνιστώσα. Αρχικά υπολογίζεται η συνιστώσα  $q_I$  από την τρίτη περιοχή και ακολούθως η συνιστώσα  $q_T+q_I$ , δηλαδή ουσιαστικά η συνιστώσα  $q_T$ . Τέλος υπολογίζεται η συνιστώσα  $q_E$  με αφαίρεση από την αρχική τιμή της  $q_N$ .

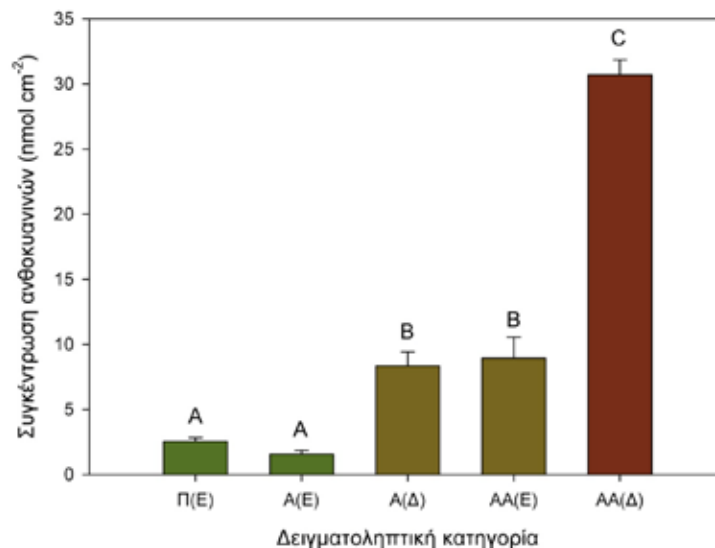




## IV. Αποτελέσματα

### IV.1. Συγκέντρωση χλωροφυλλών και ανθοκυανινών

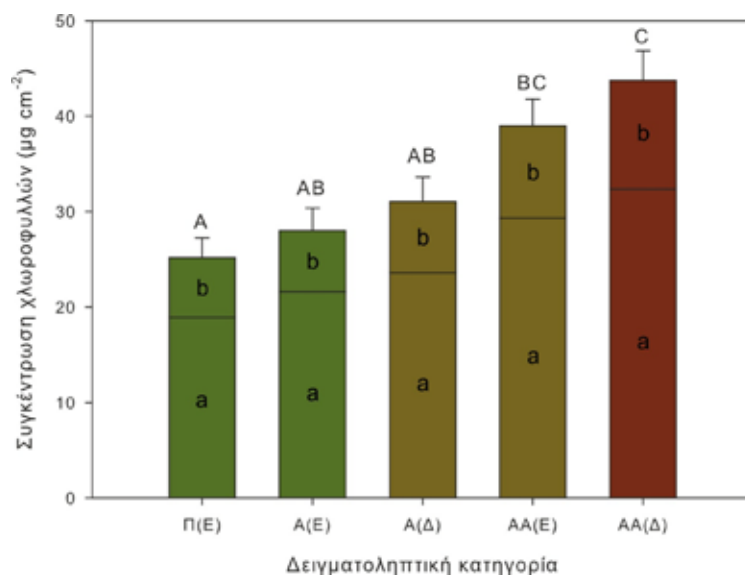
Η συγκέντρωση των ανθοκυανινών για τις πέντε δειγματοληπτικές κατηγορίες φαίνεται στην εικόνα 7. Διακρίνεται η κλιμάκωση της συγκέντρωσης μεταξύ των πέντε δειγματοληπτικών κατηγοριών καθώς και η μεγάλη διαφορά στη συγκέντρωση μεταξύ ανθοκυανιούχων και πράσινων περιοχών του ελάσματος. Επίσης, οι συγκεντρώσεις ανθοκυανινών τόσο μεταξύ ελάσματος του ομοιογενώς πράσινου φύλλου (Π(Ε)) και ελάσματος του πράσινου φύλλου (Α(Ε)) όσο και μεταξύ ανθοκυανιούχου δακτυλίου του πράσινου φύλλου (Α(Δ)) και ελάσματος του ανθοκυανιούχου φύλλου (ΑΑ(Ε)) είναι πρακτικά όμοιες (εικόνα 7) γεγονός το οποίο δικαιολογεί την σύμπτυξη των πέντε δειγματοληπτικών κατηγοριών σε τρεις κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων φθορισμομετρίας χλωροφύλλης (βλ. ενότητα IV.2).



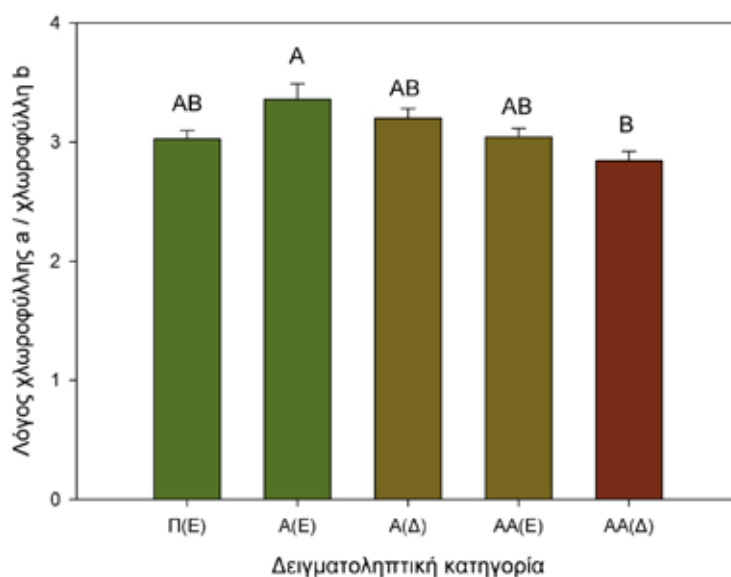
**Εικόνα 7.** Συγκέντρωση ανθοκυανινών στα φύλλα στις πέντε δειγματοληπτικές κατηγορίες. Οι τιμές είναι μέσοι όροι 5 επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους κατά Tuckey ( $P < 0.05$ ).

