ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

Μορφολογική ασυμμετρία, αναπαραγωγική προσπάθεια,
συσσώρευση ανθοκυανινών και φωτοσυνθετική ικανότητα
ως δείκτες αρμοστικότητας των φυτών

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Κωνσταντίνος Νικηφόρου
Βιολόγος

Πάτρα 2012

ΜΕΛΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΕΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΥΠΟΓΡΑΦΕΣ

Τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Ονοματεπώνυμο

Γ. ΚΑΡΑΜΠΟΥΡΝΙΩΤΗΣ
Καθηγητής Γεωπονικού
Παν/μίου
Αθηνών

Ονοματεπώνυμο

Α. ΚΥΠΑΡΙΣΣΗΣ
Επικ. Καθηγητής
Παν/μίου
Ιωαννίνων

Ονοματεπώνυμο

Γ. ΓΡΑΜΜΑΤΙΚΟΠΟΥΛΟΣ
Επικ. Καθηγητής
Παν/μίου
Πατρών

Ονοματεπώνυμο

Κ. ΣΤΑΜΑΤΑΚΗΣ
Ερευνητής Β'
Ε.Κ.Ε.Φ.Ε.
Δημόκριτος

Τα μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής

Ονοματεπώνυμο

Γ. ΠΕΤΡΟΠΟΥΛΟΥ
Επικ. Καθηγήτρια
Παν/μίου
Πατρών

Ονοματεπώνυμο

Σ. ΓΚΙΩΚΑΣ
Επικ. Καθηγητής
Παν/μίου
Πατρών

Ο Επιβλέπων Καθηγητής

Ονοματεπώνυμο

Γ. ΜΑΝΕΤΑΣ
Καθηγητής
Παν/μίου
Πατρών

*Στους γονείς μου
& στον μικρό Παναγιώτη*

Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Φυτών του Πανεπιστημίου Πατρών, κατά τα έτη 2007-2012.

Το πρώτο και το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στον Επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Γιάννη Μανέτα για την άψογη καθοδήγηση που μου παρείχε όλα αυτά τα χρόνια της συνεργασίας μας, καθώς και για την υπομονή, την επιμονή και το πάθος που επέδειξε καθ' όλη τη διάρκεια αυτού του κοινού μας ταξιδιού στον όμορφο κόσμο των φυτών. Τον ευχαριστώ που ήταν πάντα δίπλα μου ως ο άνθρωπος Γιάννης αλλά και ως ο ακαδημαϊκός δάσκαλος Μανέτας.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς μου συμβουλευτικής επιτροπής την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Γιόλα Πετροπούλου και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Σίνο Γκιώκα που ήταν πάντα διαθέσιμοι να με βοηθήσουν να ξεπεράσω τα διάφορα εμπόδια που αντιμετώπισα στην πορεία των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Ο συμβουλευτικός ρόλος που διετέλεσαν ήταν ουσιαστικός και ιδιαίτερος σημαντικός.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γιώργο Ψαρά και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γιώργο Γραμματικόπουλο που μου προσέφεραν ανιδιοτελώς τη βοήθεια τους τόσο σε επιστημονικά όσο και σε τεχνικά θέματα. Τον τελευταίο τον ευχαριστώ θερμά που με τίμησε με τη συμμετοχή του στην επταμελή εξεταστική επιτροπή της διατριβής μου. Ευχαριστώ πολύ όλα τα μέλη αυτής της επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Γιώργο Καραμπουρνιώτη, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Άρη Κυπαρίση και τον Ερευνητή Β' κ. Κώστα Σταματάκη για τις παρατηρήσεις και τον χρόνο που αφιέρωσαν για να εξετάσουν την παρούσα διατριβή.

Ευχαριστώ τους γονείς μου για την ηθική και οικονομική στήριξη που μου προσέφεραν αλλά και για το γεγονός ότι διασφάλισαν να μην νιώσω μοναξιά ούτε ένα λεπτό παρότι βρισκόμασταν όλα αυτά τα χρόνια μακριά. Επίσης, στα αδέρφια μου Νικηφόρο και Γρηγόρη οφείλω ευγνωμοσύνη για την ψυχολογική ώθηση που μου έδιναν πάντα. Στον πιο κοντινό μου άνθρωπο, τη Βασιλική, χρωστώ πολλά ευχαριστώ. Αποτέλεσε

την κινητήρια δύναμή μου για την εκπλήρωση της παρούσας διατριβής, ενώ η βοήθειά της απεδείχθει κάτι περισσότερο από σημαντική.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τους φίλους μου. Η βοήθεια και η στήριξη τους υπήρξε αδιάκοπη και ανιδιοτελής. Ευχαριστώ τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Φυτών Αλεξάνδρα Κυζερίδου, Ντίνα Ζέλιου, Χάρη Γιώτη, Δημήτρη Καλαχάνη και Νάστια Μπεσσόνοβα με τους οποίους πέρασα πολλές ώρες δημιουργικής συνεργασίας και σκέψης, τόσο εντός όσο και εκτός του εργαστηριακού χώρου. Ευχαριστώ θερμά ακόμη τον Γιώργο Φυττή, τον Ονούφριο Μεττούρη, την Εύα Πίτα, τον Μιχάλη Αποστόλου, την Γιάννα Παπανικολάου και την Εβελίνα που στάθηκαν δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια και μοιράστηκαν τις ανησυχίες, τους προβληματισμούς, τις χαρές αλλά και τις απογοητεύσεις μου. Πραγματικά νιώθω πολύ τυχερός που έκανα αυτό το ταξίδι γνώσης μαζί τους.

Πάτρα, 2012

Κωνσταντίνος Νικηφόρου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	i-iv
Abstract.....	v-viii
1. Εισαγωγή.....	1-40
1.1 Μορφολογική ασυμμετρία φύλλων.....	1-6
1.1.1 Αναπτυξιακή σταθερότητα και αστάθεια.....	3-4
1.1.2 Διαφορές στη μελέτη της αναπτυξιακής σταθερότητας-συμμετρίας μεταξύ φυτών και ζώων.....	4-6
1.2 Είδη μορφολογικής ασυμμετρίας.....	6-15
1.2.1 Κατευθυνόμενη ασυμμετρία.....	6-7
1.2.2 Αντισυμμετρία.....	7
1.2.3 Διακυμαινόμενη ή Τυχαία ασυμμετρία.....	7-15
1.3 Συσσώρευση ανθοκυανινών.....	16-29
1.3.1 Γενικά περί ανθοκυανινών.....	16-20
1.3.2 Ρόλοι ανθοκυανινών.....	20-29
α) Φωτοπροστασία.....	21-24
β) Αντιοξειδωτική προστασία.....	24-25
γ) Άμυνα έναντι φυτοφάγων εντόμων και παθογόνων.....	25-27
δ) Προστασία έναντι UV-B ακτινοβολίας.....	27-28
ε) Συμβολή στην ωσμωρρύθμιση - αντίσταση στην έλλειψη νερού.....	28-29
στ) Θέρμανση του φύλλου.....	29
1.4 Φωτοσύνθεση.....	30-39
1.4.1 Γενικά περί φωτοσύνθεσης.....	30-32
1.4.2 Φωτεινές αντιδράσεις.....	32-34
1.4.3 Σκοτεινές αντιδράσεις.....	34-36
1.4.4 Φθορισμός χλωροφύλλης.....	36-39
1.5 Αναπαραγωγική προσπάθεια και επιτυχία.....	39-40
2. Σκοπός διατριβής.....	41-42

3. Υλικά και Μέθοδοι.....	43-70
3.1 Επιλογή φυτών.....	43-45
3.1.1 Διακυμαινόμενη ασυμμετρία.....	43
3.1.2 Χειμερινή ερυθρότητα.....	44-45
3.1.2.1 <i>Pistacia lentiscus</i>	44
3.1.2.2 <i>Cistus creticus</i>	45
3.2 Μέτρηση ασυμμετρίας φύλλων.....	45-47
3.3 Εκτίμηση περιεχόμενων ανθοκυανινών και χλωροφυλλών.....	48-49
Φάσματο-ανακλασίμετρο UniSpec, PP Systems.....	48-49
3.4 «Εργαλεία» μέτρησης φωτοσύνθεσης.....	49-60
3.4.1 Φθορισμόμετρο Mini-PAM	
<i>In vivo</i> φθορισμός της χλωροφύλλης και φωτοσυνθετική ικανότητα.....	50
3.4.2 Φθορισμόμετρο Handy PEA.....	50-51
JIP-test.....	51-56
3.4.3 Αναλυτής αερίων Li-6400	
Μέτρηση φωτοσύνθεσης υπό ρεαλιστικές συνθήκες πεδίου.....	56-60
3.5 Σχετικό περιεχόμενο φύλλων σε άζωτο.....	60-61
Μέθοδος απόσταξης Kjeldahl.....	61
3.6 Περιοχές δειγματοληψίας και πειραματικό υλικό.....	61-70
3.6.1 Διακυμαινόμενη ασυμμετρία.....	62-63
3.6.2 <i>Pistacia lentiscus</i>	63-68
α) Ένταση χειμερινής ερυθρότητας και φωτοχημική απόδοση του φωτοσυστήματος II (κίνδυνος φωτοαναστολής).....	63-64
β) Επίπεδα αζώτου, ικανότητα καρβοξυλίωσης και φωτοσύνθεση στον ερυθρό και τον πράσινο φαινότυπο.....	64-66
γ) Ενδείξεις για επιλεκτική επίδραση του ελλείμματος αζώτου των φύλλων στην ενεργότητα του φωτοσυστήματος I.....	66-68