Μεταξύ των πέντε δειγματοληπτικών κατηγοριών η συγκέντρωση χλωροφυλλών υπάρχει μια σαφής τάση αύξησης της συγκέντρωσης χλωροφυλλών με την αύξηση της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών (εικόνα 8). Καθώς δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στο πάχος του ελάσματος μεταξύ των δειγματοληπτικών κατηγοριών, οι διαφορές στη συγκέντρωση των χλωροφυλλών ανά μονάδα επιφάνειας αντικατοπτρίζουν πιθανότατα και διαφορές συγκέντρωσης χλωροφυλλών ανά μονάδα νωπού βάρους φωτοσυνθετικού ιστού. Αντίστοιχα σαφής, αν και με μικρότερες ποσοστιαίες διαφορές, είναι και η τάση μείωσης του λόγου χλωροφύλλης *a* προς χλωροφύλλη *b* των φύλλων (εικόνα 9). Είναι σαφές πως όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση ανθοκυανινών, τόσο μικρότερη είναι η τιμή του λόγου Ch1a/Ch1b.

## Αποτελέσματα

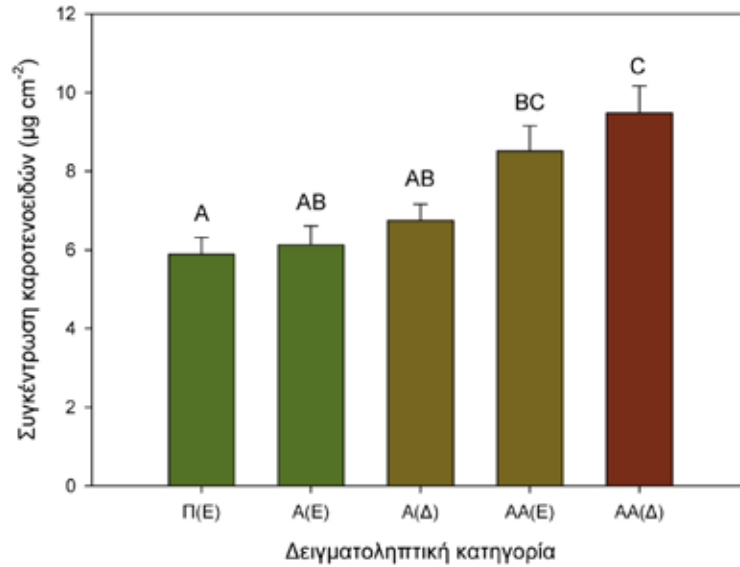


**Εικόνα 8.** Συγκέντρωση χλωροφυλλών (χλωροφύλλης a, χλωροφύλλης b και ολικών χλωροφυλλών) στα φύλλα στις πέντε δειγματοληπτικές κατηγορίες. Οι τιμές είναι μέσοι όροι 5 επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα του μέσου. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους κατά Tuckey ( $P < 0.05$ ). Εντός κάθε ράβδου σημειώνεται το τμήμα που αντιστοιχεί στην χλωροφύλλη a ή στην χλωροφύλλη b.

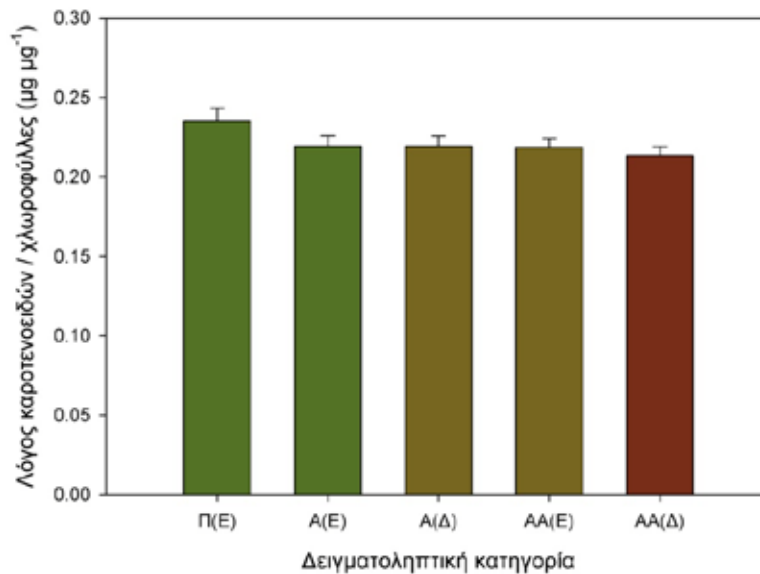


**Εικόνα 9.** Λόγος των χλωροφυλλών a και b στα φύλλα στις πέντε δειγματοληπτικές κατηγορίες. Οι τιμές είναι μέσοι όροι 5 επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα του μέσου. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους κατά Tuckey ( $P < 0.05$ ).

Ανάλογη τάση με την συγκέντρωση χλωροφυλλών παρουσιάζεται στη συγκέντρωση καροτενοειδών των φύλλων ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου (εικόνα 10) με αποτέλεσμα οι τιμές του λόγου καροτενοειδών προς χλωροφύλλες του ελάσματος των πέντε δειγματοληπτικών κατηγοριών να είναι παρόμοιες μεταξύ τους (εικόνα 11). Συνεπώς, το



**Εικόνα 10.** Συγκέντρωση καροτενοειδών στα φύλλα στις πέντε δειγματοληπτικές κατηγορίες. Οι τιμές είναι μέσοι όροι 5 επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα του μέσου. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους κατά Tukey ( $P < 0.05$ ).



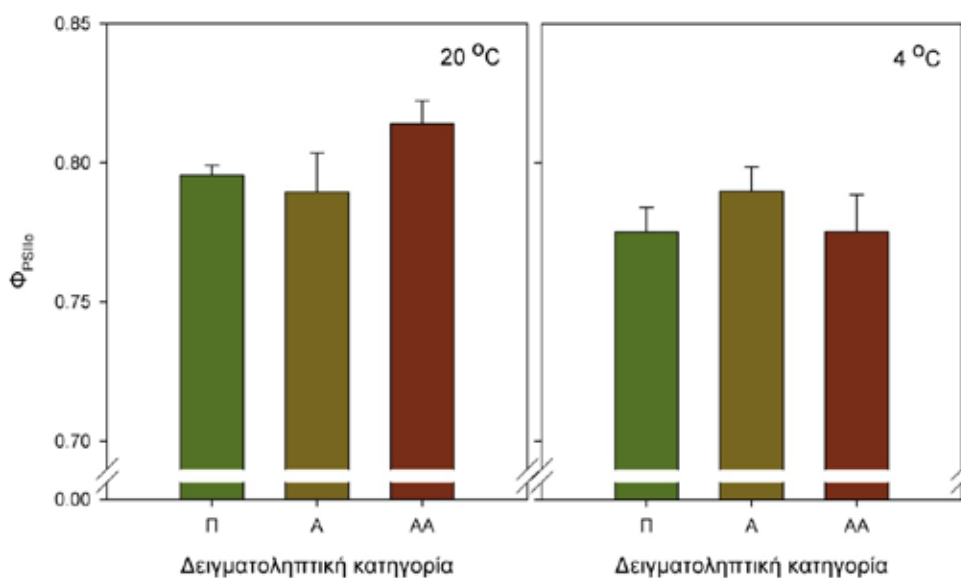
**Εικόνα 11.** Λόγος καροτενοειδών προς ολικές χλωροφύλλες στα φύλλα στις πέντε δειγματοληπτικές κατηγορίες. Οι τιμές είναι μέσοι όροι 5 επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα του μέσου. Σύμφωνα με την ανάλυση διασποράς δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων.

επίπεδο θωράκισης της φωτοσυνθετικής συσκευής μέσω των καροτενοειδών είναι παρόμοιο σε όλες τις δειγματοληπτικές κατηγορίες ή ανεξαρτήτως της παρουσίας ή απουσίας ανθοκυανινών (εικόνα 11).

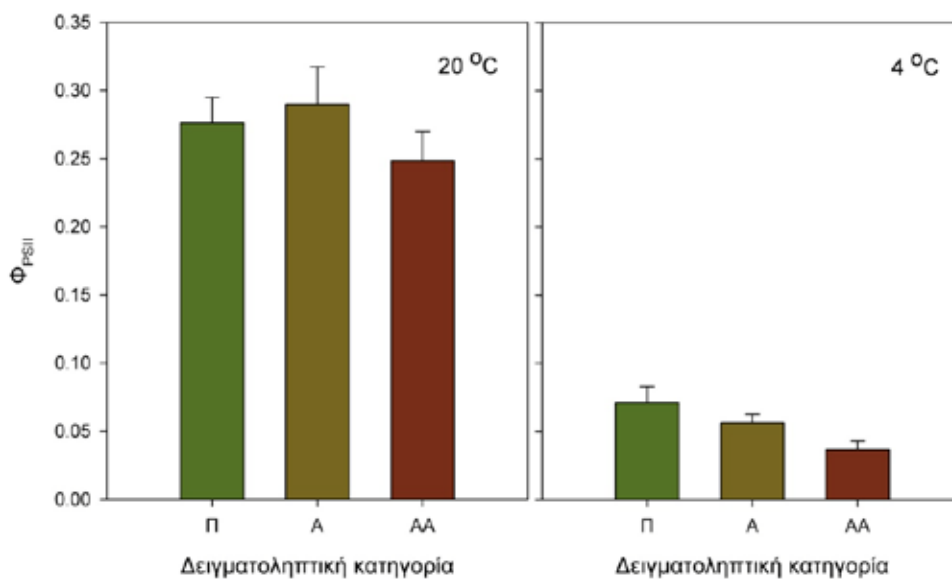
## Αποτελέσματα

### IV.2. Φωτοχημικές παράμετροι των φύλλων

Τα πειράματα αυτής της ενότητας αφορούσαν στην καταγραφή των φωτοχημικών παραμέτρων των φύλλων υπό συνθήκες υψηλής έντασης ακτινοβολίας (φωτονιακής ροής  $1600 \mu\text{mol φωτονίων m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$  και  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Όπως φαίνεται στην εικόνα 12, οι τιμές της παραμέτρου  $\Phi_{\text{PSIIo}}$  των φωτοσυνθετικών ιστών των



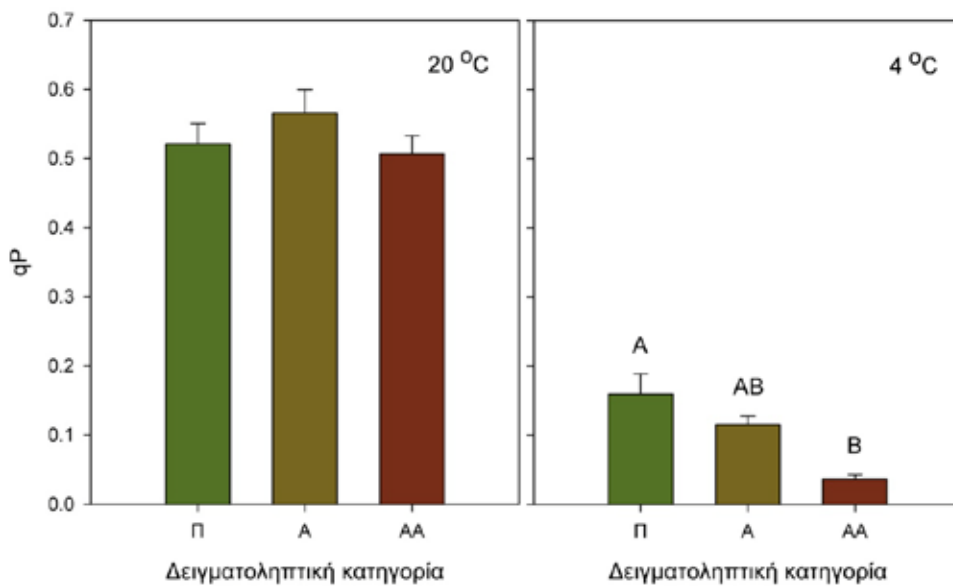
**Εικόνα 12.** Θεμελιώδης φωτοχημική ικανότητα του PSII στις τρεις δειγματοληπτικές κατηγορίες. Οι τιμές είναι μέσοι όροι 7 επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου. Σύμφωνα με την ανάλυση διασποράς δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων.