3.6.3 <i>Cistus creticus</i>	67-70
3.6.3.1 Ανθοκυανίνες και αρμοστικότητα στην περιβαλλοντική καταπόνηση.....	67-68
3.6.3.2 Μέτρηση αναπαραγωγικών παραμέτρων.....	68-70
4. Αποτελέσματα.....	71-105
4.1 Διακυμαινόμενη ασυμμετρία και φωτοσυνθετική ικανότητα.....	71-80
4.2 <i>Pistacia lentiscus</i>	81-102
4.2.1 Η ένταση της χειμερινής ερυθρότητας των φύλλων ως δείκτης ατόμων με μειονεξία στη φωτοσύνθεση.....	81-85
4.2.2 Ο ερυθρός φαινότυπος καταπονείται λόγω χαμηλών επιπέδων αζώτου και μειωμένης απόδοσης καρβοξυλίωσης.....	86-90
4.2.3 Το έλλειμμα αζώτου δρα επιλεκτικά στην ενεργότητα του φωτοσυστήματος I.....	90-102
4.3 <i>Cistus creticus</i>	102-104
Αρμοστικότητα ερυθρών ατόμων έναντι της περιβαλλοντικής καταπόνησης.....	102-104
5. Συζήτηση.....	105-122
5.1 Διακυμαινόμενη ασυμμετρία φύλλων.....	105-110
5.2 <i>Pistacia lentiscus</i>	110-119
5.3 <i>Cistus creticus</i>	120-122
6. Επιγραμματικά συμπεράσματα.....	123-124
6.1 Διακυμαινόμενη ασυμμετρία και φωτοσυνθετική ικανότητα.....	123
6.2 <i>Pistacia lentiscus</i>	123-124
6.3 <i>Cistus creticus</i>	124
7. Βιβλιογραφία.....	125-143

Περίληψη

Η διακυμαινόμενη ασυμμετρία των φύλλων, δηλαδή η τυχαία απόκλιση από τη συμμετρία, θεωρείται ένα μέτρο της καταπόνησης που υπέστησαν κατά την ανάπτυξή τους. Η ασυμμετρία υποδηλώνει αναπτυξιακή αστάθεια και έχει προταθεί ότι συσχετίζεται αρνητικά με την αρμοστικότητα (fitness). Εάν η φωτοσύνθεση αποτελεί έναν έμμεσο δείκτη της αρμοστικότητας, αναμένεται, ένα φύλλο με μειωμένη αρμοστικότητα να είναι και φωτοσυνθετικά υποδεέστερο. Προς επιβεβαίωση αυτού, στην παρούσα διατριβή εξετάστηκαν εκατοντάδες άθικτα φύλλα σε συνολικά 7 διαφορετικά είδη ως προς τη διακυμαινόμενη ασυμμετρία, καθώς και ως προς τη φωτοσυνθετική τους απόδοση (δείκτες PI_{total} & F_v/F_m). Ο δείκτης PI_{total} υπολογίζεται με βάση την κινητική ανάλυση των *in vivo* μεταβολών του φθορισμού της χλωροφύλλης και λαμβάνεται εύκολα και γρήγορα (εντός δευτερολέπτων). Ο δείκτης αυτός θεωρείται ανάλογος της φωτοσυνθετικής αφομοίωσης του CO_2 και περιγράφει την απόδοση τόσο του φωτοσυστήματος I (PSI) όσο και του φωτοσυστήματος II (PSII). Ο παραδοσιακός δείκτης F_v/F_m προκύπτει άμεσα από τις *in vivo* μετρήσεις φθορισμού της χλωροφύλλης και υποδεικνύει τη μέγιστη φωτοχημική ικανότητα του PSII. Δύο φυτικά είδη (*Pistacia lentiscus*, *Olea europea*) επέδειξαν θετική συσχέτιση μεταξύ διακυμαινόμενης ασυμμετρίας και φωτοσυνθετικής ικανότητας, αποτελέσμα αντίθετο από τις αρχικές προβλέψεις. Το μόνο φυτικό είδος που επιβεβαίωσε την αρχική υπόθεση ήταν το *Ceratonia siliqua*. Στα υπόλοιπα είδη (*Arbutus unedo*, *Cercis siliquastrum*, *Platanus orientalis*, *Populus alba*) δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ των δύο παραμέτρων. Τα φυτικά είδη που εμφάνισαν μεγάλες τιμές διακυμαινόμενης ασυμμετρίας ήταν και αυτά στα οποία η ασυμμετρία συχετίστηκε θετικά με τη φωτοσύνθεση. Συμπεραίνεται, εμμέσως ότι η ισχυρή ένταση της καταπόνησης κατά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης των φύλλων σε μερικά φυτά ενδεχομένως να οδηγεί σε πιο σφριγηλή φωτοσύνθεση κατά την ωριμότητά τους ή σε μεγαλύτερη ικανότητα αντοχής στην καταπόνηση. Αν το συμπέρασμα είναι αληθές, τότε μπορεί μεν η

συμμετρία να είναι ομορφότερη, δεν είναι όμως και αποδοτικότερη. Σε γενικές γραμμές, και με βάση τη βιβλιογραφία, ο δείκτης διακυμαινόμενης ασυμμετρίας των φύλλων δεν φαίνεται από μόνος του να επιτυγχάνει αξιόπιστη εκτίμηση της αρμοστικότητας. Για αυτό τον λόγο η χρησιμοποίησή του πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή και συνάμα θα πρέπει να συνδυάζεται με σειρά άλλων δεδομένων-δεικτών.

Ένας ακόμη δείκτης περιβαλλοντικής καταπόνησης μπορεί να είναι η εποχική συσσώρευση ερυθρών χρωστικών (ανθοκυανινών) που παρατηρείται στα ώριμα φύλλα ορισμένων φυτικών ειδών. Έχει προταθεί ότι οι ανθοκυανίνες των φύλλων λειτουργούν ως «ομπρέλα» προστασίας για τη φωτοσυνθετική συσκευή ενάντια στη φωτοαναστολή. Ως προς την εξέταση αυτής της υπόθεσης, η παρούσα διατριβή χρησιμοποίησε δύο πειραματόφυτα που εμφανίζουν εποχική ερυθρότητα στα φύλλα ορισμένων ατόμων τους. Αυτά είναι το *Pistacia lentiscus* και το *Cistus creticus*.

Αρχικά όσον αφορά το *P. lentiscus*, εξετάστηκε η συσχέτιση του βαθμού φωτοπροστασίας με τις πραγματικές συγκεντρώσεις ανθοκυανινών σε φύλλα ατόμων που φύονται σε συνθήκες πεδίου. Το συγκεκριμένο εγχείρημα αποτελεί καινοτομία, αφού μέχρι σήμερα δεν έχει μελετηθεί η φωτοπροστασία σε σχέση με τη διαβάθμιση της ερυθρότητας των φύλλων. Προς αυτή τη κατεύθυνση χρησιμοποιήθηκαν μη επεμβατικές οπτικές μέθοδοι (φάσματα ανακλαστικότητας και φθορισμός χλωροφύλλης) για να αποτιμήσουν τα επίπεδα ανθοκυανινών και χλωροφυλλών καθώς και τη φωτοχημική απόδοση του PS II, σε εκατοντάδες ώριμα φύλλα του φυτικού είδους *P. lentiscus* (σχίνος). Ο σχίνος κατά τη χειμερινή περίοδο εμφανίζει κόκκινους (όλων των διαβαθμίσεων ερυθρού χρώματος) και πράσινους φαινότυπους. Αντίθετα με την υπόθεση που υποστηρίζει το φωτοπροστατευτικό ρόλο των ανθοκυανινών, η ένταση της ερυθρότητας συσχετίστηκε θετικά με τη φωτοαναστολή και αρνητικά με τα επίπεδα των εμπεριεχόμενων χλωροφυλλών στα φύλλα. Έτσι, ο πιθανός φωτοπροστατευτικός ρόλος των ανθοκυανινών δεν επιβεβαιώθηκε. Ωστόσο, η χειμερινή ερυθρότητα των φύλλων στο σχίνο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας ρεαλιστικός, γρήγορος

και μη επεμβατικός τρόπος εντοπισμού ατόμων «ευάλωτων» στη χειμερινή καταπόνηση.

Σε μετέπειτα στάδιο στο ίδιο φυτικό είδος, εξετάστηκε *in situ* η σχέση της χειμερινής ερυθρότητας των φύλλων με σειρά άλλων φωτοσυνθετικών παραμέτρων. Συγκρινόμενοι με τους πράσινους φαινότυπους κατά τη διάρκεια του χειμώνα, οι ερυθροί (ανθοκυανικοί) φαινότυποι παρουσίασαν χαμηλότερες ταχύτητες αφομοίωσης CO₂. Βρέθηκε ότι αυτό οφείλεται στη χαμηλή περιεκτικότητα ή/και ενεργότητα του ενζύμου καρβοξυλάση/οξυγονάση της διφωσφορικής ριβουλόζης (Rubisco) των ερυθρών φύλλων, ενώ ταυτόχρονα η στοματική αγωγιμότητα δεν φάνηκε να είναι περιοριστική για τη φωτοσύνθεση. Συγχρόνως, οι ερυθροί φαινότυποι βρέθηκε ότι περιέχουν λιγότερο άζωτο σε σχέση με τους πράσινους. Το εύρημα αυτό πιθανώς συνδέεται με την παρατηρούμενη χαμηλή περιεκτικότητα του ενζύμου Rubisco και τον μειωμένο φωτοσυνθετικό ρυθμό των ερυθρών φύλλων. Η περιορισμένη ικανότητα των αντιδράσεων καρβοξυλίωσης να χρησιμοποιήσουν αναγωγική δύναμη και ηλεκτρόνια, ενδεχομένως εξηγεί και τη μειωμένη απόδοση παγίδευσης φωτονίων του PSII που σημειώνεται στους ερυθρούς φαινότυπους. Σε οποιαδήποτε περίπτωση, η ανάπτυξη της ανθοκυανικής «ομπρέλας» δεν φαίνεται να αποσοβεί το κίνδυνο φωτοαναστολής της φωτοσύνθεσης στον ερυθρό φαινότυπο του σχίνου.