**Εικόνα 13.** Λειτουργική φωτοχημική ικανότητα του PSII στις τρεις δειγματοληπτικές κατηγορίες. Οι τιμές είναι μέσοι όροι 7 επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου. Σύμφωνα με την ανάλυση διασποράς δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων.

τριών δειγματοληπτικών κατηγοριών δεν διέφεραν σημαντικά γεγονός το οποίο απομακρύνει το ενδεχόμενο της ενδογενούς παραλλακτικότητας μεταξύ των τριών δειγματοληπτικών κατηγοριών.

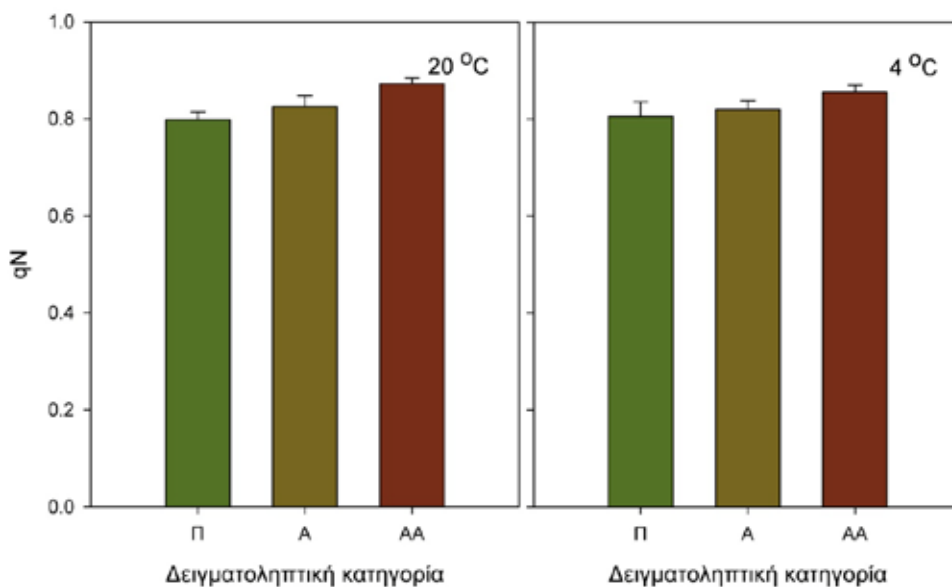
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, μετά την επαγωγή της φωτοσύνθεσης, οι τιμές της φωτοχημικής απόδοσης του PSII ήταν ελαφρώς μειωμένες για τις ανθοκυανιούχες περιοχές του ελάσματος συγκριτικά με τις πράσινες περιοχές, τόσο σε κανονική (20 °C) όσο και σε χαμηλή (4 °C) θερμοκρασία, χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντικές (εικόνα 13). Ωστόσο, μεταξύ των δύο θερμοκρασιών, οι τιμές διέφεραν σημαντικά, όπως αναμενόταν, με τις χαμηλές τιμές να σημειώνονται στις χαμηλές θερμοκρασίες (εικόνα 13).



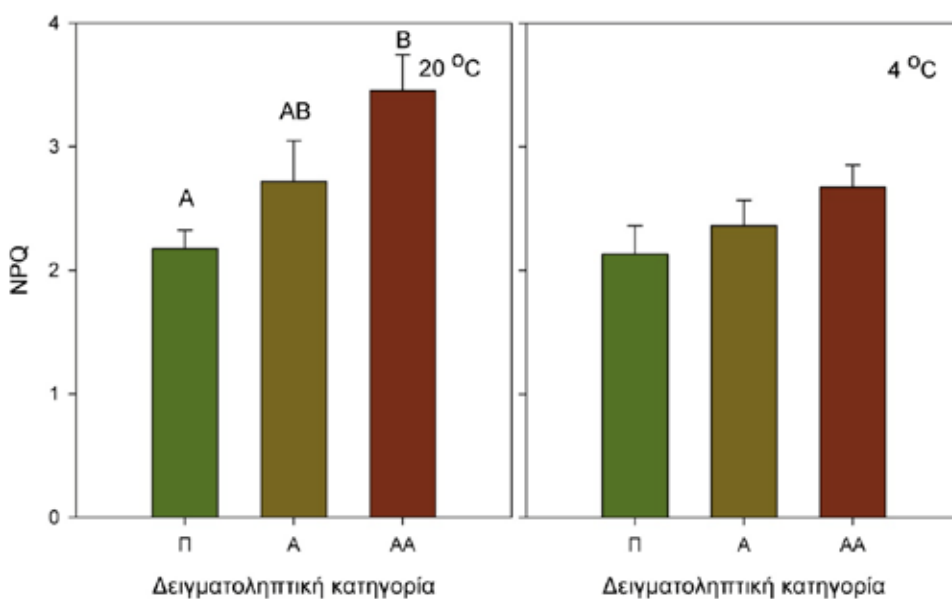
**Εικόνα 14.** Συντελεστής φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης στις τρεις δειγματοληπτικές κατηγορίες. Οι τιμές είναι μέσοι όροι 7 επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους κατά Tuckey ( $P < 0.05$ ).

Αντίστοιχη με τη μείωση των τιμών της λειτουργικής φωτοχημικής ικανότητας του PSII ήταν και η μείωση των τιμών του συντελεστή φωτοχημικής απόσβεσης (qP, εικόνα 14). Ωστόσο, στην περίπτωση αυτή και συγκεκριμένα στην θερμοκρασία των 4 °C, η μείωση ήταν μεγαλύτερη, φτάνοντας μεταξύ των δύο ακραίων δειγματοληπτικών κατηγοριών Π και AA στο 77%, και στατιστικά σημαντική (εικόνα 14). Αντίθετα με την παράμετρο qP, οι τιμές του συντελεστή μη-φωτοχημικής απόσβεσης (qN, εικόνα 15) δεν παρουσίασαν μεγάλες διαφορές μεταξύ των δειγματοληπτικών κατηγοριών όσο και μεταξύ των δύο θερμοκρασιών. Ωστόσο, οι τιμές του qN ήταν ιδιαίτερα υψηλές, γεγονός το οποίο αναμενόταν λόγω της υψηλής έντασης προσπίπτουσας ακτινοβολίας η οποία εφαρμόστηκε, και ως εκ τούτου οι διαφορές ήταν αντίστοιχα μικρές. Έτσι, παρόλο που σημειώθηκε μια τάση ανόδου με την αύξηση της συγκέντρωσης ανθοκυανινών, οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

## Αποτελέσματα

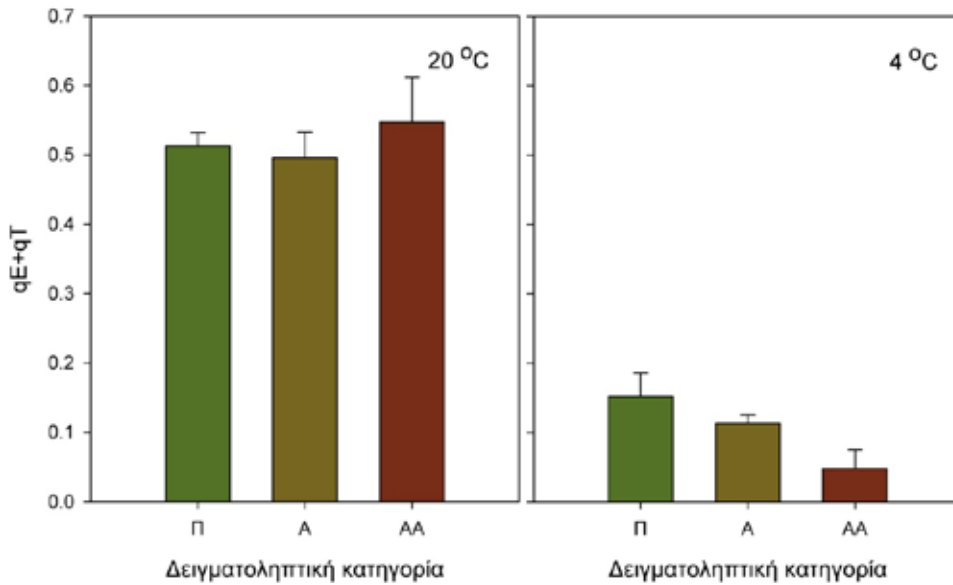


**Εικόνα 15.** Συντελεστής μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης στις τρεις δειγματοληπτικές κατηγορίες. Οι τιμές είναι μέσοι όροι 7 επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου. Σύμφωνα με την ανάλυση διασποράς δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων.



**Εικόνα 16.** Ρυθμός μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης στις τρεις δειγματοληπτικές κατηγορίες. Οι τιμές είναι μέσοι όροι 7 επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους κατά Tuckey ( $P < 0.05$ ).

Μεγάλες διαφορές παρατηρήθηκαν, τόσο μεταξύ των δειγματοληπτικών κατηγοριών όσο και μεταξύ των δύο θερμοκρασιών, στον ρυθμό μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού (NPQ, εικόνα 16). Είναι εμφανές ότι η αύξηση της συγκέντρωσης ανθοκυανινών έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του NPQ και στις δύο θερμοκρασίες. Οι μεγαλύτερες διαφορές αλλά



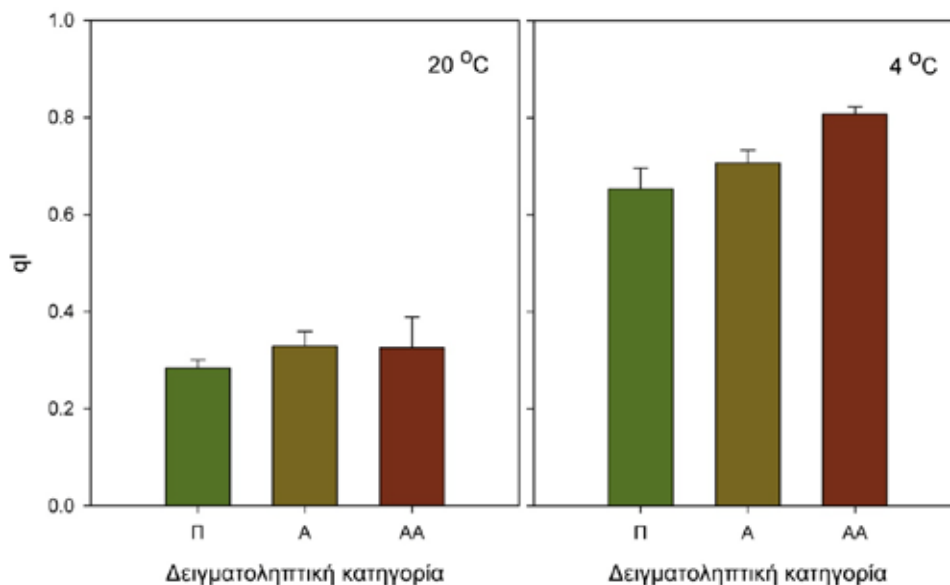
**Εικόνα 17.** Άθροισμα των συνιστωσών  $qE+qT$  του συντελεστή μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης στις τρεις δειγματοληπτικές κατηγορίες. Οι τιμές είναι μέσοι όροι 7 επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου. Σύμφωνα με την ανάλυση διασποράς δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων.

και οι απόλυτα μεγαλύτερες τιμές της παραμέτρου NPQ σημειώθηκαν στους 20 °C. Αντίθετα, στους 4 °C οι διαφορές ήταν μικρότερες και στατιστικά μη σημαντικές (εικόνα 16).