Ως παραπροϊόν της εργασίας με το *P. lentiscus*, εξετάστηκε η πιθανή επίδραση των φυσικών διακυμάνσεων του αζώτου των φύλλων του στις φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν οι φυσιολογικές διακυμάνσεις του αζώτου ώριμων φύλλων σε συνδυασμό με την ανάλυση των αντίστοιχων καμπυλών ταχείας ανόδου του φθορισμού της χλωροφύλλης. Η μαθηματική ανάλυση των καμπυλών έγινε σύμφωνα με το λεγόμενο «JIP-test», γεγονός που επέτρεψε την εκτίμηση της εν δυνάμει δραστηριότητας των δύο φωτοσυστημάτων. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν εξάρτηση από την εποχή, επιτρέποντας την εξαγωγή του συμπεράσματος ότι η έλλειψη αζώτου επηρεάζει επιλεκτικά και αρνητικά το PSI, ενώ η αρνητική

επίδραση στο PSII περιορίζεται μόνο κατά τη δυσμενή-χειμερινή περίοδο του έτους.

Ένας δεύτερος Μεσογειακός θάμνος που εξετάστηκε ήταν το είδος *Cistus creticus*. Όπως και ο σχίνος, το είδος αυτό επιδεικνύει χαρακτηριστική ενδοειδική ποικιλομορφία στην έκφραση του ανθοκυανικού χαρακτήρα στα φύλλα του. Συγκεκριμένα, μερικά άτομα κοκκινίζουν το χειμώνα, ενώ γειτονικά τους κάτω από τις ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες παραμένουν πράσινα. Η ερυθρότητα των φύλλων διατηρείται μέχρι τα μέσα της άνοιξης. Αυτό το σύστημα απεδείχθη κατάλληλο, όχι μόνο για τη μελέτη του φυσιολογικού ρόλου των ανθοκυανινών αλλά και για τη προσέγγιση οικολογικών ερωτημάτων που σχετίζονται με την αρμοστικότητα (fitness) των δύο φαινότυπων. Επίσης, απεδείχθη πως η φυλλική ερυθρότητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας οπτικός δείκτης καταπόνησης. Ως τελικές παράμετροι αρμοστικότητας χρησιμοποιήθηκαν, η αναπαραγωγική προσπάθεια ως ο αριθμός ανθέων ανά άτομο, η αναπαραγωγική επιτυχία ως ο αριθμός σπερμάτων ανά άτομο καθώς και η επικονιστική επιτυχία ως ο αριθμός καρπών ανά αριθμό ανθέων και ως ο αριθμός σπερμάτων ανά καρπό. Η μελέτη αυτή, συνδιαζόμενη με σειρά φυσιολογικών δεικτών που εξέτασαν άλλα μέλη της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι, παρόλο που οι φυσιολογικοί δείκτες εμφανίζουν τον ερυθρό φαινότυπο υποδεέστερο, αντίθετα οι αναπαραγωγικοί δείκτες (αποτελέσματα παρούσας διατριβής) δεν παρουσίασαν διαφορές. Εν τέλει, μπορεί ίσως να λεχθεί πως η παρουσία της ερυθρότητας υποδεικνύει μεν «ασθενέστερα» άτομα (που με τη βοήθεια των ανθοκυανινών ίσως επιτυγχάνουν κάποια αντιστάθμιση αυτών των ενδογενών φυσιολογικών και γενετικών αδυναμιών τους), όχι όμως τόσο ασθενικά ώστε να επηρεάζεται αρνητικά η αναπαραγωγική τους επιτυχία και αρμοστικότητα.

Abstract

Fluctuating asymmetry, small nondirectional deviations from perfect symmetry, has been proposed as a useful indicator of environmental stress. The developmental instability of an organism may induce asymmetric characters. Hence, a high degree of developmental instability, morphologically manifested as fluctuating asymmetry, may indicate less fitness. According to that, less fit individuals are expected to have asymmetric leaves and this may have a negative impact in their photosynthetic yield. In this investigation, fluctuating asymmetry and two photosynthetic indices (PI_{total} , F_v/F_m) has been measured in a great number of leaves in 7 plant species. PI_{total} is an index which expresses the relative photosynthetic performance. It is calculated from the kinetics of fast chlorophyll *a* fluorescence rise curves according to the so-called «JIP-test». It is considered to be positively correlated to CO₂ assimilation rates, hence to productivity based on photosynthesis. F_v/F_m is a second photosynthetic index which indicates the maximum photosystem II (PSII) photochemical efficiency. Fluctuating asymmetry was positively correlated to both photosynthetic indices in two plant species (*Pistacia lentiscus*, *Olea europea*). These results do not support the initial hypothesis of this investigation. Contrary, the species *Ceratonia siliqua* shows a negative correlation between fluctuating asymmetry and the two photosynthetic indices. Furthermore, in four plant species (*Arbutus unedo*, *Cercis siliquastrum*, *Platanus orientalis*, *Populus alba*), fluctuating asymmetry and photosynthetic performance were not correlated. It happened that the two species deviating from the initial hypothesis (*P. lentiscus* and *O. europea*) display the maximum mean fluctuating asymmetry values among all species included in this investigation.

In conclusion, it seems that in some plants whose leaves have experienced high stress as young are more photosynthetically potent as mature. Moreover, these results suggest that the relation between fluctuating

asymmetry and photosynthesis is species-specific. Finally, the results show that fluctuating asymmetry may not be a reliable index of developmental instability and stress exposure in plants.

Leaf anthocyanins are believed to afford protection against photoinhibition, yet the dependence of protection on actual anthocyanin concentrations has not been investigated. To that aim, non-invasive optical methods (spectral reflectance and chlorophyll fluorescence) were used to assess levels of anthocyanins and chlorophylls as well as photosystem II (PSII) photochemical efficiency in hundreds of leaves from the mastic tree (*Pistacia lentiscus*). This species displays a continuum of leaf tints during winter from fully green to fully red under field conditions. Contrary to expectations based on the photoprotective hypothesis, the strength of leaf redness was positively correlated to the extent of mid-winter chronic photoinhibition and negatively correlated to leaf chlorophyll contents. Hence, a photoprotective role for anthocyanins is not substantiated. Instead, we argue that winter leaf redness may be used reliably, quickly and non-invasively to locate vulnerable individuals in the field.

Given that winter-red leaf phenotypes in the mastic tree are more vulnerable to chronic photoinhibition during the cold season, we asked whether corresponding limitations in leaf gas exchange and carboxylation reactions could also be manifested. During the cold («red») season, net CO₂ assimilation rates (A) and stomatal conductances (g_s) in the red phenotype were considerably lower than the green phenotype, while leaf internal CO₂ concentration (C_i) was higher. The differences were abolished in the «green» period of the year, the dry summer included. Analysis of A versus C_i curves indicated that CO₂ assimilation during winter in the red phenotype was limited by Rubisco content and/or activity rather than stomatal conductance. Concomitant to that, leaf nitrogen levels in the red phenotype were considerably lower during the red-leaf period. Hence, we suggest that the inherently low leaf nitrogen levels are linked to the low net photosynthetic rates of the red plants through a decrease in Rubisco content. Accordingly, the

reduced capacity of the carboxylation reactions to act as photosynthetic electron sinks may explain the corresponding loss of PSII photon trapping efficiency, which cannot be fully alleviated by the screening effect of the accumulated anthocyanins.

In a next step we examined whether leaf nitrogen level affects photosynthetic light reactions. Although it is amply documented that CO₂ assimilation rates are positively correlated to leaf nitrogen, corresponding studies on a link between this nutrient and photosynthetic light reactions are scarce, especially under natural field conditions. In this final investigation with mastic tree, we exploited natural variation in nitrogen content of mature leaves of *P. lentiscus* in conjunction with fast chlorophyll a fluorescence rise (the OJIP curves) analysed according to the so-called «JIP-test», as this was recently modified to allow also for the assessment of events in or around photosystem I (PSI). The results depended on the sampling season, with low nitrogen leaves displaying lower efficiencies for electron flow from intermediate carriers to final PSI acceptors and lower relative pool sizes of these acceptors, both during the autumn and winter. However, parameters related to the PSII activity (i.e. quantum yields for photon trapping and electron flow along PSII, efficiency of a trapped exciton to move an electron from Q_A⁻ to intermediate carriers) were limited by low nitrogen only during the winter period. As a result, parameters like the quantum yield of total electron flow along both photosystems as well as the total photosynthetic performance index (PI_{total}) were positively correlated to leaf nitrogen independently of season. We conclude that nitrogen deficiency under field conditions preferentially affects PSI activity while the effects on PSII are evident only during the stressful period of the year.

In the last part of this dissertation we asked whether the leaf anthocyanic trait confers long term benefits to the plant and to that aim parameters directly related to fitness, i.e. reproductive effort and success as well as seed germinability were registered in winter-red and green phenotypes of *Cistus creticus* growing in the field under apparently similar

conditions. The results indicated that both phenotypes displayed similar flower numbers, pollination success and seed yield, mass and germinability.