Στην εικόνα 17 παρουσιάζεται η τιμή της παραμέτρου  $qE+qT$ . Η παράμετρος αυτή είναι το άθροισμα των δύο εκ των τριών συνιστωσών του συντελεστή μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού ( $qN$ ). Σε ιδανικές συνθήκες κινητικής της χαλάρωσης του  $qN$  στο σκοτάδι, αμέσως μετά την παύση ακτινικού φωτός ορισμένης έντασης, η ανάλυση της καμπύλης κινητικής έχει ως αποτέλεσμα τον υπολογισμό και των τριών συνιστωσών του  $qN$ . Ωστόσο, στην συγκεκριμένη περίπτωση δεν ήταν δυνατή η ολοκληρωμένη ανάλυση της καμπύλης κινητικής λόγω της ανανόνηστης μορφής της. Συγκεκριμένα δεν ήταν δυνατός ο υπολογισμός των δύο συνιστωσών  $qE$  και  $qT$  χωριστά ενώ η συνιστώσα  $qI$  μπορούσε να υπολογιστεί με ασφάλεια. Έτσι, επιλέχθηκε ο υπολογισμός του αθροίσματος  $qE+qT$  με αφαίρεση του  $qI$  από την τιμή του  $qN$ . Πάντως, το άθροισμα  $qE+qT$  αντιπροσωπεύει την απόσβεση φθορισμού μέσω φωτοπροστατευτικών μηχανισμών ενώ γενικά η παράμετρος  $qI$  περιγράφεται ως μεσοπρόθεσμη απόσβεση του φθορισμού οφειλόμενη σε ελεγχόμενη φωτοαναστολή ή συσσώρευση βλαβών από υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η φωτοπροστατευτική απόσβεση του φθορισμού χλωροφύλλης δεν παρουσίασε διαφορές μεταξύ των τριών δειγματοληπτικών κατηγοριών στους 20 °C. Εμφανείς, αν και στατιστικά μη-σημαντικές, διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των τριών δειγματοληπτικών κατηγοριών στην θερμοκρασία των 4 °C όπου η αύξηση της συγκέντρωσης ανθοκυανινών έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των τιμών της παραμέτρου  $qE+qT$ . Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει



## Αποτελέσματα



**Εικόνα 18.** Συνιστώσα  $q_I$  του συντελεστή μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού χλωροφύλλης στις τρεις δειγματοληπτικές κατηγορίες. Οι τιμές είναι μέσοι όροι 7 επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου. Σύμφωνα με την ανάλυση διασποράς δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων.

την ανεπάρκεια των φωτοπροστατευτικών μηχανισμών στους ανθοκυανιούχους ιστούς στις χαμηλές θερμοκρασίες (εικόνα 17).

Κατά αναλογία με τα προηγούμενα αποτελέσματα, η παράμετρος  $q_I$  δεν παρουσίασε διαφορές μεταξύ των δειγματοληπτικών κατηγοριών στους 20 °C. Αντίθετα, οι διαφορές ήταν εμφανείς, αν και στατιστικά μη-σημαντικές, μεταξύ των τριών δειγματοληπτικών κατηγοριών στους 4 °C όπου οι ανθοκυανιούχοι ιστοί εμφάνισαν υψηλότερες τιμές (εικόνα 18). Μεταξύ των δύο θερμοκρασιών, οι τιμές της παραμέτρου  $q_I$  ήταν σημαντικά υψηλότερες στους 4 °C υποδηλώνοντας μεγαλύτερα επίπεδα φωτοαναστολής συγκριτικά με αυτά στους 20 °C γεγονός το οποίο είναι αναμενόμενο.

## V. Συζήτηση

Η παρουσία ανθοκυανινών στους φυτικούς φωτοσυνθετικούς ιστούς προβληματίζει επί δεκαετίες τους ερευνητές σχετικά με τον πιθανό ρόλο ή τους ρόλους που αυτές επιτελούν. Χαρακτηριστικό των ανθοκυανιούχων ιστών είναι το γεγονός ότι εμφανίζονται σε φυτικά όργανα τα οποία χρήσουν προστασίας είτε λόγω ηλικίας (πολύ νεαρά ή γηρασμένα) είτε λόγω της παρουσίας ενός ή περισσότερων παραγόντων καταπόνησης (συνήθως ψύχους ή τροφοπενιών θρεπτικών στοιχείων) (Gould et al., 1995; Smillie and Hetherington, 1999; Hughes et al., 2005; Liakopoulos et al., 2006). Ένα άλλο χαρακτηριστικό το οποίο υπονοεί κάποιον πολύ συγκεκριμένο ρόλο για τα ανθοκυανιούχα μόρια είναι ότι σχεδόν πάντα εμφανίζονται κόκκινα καθώς απορροφούν σε συγκεκριμένα μήκη κύματος (Manetas, 2006). Ανάλογη σταθερότητα δεν υφίσταται για τις ανθοκυανίνες των φυτικών οργάνων τα οποία επιδιώκουν την προσέλκυση ζώων για λόγους εποικονίασης ή διασποράς σπερμάτων, δηλ. των πετάλων των ανθέων και των καρπών. Οι υποθέσεις για τις λειτουργίες των ανθοκυανινών αφορούν στην προστασία από υπερβολικές εντάσεις ορατής ακτινοβολίας, προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία, απόσβεση ενεργών χημικών ειδών οξυγόνου, οσμωρύθμιση και αποτροπή φυτοφαγίας λόγω του ιδιαίτερου χρωματισμού των ανθοκυανικών ιστών. Το πλέον δύσκολο σημείο στην διεκρίνιση των ιδιοτήτων των ανθοκυανινών οι οποίες μπορεί να είναι χρήσιμες στα φυτά, είναι το γεγονός ότι κάθε ένας από τους παραπάνω ρόλους πιθανώς σε ένα βαθμό να ισχύει. Έτσι, διαφορετικά φυτά, όργανα ή ιστοί υπό διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες ή και διαφορετικά στάδια ανάπτυξης μπορεί να επιφελούνται από μια ή περισσότερες ιδιότητες των ανθοκυανινών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα ένα ισχυρό και αναμφίβολο συμπέρασμα για τον ρόλο των ανθοκυανινών π.χ. ως φωτοπροστατευτικών μορίων σε δεδομένη περίπτωση να είναι πολύ ασθενέστερο ή και εντελώς αντίθετο σε άλλες περιπτώσεις, π.χ. όπως στην περίπτωση της φωτοπροστασίας μεταξύ φύλλων και βλαστών (βλ. Gould et al., 2010).

Η πλέον διαδεδομένη υπόθεση, η οποία όμως δεν έχει έως σήμερα αποδειχθεί αδιάσειστα, σχετίζεται με τον φωτοπροστατευτικό τους ρόλο (Gould et al., 2002; Steyn et al., 2002). Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, τα ανθοκυανιούχα φίλτρα, όπως ονομάζονται οι συσσωρεύσεις ανθοκυανινών ώστε να τονιστούν οι οπτικές τους ιδιότητες, απορροφούν μέρος της ορατής, φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας. Η απορρόφηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της ενεργειακής πίεσης στη φωτοσυνθετική συσκευή η οποία οδηγεί σε μείωση των αναγκών για ενεργή φωτοπροστασία μέσω του κύκλου των ξανθοφυλλών και των λοιπών θερμικών και βιοχημικών οδών απόσβεσης του πλεονάσματος της ενέργειας. Ομοίως, η μείωση της φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας η οποία φθάνει στους χλωροπλάστες έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της πιθανότητας φωτοαναστολής. Παρόλο που οι πειραματικές ενδείξεις είναι σε μεγάλο βαθμό σύμφωνες με την υπόθεση της φωτοπροστασίας (Steyn et al., 2002), αυτή δεν επιβεβαιώνεται σε αρκετές περιπτώσεις (Manetas, 2006; Zeliou et al., 2009). Το σημαντικότερο είναι ότι οι περιπτώσεις αυτές

## Συζήτηση

αφορούν σε συγκρίσεις μεταξύ ανθοκυανιούχων ιστών του ίδιου ατόμου ή του ίδιου φυτικού οργάνου ή και πειράματα στο πεδίο όπου κατ' εξοχήν θα έπρεπε να ισχύει η υπόθεση της φωτοπροστασίας.

Το ισχυρότερο επιχείρημα για την απόρριψη της υπόθεσης της φωτοπροστασίας είναι το γεγονός ότι οι ανθοκυανίνες των φύλλων δεν απορροφούν ισχυρά σε μήκη κύματος τα οποία απορροφούνται από τις χλωροφύλλες αλλά το μέγιστο της απορρόφησής τους εντοπίζεται στην πράσινη περιοχή του φάσματος για την οποία οι ανάγκες φωτοπροστασίας είναι μικρές (Manetas, 2006). Παρόλο που η πράσινη φασματική περιοχή αξιοποιείται για την φωτοσύνθεση (Sun et al., 1998; Terashima et al., 2009), αυτό αφορά τα κύτταρα του φωτοσυνθετικού παρεγχύματος τα οποία βρίσκονται στα εσωτερικά στρώματα τα οποία έτσι και αλλιώς δέχονται πολύ λιγότερο φως και συνεπώς δεν χρειάζονται πρόσθετη φωτοπροστασία (Sun et al., 1998).

Ένα άλλο παράδοξο σημείο της υπόθεσης της φωτοπροστασίας είναι το γεγονός ότι συχνά στους ανθοκυανιούχους ιστούς παρατηρείται σύνδρομο σκίασης λόγω μικρότερης φωτοπερατότητας. Οι χλωροπλάστες των κυττάρων τα οποία είναι υπό την ανθοκυανική ομπρέλλα εγκλιματίζονται κατά τέτοιον τρόπο ώστε να μεγιστοποιήσουν την φωτοσυλλεκτική ικανότητα ανά επιφάνεια (Manetas et al., 2003). Το σύνδρομο σκίασης περιγράφεται από την μεγέθυνση της φωτοσυλλεκτικής αντένας ανά φωτόςστημα και την μείωση του αριθμού των φωτοσυστημάτων. Η αναδιοργάνωση αυτή των φωτοσυνθετικών χρωστικών έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του λόγου των δύο μορφών της χλωροφύλλης και την αύξηση της συγκέντρωσης των χλωροφυλλών (Matsubara et al., 2009). Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκαν ανάλογες διαφορές στην σύσταση των χλωροφυλλών μεταξύ ανθοκυανιούχων και πράσινων περιοχών του ελάσματος. Μάλιστα, η ένταση των μεταβολών ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών. Οι διαφορές στη συγκέντρωση των καροτενοειδών ήταν αντίστοιχες με αυτές των χλωροφυλλών με αποτέλεσμα ο λόγος καροτενοειδών προς χλωροφύλλες να είναι παρόμοιος μεταξύ ανθοκυανιούχων και πράσινων περιοχών του ελάσματος. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ανεξαρτήτως της παρουσίας ανθοκυανινών, όλες οι περιοχές του ελάσματος έχουν τον ίδιο βαθμό προστασίας από καροτενοειδή και ενδεχομένως και τις ίδιες ανάγκες φωτοπροστασίας.

Η μελέτη της φωτοσύνθεσης μέσω της *in vivo* φθορισμομετρίας χλωροφύλλης παρέχει στοιχεία για τη λειτουργικότητα των φωτεινών αντιδράσεων και συγκεκριμένα για τη διαχείριση της ενέργειας της φωτεινής ακτινοβολίας, την απόδοση του φωτοσυστήματος II και τον βαθμό φωτοπροστασίας της φωτοσυνθετικής συσκευής (Maxwell and Johnson, 2000). Προκειμένου να γίνουν συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών ιστών, είναι σκόπιμη η διαπίστωση της ομοιομορφίας όσον αφορά στην παράμετρο της θεμελιώδους φωτοχημικής ικανότητας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όλες οι δειγματοληπτικές κατηγορίες έδωσαν παρόμοιες τιμές της παραπάνω παραμέτρου και στις δύο θερμοκρασίες μέτρησης (20 και 4 °C). Στη συνέχεια η επαγωγή της φωτοσύνθεσης πραγματοποιήθηκε σε υψηλή ένταση ακτινικού φωτός (1600