As judged by the similar final reproductive output, vulnerability to the winter stress does not render the red phenotype less fit, nor anthocyanin accumulation render it more fit. Although an apparent compensating function for anthocyanins may be inferred, it can not be linked to a protection against photoinhibition of photosynthesis. Moreover, the photosynthetic inferiority of the red phenotype although linked to slightly reduced leaf number, (results from other members of our laboratory) it was not limiting for reproductive effort and success.

Regardless of function, winter leaf redness may indicate photosynthetically weak, yet not necessarily less fit individuals in *C. creticus*.

1. Εισαγωγή

1.1 Μορφολογική ασυμμετρία φύλλων

«Συμμετρία είναι η σταθερότητα έναντι της αλλαγής, δηλαδή κάτι παραμένει το ίδιο παρόλο που έχει την ενδογενή δυνατότητα να αλλάξει», αναφέρει ο Schroeder (1991). Ακόμη και υπό βέλτιστες συνθήκες να αναπτύσσεται ένα φυτό μια μικρή απόκλιση από την πλήρη συμμετρία θα παρατηρείται, λόγω του ότι οι ιδανικές συνθήκες προβλέπονται στη θεωρία αλλά δύσκολα, αν όχι και ποτέ, επιτυγχάνονται στην πράξη.

Οι δύο πλευρές ενός φυτικού οργάνου (π.χ. φύλλο) είναι προϊόν του ίδιου γονότυπου. Έτσι ο βαθμός της ασυμμετρίας που θα παρουσιάζεται θα οφείλεται στην αδυναμία του φύλλου να αντισταθεί στην καταπόνηση που δέχεται και όχι σε εγγενή διαφοροποίηση των δύο πλευρών του. Αποτέλεσμα αυτής της αδυναμίας είναι η παρέκκλιση από το αρχικό αναπτυξιακό πλάνο (συμμετρία) και η δημιουργία ασύμμετρου φαινότυπου (Watson & Trornhill, 1994).

Υπάρχουν τουλάχιστον δύο λόγοι που καθιστούν τις μετρήσεις ασυμμετρίας στα φυτά χρήσιμες. Πρώτον, εάν η ασυμμετρία συσχετίζεται με την αρμοστικότητα τότε θα ήταν δυνατόν να καθοριστεί ο βαθμός της φυσιολογικής καταπόνησης που υφίσταται ένα φυτό χωρίς να χρειαστεί η εξέταση της συνήθως χρονοβόρας αναπαραγωγικής λειτουργίας. Αυτό σε πληθυσμιακό επίπεδο φυτών αλλά και σε μετέπειτα επίπεδο οικοσυστήματος, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο πρόβλεψης επιπτώσεων της περιβαλλοντικής καταπόνησης χωρίς να είναι απαραίτητη η διά βίου παρακολούθησή του. Δεύτερον, η ίδια η ασυμμετρία μπορεί να είναι ένας σημαντικός οικολογικός χαρακτήρας-δείκτης που υπόκειται στους νόμους της φυσικής επιλογής (Roy & Stanton, 1999).

Τα φυτά αναπτύσσονται δημιουργώντας νέους ιστούς σε δομές που αναπτύχθηκαν νωρίτερα. Αυτό δίνει τη δυνατότητα στον ερευνητή να έχει μπροστά του όλη την αναπτυξιακή ιστορία του κάθε φυτικού ατόμου και με

προσεκτική μελέτη συγκεκριμένων χαρακτήρων να μπορεί να αποκρυπτογραφήσει πληροφορίες σχετικές με την ποιότητα του περιβάλλοντος την οποία βίωσε κατά την ανάπτυξή του ο εκάστοτε φυτικός οργανισμός (Freeman *et al.*, 1993).

Φυσικά, οι φυτικοί οργανισμοί εξελικτικά έχουν αναπτύξει την ικανότητα να προβάλλουν αντίσταση έναντι των διαφόρων γενετικών και περιβαλλοντικών διαταραχών που δέχονται κατά την ανάπτυξή τους με αποτέλεσμα να εμφανίζουν ένα συγκεκριμένο φαινότυπο. Η ικανότητα αυτή ονομάζεται αναπτυξιακή ομοιόσταση και εκφράζεται μέσα από δύο κύριες διαδικασίες, την κληρονομικότητα και την αναπτυξιακή σταθερότητα. Η κληρονομικότητα ουσιαστικά αφορά την ικανότητα ενός γονότυπου να εκφράζει τον ίδιο φαινότυπο ακόμη και όταν αλλάζουν οι περιβαλλοντικές συνθήκες, ενώ η αναπτυξιακή σταθερότητα περιγράφει το πως ένας χαρακτήρας εμφανίζεται αναλλοίωτος στο χρόνο όταν ο οργανισμός εκτίθεται σε παρόμοιες περιβαλλοντικές συνθήκες στη διάρκεια του χρόνου.

Με επισκόπηση της μέχρι σήμερα βιβλιογραφίας με επίκεντρο έρευνας την αναπτυξιακή ομοιόσταση, γίνεται αντιληπτή η ποσοτική ανισοκατανομή μεταξύ εργασιών που έγιναν σε ζώα σε σχέση με αντίστοιχες που καταπιάνονται με φυτά. Οι εργασίες εξέτασης της αναπτυξιακής αστάθειας που έγιναν με πειραματόφυτα κατέχουν ποσοστό λιγότερο από 15% του συνολικού αριθμού εργασιών με παρόμοια θεματολογία. Έτσι γίνεται κατανοητό πως όσον αφορά αυτό το πεδίο έρευνας, η μερίδα του λέοντος ανήκει σε εργασίες που επικεντρώνονται σε ζώϊκους οργανισμούς (Fenster & Galloway, 2006). Το έλλειμμα αυτό που παρουσιάζεται στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με τη μελέτη της αναπτυξιακής ομοιόστασης σε φυτικούς οργανισμούς, αποτέλεσε ιδιαίτερη πρόκληση και τροφοδότησε με επιπλέον κίνητρο την προσπάθεια προσέγγισης αυτού του πεδίου έρευνας στην παρούσα διατριβή. Η μελέτη της αναπτυξιακής αστάθειας επιτεύχθηκε μέσω εξέτασης της ασυμμετρίας των φύλλων σε αρκετά φυτικά είδη.

1.1.1 Αναπτυξιακή σταθερότητα και αστάθεια

Η αναπτυξιακή σταθερότητα που επιδεικνύει ένας οργανισμός ουσιαστικά αντανakλάται από την ικανότητά του να παρουσιάζει ένα «ιδανικό» μορφολογικό πρότυπο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (Palmer, 1994). Εμφανίζεται ενισχυμένη όταν οι οργανισμοί αναπτύσσονται υπό βέλτιστες συνθήκες, ενώ φαίνεται να μειώνεται στην περίπτωση που κατά την ανάπτυξη επικρατούν συνθήκες αποκλίνουσες από τις ιδανικές (Freeman *et al.*, 1993).

Μπορεί λοιπόν να ειπωθεί πως στην αναπτυξιακή σταθερότητα συνεισφέρουν διαδικασίες που τείνουν να αντιστέκονται ή να φιλτράρουν την όποια διαταραχή δύναται να αλλάξει το ορθό-αρχικό αναπτυξιακό σχέδιο ενός οργανισμού. Η αναπτυξιακή σταθερότητα στην ουσία είναι η κατάσταση στην οποία ένας οργανισμός καταφέρνει να αυτορρυθμιστεί έναντι επιγενετικών διαταραχών που δέχεται, εμφανίζοντας τελικό φαινότυπο που ακολούθησε προγραμματισμένη αναπτυξιακή πορεία. Όταν ένας οργανισμός αποτυγχάνει να αντιμετωπίσει τέτοιου τύπου διαταραχές, τότε αυξάνεται η πιθανότητα να επιδείξει αναπτυξιακή αστάθεια. Οι διαταραχές αυτές μπορεί να είναι γενετικές, περιβαλλοντικές ή αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης του γονότυπου με το περιβάλλον.

Επομένως, αναπτυξιακή αστάθεια ή αναπτυξιακός «θόρυβος» είναι το σύνολο των διαδικασιών που τείνουν να διαταράζουν το ορθό αναπτυξιακό σχέδιο ενός χαρακτήρα, ενός οργανισμού ή ενός πληθυσμού.

Υπάρχει πλειάδα περιβαλλοντικών καταπονήσεων και γενετικών επιδράσεων που δύνανται να διαταράζουν την προγραμματισμένη φυσιολογική λειτουργία ενός οργανισμού και το αποτέλεσμα αυτής της διαταραχής να γίνει φαινοτυπικά ορατό. Το γεγονός αυτό, σε εξελικτικό επίπεδο, είναι ιδιαίτερης σημασίας αφού ένας οργανισμός που καταπονείται παρουσιάζει μικρότερη αρμοστικότητα. Όσο πιο έντονη είναι η καταπόνηση, τόσο πιο ισχυρή φαίνεται να είναι και η διαταραχή στη γενετική δομή ενός

οργανισμού (Parsons, 1992). Εντούτοις, για να είναι σε θέση η όποια καταπόνηση να επηρεάσει τη γενετική δομή και το εξελικτικό δυναμικό που φέρει ένας οργανισμός ή πληθυσμός, θα πρέπει να ικανοποιούνται δύο κύριες προϋποθέσεις. Πρώτον, η αναπτυξιακή αστάθεια (αποτέλεσμα καταπόνησης) και ο γονότυπος πρέπει να συσχετίζονται με κάποιο τρόπο και δεύτερον, οι όποιες αλλαγές παρατηρούνται λόγω της αναπτυξιακής αστάθειας πρέπει να συσχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με αλλαγές στην αρμοστικότητα ενός οργανισμού ή πληθυσμού (Markow, 1995).

Η επίδραση των διαφόρων γενετικών και των περιβαλλοντικών διαταραχών σε ένα φυσικό πληθυσμό είναι συνήθως ταυτόχρονη και πολύπλοκη. Έτσι, για να είμαστε σε θέση να κατανοήσουμε την αναπτυξιακή σταθερότητα θα πρέπει να αντιληφθούμε τις εμπλεκόμενες δυνάμεις του όλου συστήματος και πώς αυτές τροποποιούνται όταν επιδρούν διαταράξεις στο σύστημα (Freeman *et al.*, 1993). Η μελέτη της αναπτυξιακής σταθερότητας ή αστάθειας καθίσταται ιδιαίτερος γοητευτική αλλά συνάμα δύσκολη.

1.1.2 Διαφορές στη μελέτη της αναπτυξιακής σταθερότητας-συμμετρίας μεταξύ φυτών και ζώων

Όπως προαναφέρθηκε, η μερίδα του λέοντος όσον αφορά τις εργασίες με επίκεντρο την αναπτυξιακή σταθερότητα και συμμετρία ανήκει σε έρευνες που έγιναν σε ζωικούς οργανισμούς παρά σε φυτικούς. Οι Freeman *et al.* (1993), αναφέρουν χαρακτηριστικά πως από το σύνολο των εκατό δημοσιευμένων εργασιών που καταπιάνονται με την αναπτυξιακή σταθερότητα, αυτές που αναφέρονται σε φυτά είναι λιγότερες από δώδεκα. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα στις περισσότερες εργασίες να εξετάζεται η αμφίπλευρη συμμετρία. Στα φυτά όμως, εκτός της αμφίπλευρης συμμετρίας σημειώνεται και η ακτινωτή συμμετρία σε όργανα όπως τα φύλλα, τα άνθη, οι ανθήρες και οι καρποί. Οπότε, σε αυτές τις περιπτώσεις η ακτινωτή ασυμμετρία θα πρέπει να θεωρείται ανάλογη της αμφίπλευρης.

Μια σημαντική διαφορά μεταξύ φυτών και ζώων είναι ότι τα πρώτα δεν έχουν τη δυνατότητα να κινούνται. Αυτό μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό μεθοδολογικό μειονέκτημα στις εργασίες που έχουν ως αντικείμενο την αναπτυξιακή αστάθεια στα φυτά. Λόγω της ακινησίας το κάθε φυτικό άτομο αναπτύσσεται σε συγκεκριμένη θέση κάτω από μοναδικές συνθήκες μικροκλίματος. Κατά αυτόν τον τρόπο προκύπτει διαφοροποίηση των φυτικών ατόμων μεταξύ τους λόγω της θέσης τους, με επακόλουθο να επηρεάζεται η εκτίμηση της αναπτυξιακής αστάθειας (Freeman *et al.*, 1993).

Η ανάπτυξη των ζωικών οργανισμών σε σχέση με αυτήν των φυτικών διαφέρει. Στα ζώα η ανάπτυξη περιλαμβάνει την αύξηση, τη διαφοροποίηση και τη μορφογένεση. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός διαφορετικών κυτταρικών ομάδων με συγκεκριμένες φυσιολογικές λειτουργίες, οι οποίες οργανώνονται σε διαφορετικούς ιστούς. Οι ιστοί με τη σειρά τους αποτελούν τους δομικούς λίθους του κάθε ζωικού οργανισμού. Η μορφογένεση θα καθορίσει το σχήμα καθώς και τη σωστή κατανομή των ιστών, η οποία επιτυγχάνεται πολλές φορές μέσω μετανάστευσης κυττάρων κατά τα πρώιμα εμβρυϊκά αναπτυξιακά στάδια (Freeman *et al.*, 1993). Στην περίπτωση όμως που διαταραχθεί η αναπτυξιακή σταθερότητα κατά τη διαδικασία της μετανάστευσης των μορφογενετικά διαφορετικών κυτταρικών ομάδων, ελλοχεύει ο κίνδυνος να επέλθει σημαντική φαινοτυπική απόκλιση στον οργανισμό που σχηματίζεται. Εν αντιθέσει, τα φυτά δεν αντιμετωπίζουν αυτόν τον κίνδυνο μιας και δεν παρατηρείται μετανάστευση κυττάρων.

Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει η δομή των φυτών αφού τμήματα του ίδιου ατόμου μπορούν να αποτελέσουν διακριτές αυτόνομες υπομονάδες. Έτσι, μπορούν εύκολα να κλωνοποιηθούν και η όποια μετέπειτα μελέτη ακολουθήσει να συμπεριλάβει ακριβώς πανομοιότυπα γενετικά στελέχη αφαιρώντας με αυτόν τον τρόπο τον γενετικό «θόρυβο» που ενδέχεται να επηρεάσει τα αποτελέσματα της έρευνας (Freeman *et al.*, 1993). Βέβαια στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται κλώνοι ενός οργανισμού για την εξέταση της αναπτυξιακής σταθερότητας, τα όποια αποτελέσματα προκύψουν θα

αφορούν τον συγκεκριμένο μόνο κλώνο που εξετάστηκε καθιστώντας έτσι δύσκολα και ριψοκίνδυνα τα γενικευμένα συμπεράσματα.

1.2 Είδη μορφολογικής ασυμμετρίας

Σαν γενικός κανόνας μπορεί να λεχθεί πως τα σώματα των φυτών είναι μάλλον ασύμμετρα. Ωστόσο, τα επί μέρους όργανα (π.χ. φύλλα) είναι κατά κανόνα συμμετρικά. Η παρέκκλιση από τον κανόνα, δηλαδή η δημιουργία ασύμμετρων φύλλων μπορεί να χαρακτηριστεί ως:

- α) κατευθυνόμενη ασυμμετρία (directional asymmetry)
- β) αντισυμμετρία (antisymmetry) και
- γ) διακυμαινόμενη ή τυχαία ασυμμετρία (fluctuating asymmetry)

1.2.1 Κατευθυνόμενη ασυμμετρία

Η κατευθυνόμενη ασυμμετρία είναι ο τύπος της ασυμμετρίας στον οποίο υπερέχει μονίμως η δεξιά ή η αριστερή πλευρά (Palmer, 1994). Έχει γενετικά αίτια και ίσως, προσαρμοστική αξία. Απαντάται συνήθως στους ζωικούς οργανισμούς (π.χ. καρδιά θηλαστικών) και σπανιότερα σε φυτικούς (Freeman *et al.*, 1993).

Στις εργασίες όπου εξετάζεται η αναπτυξιακή αστάθεια κρίνεται απαραίτητο να εξετάζεται πρωτίστως εάν παρουσιάζεται ή όχι κατευθυνόμενη ασυμμετρία. Αυτό κρίνεται αναγκαίο αφού, η ενδεχόμενη παρουσία κατευθυνόμενης ασυμμετρίας δύναται να επηρεάσει τις τιμές των εκάστοτε δεικτών που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των άλλων τύπων ασυμμετρίας με επακόλουθο την εξαγωγή αναξιόπιστων αποτελεσμάτων. Επίσης, η παρουσία κατευθυνόμενης ασυμμετρίας υποδηλώνει ότι, η όποια παρατηρούμενη διαφορά μεταξύ των δύο πλευρών ενός χαρακτήρα οφείλεται

πιθανότητα σε γενετικούς λόγους και όχι στην επίδραση του αναπτυξιακού «θορύβου» (Palmer, 1994).

1.2.2 Αντισυμμετρία

Όταν συστηματικά υπερέχει η μια πλευρά ενός χαρακτήρα σε κάποια άτομα ενώ σε άλλα η αντίθετη, τότε η ασυμμετρία αυτή χαρακτηρίζεται ως αντισυμμετρία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η δαγκάνα στα καβούρια, όπου σε κάποια άτομα εμφανίζεται μεγαλύτερη η δεξιά ενώ σε άλλα η αριστερή (Palmer, 1994; Markow, 1995).

Οι Palmer και Strobeck (1986; 1992) υποστηρίζουν πως η κατευθυνόμενη ασυμμετρία και η αντισυμμετρία, σε αντίθεση με την διακυμαινόμενη ασυμμετρία δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες περιβαλλοντικής καταπόνησης αφού η εμφάνισή τους φαίνεται να έχει γενετικό υπόβαθρο. Η αντισυμμετρία, όπως και η κατευθυνόμενη ασυμμετρία δεν απασχόλησαν την παρούσα διατριβή και για αυτό το λόγο κρίνεται σκόπιμο να μην αναλυθούν σε βάθος.

Αντιθέτως, στην παρούσα διδακτορική διατριβή εξετάστηκε η διακυμαινόμενη ασυμμετρία και η συσχέτισή της με την αρμοστικότητα διαφόρων φυτικών ειδών. Όλα τα είδη που ελέγχθησαν αναπτύσσονταν υπό ρεαλιστικές συνθήκες πεδίου με αποτέλεσμα να δέχονται σειρά περιβαλλοντικών καταπονήσεων. Η αναλυτική περιγραφή αυτού του τύπου ασυμμετρίας ακολουθεί αμέσως παρακάτω.

1.2.3 Διακυμαινόμενη ή Τυχαία ασυμμετρία

Η διακυμαινόμενη ή τυχαία ασυμμετρία είναι ο τύπος της ασυμμετρίας στον οποίο παρατηρείται διαφορά του μεγέθους των δύο πλευρών ενός οργάνου, χωρίς όμως να υπερέχει μόνιμα η μία πλευρά έναντι της άλλης και συνάμα η συχνότητα της διαφοράς των δύο πλευρών εμφανίζει κανονικό

πρότυπο κατανομής (Palmer, 1994). Σχηματικά αυτός ο τύπος ασυμμετρίας αλλά και οι δύο προαναφερθέντες παριστάνονται στο Σχήμα 1.1.