$\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) ώστε η πλεονάζουσα ενέργεια διέγερσης του PSII και αντίστοιχα η ανάγκη για φωτοπροστασία να είναι αρκετά υψηλή. Υπό τις συνθήκες αυτές, σημειώθηκε σημαντική μείωση στις τιμές των παραμέτρων  $\Phi_{\text{PSII}}$  και  $qP$  οι οποίες σχετίζονται με την αποδοτικότητα χρήσης της ενέργειας διέγερσης για την φωτοχημική ροή ηλεκτρονίων και την παραγωγή μεταβολικής ενέργειας για την φωτοσυνθετική αφομοίωση στους 4 °C συγκριτικά με τους 20 °C. Το γεγονός αυτό σχετίζεται με την αδυναμία χρήσης των παραγώγων των φωτεινών αντιδράσεων στο στάδιο της αφομοίωσης του CO<sub>2</sub>. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στους ανθοκυανιούχους ιστούς η μείωση υπήρξε μεγαλύτερη και συνεπώς η παρουσία ανθοκυανινών δεν ήταν ικανή να μειώσει το πλεόνασμα της ενέργειας διέγερσης. Αντίθετα, τόσο η φωτοχημική απόδοση όσο και το ποσοστό των ανοικτών κέντρων του PSII ήταν μικρότερα παρουσίας των ανθοκυανινών. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, οι ανθοκυανιούχοι ιστοί έδωσαν υψηλότερες τιμές του ρυθμού μη-φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ανθοκυανίνες δεν συμβάλλουν στην μείωση της ενεργειακής πίεσης στους χλωροπλάστες υπό συνθήκες υψηλής έντασης ακτινοβολίας. Επίσης, υπό συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας, οι φωτοπροστατευτικές συνιστώσες της μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού ( $qE+qT$ ) ήταν σημαντικά μειωμένες και περαιτέρω μειωμένες υπό την παρουσία ανθοκυανινών. Αντίστοιχα, υπό τις συνθήκες αυτές, ο βαθμός της φωτοαναστολής ( $qI$ ) ήταν αυξημένος γεγονός το οποίο ερμηνεύει σε μεγάλο βαθμό τη σημαντική μείωση της φωτοχημικής απόδοσης υπό συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και περαιτέρω παρουσίας ανθοκυανινών.

Από τα παραπάνω προκύπτει σαφώς ότι η παρουσία ανθοκυανινών στα φύλλα του φυτού *Pelargonium* sp. δεν σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα φωτοπροστασίας των φωτοσυνθετικών κυττάρων. Μάλιστα, από τα πειράματα προέκυψε ότι οι ανθοκυανιούχοι ιστοί παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα φωτοπροστασίας και υψηλότερο ρίσκο φωτοαναστολής συγκριτικά με τους πράσινους υπό συνδυασμένες συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και υψηλής έντασης προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αυτά των Zeliou et al. (2009) όπου διαπιστώθηκε ότι, κατά τη διάρκεια του χειμώνα, τα ανθοκυανιούχα φύλλα του φυτού *Cistus creticus* είναι ταυτόχρονα και τα πιο ευαίσθητα στην φωτοαναστολή, ευαισθησία η οποία δεν μετριάζεται από την παρουσία των ανθοκυανικών μορίων. Επίσης, σε ανάλογα συμπεράσματα κατέληξαν οι Burger and Edwards (1996) αξιολογώντας την πιθανή φωτοπροστασία των ανθοκυανιούχων περιοχών του ελάσματος του φυτού *Coleus blumei* από υπερβολικές εντάσεις λευκού φωτός.



## **VI. Βιβλιογραφία**

Baker, N.R. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. Annual Review of Plant Biology, 59: 89-113.

Burger, J., Edwards, G.E. 1996. Photosynthetic efficiency, and photodamage by UV and visible radiation, in red versus green leaf coleus varieties. Plant and Cell Physiology, 37: 395-399.

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

Gould, K.S., Dudle, D.A., Neufeld, H.S. 2010. Why some stems are red: cauline anthocyanins shield photosystem II against high light stress. Journal of Experimental Botany, 61: 2707-2717.

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.

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

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. 1998. Light-guiding function of foliar sclereids in the evergreen sclerophyll *Phillyrea latifolia*: a quantitative approach. Journal of Experimental Botany, 49: 739-746.

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. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology, 148: 350-1000.

## Βιβλιογραφία

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.

Mancinelli, A.L., Yang, C.-P.H., Lindquist, P., Anderson, O.R., Rabino, I. 1975. Photocontrol of anthocyanin synthesis. III. The action of streptomycin on the synthesis of chlorophyll and anthocyanin. *Plant Physiology*, 55: 251-257.

Manetas, Y. 2006. Why some leaves are anthocyanic and why most anthocyanic leaves are red? *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 201: 163-177.

Matsubara, S., Krause, G.H., Aranda, J., Virgo, A., Beisel, K.G., Jahns, P., Winter, K. 2009. Sun-shade patterns of leaf carotenoid composition in 86 species of neotropical forest plants. *Functional Plant Biology*, 36: 20-36.

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

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

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

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 CO<sub>2</sub> fixation deep within leaves. *Plant and Cell Physiology*, 39: 1020-1026.

Taiz, L., Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology*. 3<sup>rd</sup> Edition. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

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

Zeliou, K., Manetas, Y., Petropoulou, Y. 2009. Transient winter leaf reddening in *Cistus creticus* characterizes weak (stress-sensitive) individuals, yet anthocyanins cannot alleviate the adverse effects on photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 60: 3031-3042.

Αϊβαλάκης, Γ., Καραμπουρνιώτης, Γ., Φασσέας, Κ. 2005. Γενική Βοτανική: Η Μορφολογία, η Ανατομία και η Φυσιολογία των Ανώτερων Φυτών. Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο.

## **Βιβλιογραφία**

Γανωτάκης, Δ., Κοτζαμπάσης, Κ. 2003. Φωτοσύνθεση Ι: 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.