Σχήμα 1.1. Συχνότητα πλήθους μετρήσεων (N) στους 3 τύπους ασυμμετρίας: Α) διακυμαινόμενη, Β) κατευθυνόμενη και Γ) αντισυμμετρία, όπου R_i και L_i η δεξιά και η αριστερή πλευρά του χαρακτήρα που μετράται, αντίστοιχα (Palmer & Strobeck, 1992).

Η μελέτη της αναπτυξιακής αστάθειας μέσω εξέτασης της διακυμαινόμενης ασυμμετρίας αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο στα χέρια των μελετητών της λειτουργικής βιολογίας αλλά και πολλών άλλων κλάδων των επιστημών ζωής όπως η ιατρική, η γενετική, η αναπτυξιακή βιολογία και η οικολογία της συμπεριφοράς (Watson & Trornhill, 1994; Markow, 1995). Κατά τη μελέτη της διακυμαινόμενης ασυμμετρίας εξετάζεται η εξής βασική υπόθεση: η εξωγενής καταπόνηση διαταράσσει τη φυσιολογία ενός οργανισμού με αποτέλεσμα να σημειώνεται αλλαγή στο αναπτυξιακό του πρόγραμμα. Έτσι, ο εντοπισμός αυτής της φυσιολογικής διαταραχής υποδεικνύει την καταπονητική κατάσταση στην οποία βρίσκεται ο προς μελέτη οργανισμός (Freeman *et al.*, 1993). Δηλαδή, η διακυμαινόμενη ασυμμετρία υποδηλώνει την αδυναμία του γονότυπου να εφαρμόσει το αναπτυξιακό του πρόγραμμα και να δομηθεί συμμετρικός φαινότυπος (Palmer & Strobeck, 1986). Παρόλα αυτά όμως, δεν είναι αρκετά γνωστό το ακριβές κρίσιμο χρονικό σημείο κατά το οποίο μια εξωγενής καταπόνηση που

ασκείται είναι ικανή να προκαλέσει ανιχνεύσιμες αλλαγές στο αναπτυξιακό πρόγραμμα του εκάστοτε προς μελέτη οργανισμού (Markow, 1995). Η ένταση, η διάρκεια αλλά και ο συνδυασμός των όποιων καταπονήσεων καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τη φαινοτυπική εικόνα ενός οργανισμού.

Η διακυμαινόμενη ασυμμετρία στην ουσία είναι ένας δείκτης που εκφράζει το αποτέλεσμα του ανταγωνισμού μεταξύ δύο διεργασιών: της αναπτυξιακής σταθερότητας και της αναπτυξιακής αστάθειας (ή αλλιώς, αναπτυξιακός «θόρυβος»). Μπορεί να αυξηθεί με την ενίσχυση του αναπτυξιακού θορύβου ή με τη μείωση της αναπτυξιακής σταθερότητας. Η τελική της τιμή θα καθοριστεί από τη συνδυασμένη ταυτόχρονη δράση των δύο πιο πάνω διεργασιών (Palmer, 1994).

Απαραίτητο πρώτο βήμα σε μια εργασία, πριν δοθεί η τελική τιμή της τυχαίας ασυμμετρίας, είναι να υπολογιστεί το σφάλμα των μετρήσεων και να διασφαλιστεί πως δεν θα συνυπολογίζεται στην τιμή της ασυμμετρίας. Κατά δεύτερον, θα πρέπει να εξακριβωθεί ο τύπος της ασυμμετρίας που μετριέται, δηλαδή το κατά πόσο πρόκειται για διακυμαινόμενη και όχι κατευθυνόμενη ασυμμετρία ή αντισυμμετρία (Rettig *et al.*, 1997).

Σήμερα έχει αποδειχθεί ότι μια ποικιλία από περιβαλλοντικούς καταπονητικούς παράγοντες αυξάνει τη διακυμαινόμενη ασυμμετρία των φύλλων στα φυτά (Freeman *et al.*, 2004; Hagen *et al.*, 2008). Βέβαια, ο υψηλός βαθμός διακυμαινόμενης ασυμμετρίας που μπορεί να παρατηρηθεί σε ένα φυτό, δεν υποδεικνύει κατά ανάγκη κάποια καταπόνηση στο φυτό, καθώς μπορεί να είναι αποτέλεσμα της υψηλής ταχύτητας ανάπτυξής του (Martel *et al.*, 1999; Lempa *et al.*, 2000).

Η ρύπανση, ως παράγοντας καταπόνησης των φυτών, εξετάστηκε σε ικανοποιητικό βαθμό σε σχέση με τον δείκτη διακυμαινόμενης ασυμμετρίας των φύλλων. Η εξέταση αυτή ανέδειξε σειρά από αντικρουόμενα αποτελέσματα. Οι Ambio-Rappe *et al.* (2008), εξέτασαν την επίδραση της ρύπανσης του νερού από βαρέα μέταλλα (κάδμιο, μόλυβδος και ψευδάργυρος) σε λιμνόβια φυτικά είδη. Όπως απεδείχθη, ο δείκτης τυχαίας

ασυμμετρίας των φύλλων δεν συσχετίστηκε με τα επίπεδα ρύπων του νερού. Το γεγονός ότι τα φυτά των διάφορων λιμνών που εξετάστηκαν έδειξαν ετερογένεια ως προς τις τιμές της ασυμμετρίας των φύλλων τους, πιθανόν υποδεικνύει την επίδραση και άλλων παραγόντων στη διαμόρφωση του βαθμού ασυμμετρίας. Η πιθανή εξήγηση που δόθηκε από τους ερευνητές για τα παρατηρούμενα αποτελέσματα ήταν πως ταυτόχρονα με τα αυξημένα επίπεδα βαρέων μετάλλων παρατηρήθηκαν και αυξημένα επίπεδα σε θρεπτικά συστατικά. Επιπρόσθετα, πιθανόν τα υδρόβια αυτά φυτά να προσαρμόστηκαν σε συνθήκες με αυξημένη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων, με αποτέλεσμα να επηρεαστεί η μετρούμενη τιμή διακυμαινόμενης ασυμμετρίας στα φύλλα τους. Οι Tracy *et al.* (1995), βρήκαν παρόμοια αποτελέσματα. Οι ερευνητές αιτιολόγησαν τα αποτελέσματα αυτά λέγοντας ότι η έκθεση του πειραματόφυτου στα βαρέα μέταλλα ελαχιστοποιείται επειδή δεν φέρει ριζικό σύστημα. Επίσης, στο είδος *Arabidopsis thaliana* βρέθηκε χαμηλός βαθμός ασυμμετρίας στις τρίχες των φύλλων του υπό καταπονητικές συνθήκες έκθεσης στο ρυπογόνο κάδμιο, αποτέλεσμα που πιθανόν να οφείλεται στην ενεργοποίηση ενζύμων που προστατεύουν την ανάπτυξη του φυτού από τυχόν βλάβες και παρεκκλίσεις από το αρχικό αναπτυξιακό του πρόγραμμα (Tan-Kristanto *et al.*, 2003). Σε μια άλλη περίπτωση, εξετάστηκε η ρύπανση από τα προϊόντα της διήθησης των σκουπιδιών, αλλά ούτε και σε αυτήν την περίπτωση συσχετίστηκε η ρύπανση με τη διακυμαινόμενη ασυμμετρία των φύλλων (Dimitriou *et al.*, 2006). Τέλος, σε μερικές περιπτώσεις όπου εξετάστηκε η διακυμαινόμενη ασυμμετρία των φύλλων σε σχέση με ατμοσφαιρικούς ρύπους, δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση (Kozlov *et al.*, 2009; Wuytack *et al.*, 2011).

Εν αντιθέσει, σε άλλα φυτικά γένη (*Acer*, *Aegopodium*, *Betula*, *Convolvulus*, *Epilobium*, *Matricaria*, *Robinia*, *Sorbus*) στα οποία εξετάστηκε η πιο πάνω σχέση, βρέθηκε πως η ρύπανση αυξάνει τη διακυμαινόμενη ασυμμετρία των φύλλων (Freeman *et al.*, 1993; Kozlov *et al.*, 1996; Møller, 1998). Επίσης, οι Kozlov και Niemelä (1999) εξέτασαν τη σχέση διακυμαινόμενης ασυμμετρίας

και ρύπανσης από χυτήριο (κυρίως ρύποι SO₂), με τα αποτελέσματα να αποκαλύπτουν ότι όσο πιο κοντά στο χυτήριο βρίσκονταν τα άτομα του *Pinus sylvestris*, τόσο πιο αυξημένη ήταν η ασυμμετρία στα βελονοειδή φύλλα τους. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και σε κατοπινή εξέταση (Kozlov *et al.*, 2002). Η διακυμαινόμενη ασυμμετρία των βελονοειδών φύλλων του πεύκου συσχετίστηκε θετικά με τα επίπεδα ρύπανσης (SO₂, όξινη βροχή και βαρέα μέταλλα) αποδεικνύοντας κατά αυτόν τον τρόπο πως η διακυμαινόμενη ασυμμετρία των φύλλων του *Pinus sylvestris* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας ευαίσθητος δείκτης για την καταπόνηση λόγω ρύπανσης που δέχεται το κάθε φυτικό άτομο, ακόμη και στην περίπτωση εκείνη που δεν υπάρχουν άλλα ορατά συμπτώματα της καταπόνησης.

Ο Parsons (1990) εκφράζει τη θέση πως η ασυμμετρία αυξάνεται σε ενδιαιτήματα που είναι σε οικολογικό επίπεδο λιγότερο «φιλόξενα» για τα είδη που διαβιούν σε αυτά. Επίσης, οι Velickovic και Perisic (2006) προχώρησαν στην εξέταση της ποιότητας του ενδιαιτήματος που φύονται άτομα του είδους *Plantago major* L. και αναφέρουν πως ο δείκτης της διακυμαινόμενης ασυμμετρίας των φύλλων μπορεί να αποκαλύψει την ποιότητα του ενδιαιτήματος στο οποίο αναπτύσσονται τα φυτά.

Η διακυμαινόμενη ασυμμετρία των φύλλων χρησιμοποιήθηκε και ως ένας δείκτης της έντασης καταπόνησης στην οποία υπόκεινται μερικά φυτικά είδη λόγω της φυτοφαγίας από έντομα. Προς αυτήν την κατεύθυνση έγιναν αρκετές εργασίες, άλλες υπό συνθήκες πεδίου (Lempa *et al.*, 2000; Bañuelos *et al.*, 2004; Cornelissen & Stiling 2005, 2011) και άλλες υπό εργαστηριακές συνθήκες όπου προσομοίωναν την προσβολή από φυτοφάγα έντομα μέσω του κλαδέματος των φύλλων (Puerta-Piñero *et al.*, 2008).

Οι Lempa *et al.* (2000), έδειξαν ότι το έντομο *Epirrita autumnata* όταν προσβάλλει ασύμμετρα φύλλα ατόμων του γένους *Betula*, παρουσιάζει μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης του πληθυσμού του σε σχέση με τον αντίστοιχο που εμφανίζει όταν προσβάλλει πιο συμμετρικά φύλλα. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασαν και οι Cornelissen και Stiling (2005), όπου φύλλα

ατόμων *Quercus* τα οποία είχαν χαμηλό βαθμό τυχαίας ασυμμετρίας προσβάλλονταν από φυτοφάγα μυρμήγκια σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τα πιο ασύμμετρα. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν ότι η ασυμμετρία των φύλλων μπορεί να χρησιμοποιείται ως δείκτης της ποιότητας των φύλλων και ταυτόχρονα να αποκαλύπτει την προτίμηση συγκεκριμένων φυτοφάγων εντόμων σε αυτά (Bañuelos *et al.*, 2004; Cornelissen & Stiling 2011). Επιπρόσθετα, βρέθηκε πως τα ασύμμετρα φύλλα του γένους *Betula* έφεραν μειωμένα επίπεδα αμυντικών χημικών ουσιών ή/και αυξημένο περιεχόμενο σε άζωτο. Αυτό παρατηρήθηκε και σε άλλα φυτά όπως στο *Nicotiana tabacum* (Sakai & Shinamoto, 1965), στο *Quercus* (Cornelissen & Stiling, 2005) καθώς και στο πεύκο (Pérez-Contreras *et al.*, 2008).

Τα αντίθετα αποτελέσματα έδειξε εργασία των Zvereva *et al.* (1997), αφού άτομα του *Salix borealis* που έφεραν φύλλα με υψηλό βαθμό διακυμαινόμενης ασυμμετρίας, προσβάλλονταν λιγότερο από σκαθάρια σε σχέση με τα πιο συμμετρικά τους, με επακόλουθο η πυκνότητα αυτών των εντόμων στα δέντρα να εμφανίζεται μειωμένη.

Ένας άλλος παράγοντας καταπόνησης των φυτών, που εξετάστηκε ως προς τη σχέση του με τη διακυμαινόμενη ασυμμετρία των φύλλων είναι οι υψηλές συγκεντρώσεις αλατότητας στο έδαφος. Σε κάποιες περιπτώσεις βρέθηκε συσχέτιση (Roy & Stanton, 1999), ενώ σε άλλες όχι (Sinclair & Hoffmann, 2003). Ο συνδυασμός των καταπονήσεων υψηλής αλατότητας και έλλειψης νερού εξετάστηκε από τους Cornelissen και Stiling (2011). Η εργασία αυτή αποκάλυψε πως τα φυτά που αναπτύσσονται σε κοντινή απόσταση από τη θαλάσσια ακτή καταπονούνται περισσότερο από το συνδυασμό των δύο προαναφερθέντων παραγόντων σε σχέση με τα αντίστοιχα που βρίσκονται σε μεγαλύτερη απόσταση. Αυτή η εντονότερη καταπόνηση έχει ως αποτέλεσμα τα φυτικά άτομα που βρίσκονταν σε κοντινή απόσταση από τη θαλάσσια ακτή να εμφανίζουν υψηλότερη ασυμμετρία στα φύλλα τους. Επίσης, πειράματα τα οποία εξέτασαν την υδατική καταπόνηση σε σχέση με την ασυμμετρία των φύλλων είτε υπό ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες

(Llorens *et al.*, 2002; Fair & Breshears, 2005), είτε υπό φυσικές συνθήκες πεδίου (Hóðar, 2002), αποκάλυψαν τη δυσκολία στην εξέταση αυτού του εγχειρήματος. Αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω του ότι η επίδραση της υδατικής καταπόνησης στη διακυμαινόμενη ασυμμετρία φαίνεται να μην είναι συγκεκριμένη, αφού σε κάποια ποσοστά υγρασίας η τιμή ασυμμετρίας μειώνεται και σε κάποια άλλα αυξάνεται, υποδεικνύοντας κατά αυτόν τον τρόπο την ύπαρξη κατώφλιας τιμής. Εάν η εργασία γίνεται στο πεδίο, τότε γίνεται αντιληπτό πως το όλο σύστημα γίνεται ακόμη πιο περίπλοκο.

Τέλος, έχει αναφερθεί πως η τυχαία ασυμμετρία των φύλλων αυξάνεται με τον ενδοειδικό ανταγωνισμό (Rettig *et al.*, 1997), την άνοδο του υψομέτρου (Wilsey *et al.*, 1998), το ψύχος (Valkama & Kozlov, 2001) και υπό συνθήκες σκιάς (Puerta-Piñero *et al.*, 2008). Ακόμη, η διακυμαινόμενη ασυμμετρία έχει εξεταστεί σε σχέση και με σειρά άλλων παραγόντων όπως την έλλειψη ή την περίσσεια θρεπτικών συστατικών (Black-Samuelsson & Andersson, 2003; Møller, 1995), το περιεχόμενο των φύλλων σε φαινολικά (Lempa *et al.*, 2000; Baraza *et al.*, 2004), τη συγκέντρωση του ατμοσφαιρικού αέρα σε CO₂ (Cornelissen *et al.*, 2003) καθώς και ως προς τις διάφορες κλιματικές συνθήκες (Wilsey *et al.*, 1998; Valkama & Kozlov, 2001).

Φυσικά, δεν πρέπει να λησμονείται το γεγονός ότι η διακυμαινόμενη ασυμμετρία των φύλλων μπορεί να επηρεάζεται και από γενετικούς παράγοντες καταπόνησης όπως είναι ο βαθμός ετερογονιμοποίησης (Sherry & Lord, 1996) καθώς και ο διαειδικός υβριδισμός (Wilsey *et al.*, 1998; Hochwender & Fritz, 1999).

Όπως γίνεται αντιληπτό από τα πιο πάνω, αρκετές είναι οι εργασίες που μελετούν τη διακυμαινόμενη ασυμμετρία ως προς έναν καταπονητικό παράγοντα την κάθε φορά (Møller 1995; Cornelissen *et al.*, 2003; Hagen *et al.*, 2003) και πολύ λιγότερες αυτές που λαμβάνουν υπόψη τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων καταπονητικών παραγόντων (Leung *et al.*, 2000; Roy & Stanton, 1999). Συνοψίζοντας, σε αυτές τις εργασίες καταδεικνύεται πως ο κάθε χαρακτήρας σε ένα φυτικό άτομο μπορεί να συμπεριφέρεται

διαφορετικά ως προς την ασυμμετρία που θα παρουσιάσει ακόμη και όταν υπόκειται στις ίδιες καταπονήσεις. Έτσι, μπορεί να ειπωθεί πως γενικοί κανόνες που διέπουν τη σχέση μεταξύ διακυμαινόμενης ασυμμετρίας και περιβαλλοντικής καταπόνησης είναι δύσκολο να καθοριστούν. Για αυτόν τον λόγο τα πειράματα που γίνονται προς αυτήν την κατεύθυνση θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη την αλληλεπίδραση των διαφόρων παραγόντων.

Τα πιο πάνω καθιστούν τη διακυμαινόμενη ασυμμετρία χρήσιμο δείκτη στην παρακολούθηση της οικολογικής καταπόνησης (ecological stress) που λαμβάνει χώρα τόσο εντός ενός φυσικού πληθυσμού, όσο και μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών στη φύση. Παρόλα αυτά, διαφορές στην ηλικία αλλά και στο γενετικό υπόβαθρο κάθε ατόμου καθιστά δύσκολη τη χρήση του δείκτη και ρισκούν την εξαγωγή των όποιων συμπερασμάτων (Rettig *et al.*, 1997). Κατά αυτόν τον τρόπο, η σωστή εκτίμηση της τυχασίας ασυμμετρίας διευκολύνεται με το να συγκρίνονται φυτικά άτομα και φυτικά όργανα τα οποία έχουν την ίδια ηλικία και γενετική ταυτότητα, βρίσκονται στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο καθώς και όταν ελαχιστοποιείται και λαμβάνεται υπόψιν το σφάλμα μετρήσεων (Roy & Stanton, 1999). Οι Raz *et al.* (2011), εξετάζοντας δώδεκα φυτικά είδη κατέδειξαν τη δυσκολία του να χρησιμοποιηθεί η διακυμαινόμενη ασυμμετρία ως ένας ευαίσθητος δείκτης για την αποκάλυψη της καταπόνησης. Αντί αυτής πρότειναν άλλους μορφολογικούς και φυσιολογικούς δείκτες καταπόνησης ως καταλληλότερους, αφού φιλτράρουν και ελαχιστοποιούν την επίδραση καταπονήσεων μικρής έντασης που πολλές φορές οδηγούν σε εσφαλμένα συμπεράσματα. Εν τέλει, μπορεί να ειπωθεί πως ο δείκτης διακυμαινόμενης ασυμμετρίας μπορεί να βοηθήσει στις περιπτώσεις όπου η τιμή του είναι υψηλή και αφορά χαρακτήρες οργανισμών που επηρεάζουν άμεσα την αρμοστικότητά τους (Palmer, 1994) υποδεικνύοντας έτσι άτομα με αναπτυξιακή αστάθεια, ευαίσθησια στην καταπόνηση και εμμέσως με χαμηλότερη αρμοστικότητα.

Η μελέτη της διακυμαινόμενης ασυμμετρίας τόσο στα ζώα όσο και στα φυτά, ενώ φαντάζει να είναι εύκολη στην πρακτική που ακολουθείται για την εξέτασή της, εντούτοις εγκυμονεί κινδύνους που είναι σε θέση να παρασύρουν τον ερευνητή σε λανθασμένα και διαφορετικά την κάθε φορά συμπεράσματα. Οι κίνδυνοι αυτοί σχετίζονται με τη μεθοδολογική διαδικασία που ακολουθείται την κάθε φορά και άλλοι προκύπτουν λόγω της έλλειψης γνώσης και κατανόησης των διαφόρων αναπτυξιακών διαδικασιών που εμπλέκονται.

Όταν η τυχαία ασυμμετρία αυξάνεται υπό συνθήκες καταπόνησης στο πεδίο, θα μπορούσε κάποιος εύλογα να υποθέσει πως το ίδιο μπορεί να συμβεί και σε πειράματα προσομοίωσης των εκάστοτε καταπονήσεων στο εργαστήριο. Σε μερικά πειράματα που έγιναν αυτό επιβεβαιώθηκε, σε κάποια άλλα όμως όχι. Σε συνθήκες πεδίου δεν γίνεται να είναι επακριβώς γνωστοί όλοι οι καταπονητικοί παράγοντες που επιδρούν και με ποια ένταση και κυρίως δεν είναι γνωστό πώς επιδρά ο συνδυασμός όλων αυτών στον εκάστοτε προς μελέτη οργανισμό. Κατά αυτόν τον τρόπο εργαστηριακά πειράματα που στοχεύουν να επιβεβαιώσουν τη σχέση της διακυμαινόμενης ασυμμετρίας με κάποιο ή κάποιους καταπονητικούς παράγοντες αποκαλύπτουν πολλές φορές εντελώς διαφορετική εικόνα σε σχέση με αυτήν που εμφανίστηκε σε αντίστοιχα πειράματα πεδίου (Parsons, 1992; Freeman *et al.*, 1993; Roy & Stanton, 1999).

1.3 Συσσώρευση ανθοκυανινών

1.3.1 Γενικά περί ανθοκυανινών

Ο Marquart (1835) ήταν ο πρώτος που ονόμασε τις ερυθρές χρωστικές που εντοπίζονται στα φυτικά χυμοτόπια ως ανθοκυανίνες. Οι ανθοκυανίνες παρατηρούνται στα άνθη, στους καρπούς αλλά και σε άλλα φυτικά όργανα όπως είναι τα φύλλα, οι βλαστοί και οι ρίζες (Lee, 2002). Πρόκειται για φαινολικές ενώσεις της κατηγορίας των φλαβονοειδών. Είναι υδατοδιαλυτές και απορροφούν στο υπεριώδες και ορατό μέρος του ηλιακού ηλεκτρομαγνητικού φάσματος με τις περισσότερες να απορροφούν στο πράσινο (Harborne, 1976). Οι κόκκινες ανθοκυανίνες απορροφούν κυρίως στην πράσινη και σε μικρότερο βαθμό στην μπλε και κίτρινη περιοχή του φάσματος του φωτός ενώ δεν απορροφούν στην ερυθρή και κοντινή υπέρυθρη περιοχή. Τα φαινολικά μαζί με τα αλκαλοειδή και τα τερπενοειδή αποτελούν τις τρεις μεγάλες, χημικώς καθορισμένες, κατηγορίες των φυσικών ή δευτερογενών προϊόντων των φυτών.

Εργασίες χημικού προσδιορισμού των ανθοκυανινών που έγιναν μέχρι σήμερα κατέγραψαν τον εντυπωσιακό αριθμό των εξακοσίων περίπου διαφορετικών τύπων ανθοκυανινών που απαντώνται στη φύση. Η διαφορά στα φάσματα απορρόφησης των ανθοκυανινών οφείλεται πολλές φορές στην τιμή του pH του περιβάλλοντός τους, ενώ η απορρόφηση τους στην ορατή περιοχή καθορίζεται από τον αριθμό και τον προσανατολισμό των υδροξυλομάδων στο B δακτύλιο της βασικής φλαβονοειδούς δομής. Αυτός είναι ο λόγος που οι συγκεκριμένες χρωστικές χρησιμοποιούνται και ως δείκτες pH αφού αλλάζουν χρώμα από ερυθρό μέχρι μπλε σε διαφορετικές διαβαθμίσεις του όξινου pH, ενώ αποχρωματίζονται όταν οδηγούνται σε βασικό pH (Raghvendra *et al.*, 2011). Μερικές φορές η αλλαγή του pH οδηγεί και σε πλήρη αποχρωματισμό.

Όσον αφορά τη βασική τους δομή, οι ανθοκυανίνες αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται τρεις άνθρακες (σκελετός C₆-C₃-C₆), οι οποίοι σε συνέργεια με το οξυγόνο σχηματίζουν ένα ενδιάμεσο ετεροκυκλικό δακτύλιο. Οι πρόδρομες ουσίες των ανθοκυανινών είναι οι ανθοκυανιδίνες, από τις οποίες προκύπτουν με προσθήκη σακχάρου (γλυκοσυλίωση). Τα σάκχαρα στις ανθοκυανίνες ενώνονται με υδροξύλια στις θέσεις 3, 5 και 7 όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.1.

Εικόνα 1.1. Βασική δομή ανθοκυανίνης

Οι ανθοκυανίνες, όπως και μια σειρά από άλλα φλαβονοειδή και απλά φαινολικά, αποτελούν τελικά προϊόντα της βιοσυνθετικής οδού φαινυλοπροπανοειδών/φλαβονοειδών (Saito & Yamaski, 2002). Πρόδρομες ουσίες των ανθοκυανινών απαντώνται στο κυτταρόπλασμα. Εκεί γίνεται και η σύνθεση των ανθοκυανινών ενώ κατόπιν μεταφέρονται προς τα χυμοτόπια όπου και συσσωρεύονται (Hrazdina *et al.*, 1978). Στους χλωροπλάστες βρίσκονται μερικά φλαβονοειδή και απλά φαινολικά ενώ οι ανθοκυανίνες απουσιάζουν. Ωστόσο, οι Saunders και McClure (1976) αναφέρουν την παρουσία των ανθοκυανινών ακόμη και εντός των χλωροπλάστων.

Η παρουσία των ανθοκυανινών τροποποιεί σημαντικά τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά τη φωτεινή ενέργεια που φτάνει στους χλωροπλάστες (Ntefidou & Manetas, 1996). Το ποσοστό συνεισφοράς των ανθοκυανινών στην ελάττωση της φωτεινής ενέργειας που δεσμεύεται από τη χλωροφύλλη εξαρτάται από την ιστολογική κατανομή τους (Steyn *et al.*, 2002). Όπως αναμένεται για κάθε χρωστική, έτσι και οι ανθοκυανίνες συσσωρεύονται σε μονά ή πολλαπλά κυτταρικά στρώματα στην επιδερμίδα και στο μεσόφυλλο

(McClure, 1975) ενώ έχουν παρατηρηθεί ακόμη και σε τριχίδια (Ntefidou & Manetas, 1996).

Η παραγωγή και η κατανομή των ανθοκυανινών στους φυτικούς ιστούς και τα όργανα ελέγχεται γενετικά με συγκεκριμένη έκφραση ρυθμιστικών γονιδίων. Αυτά τα γονίδια εποπτεύουν την έκφραση δομικών γονιδίων που αποκρίνονται σε περιβαλλοντικά και αναπτυξιακά ερεθίσματα (Mol *et al.*, 1996). Η σύνθεση των ανθοκυανινών λαμβάνει χώρα σε κάθε κύτταρο με αυτόνομο τρόπο, με αποτέλεσμα η παρουσία τους να ελέγχεται ξεχωριστά από το κάθε κύτταρο (Nick *et al.*, 1993; Lancaster *et al.*, 1994). Αυτό το γεγονός επιτρέπει τη στοχευμένη και τοπική συσσώρευση ανθοκυανινών έτσι ώστε να μην επηρεάζονται οι οπτικές ιδιότητες γειτονικών κυττάρων ή ιστών.

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω αυτές οι χρωστικές παρατηρούνται σε διάφορους τύπους φυτικών ιστών και οργάνων. Όσον αφορά την παρουσία τους στα φύλλα διακρίνονται οι παρακάτω περιπτώσεις (Lee, 2002):

- α) Σε νεαρά και ταχέως αναπτυσσόμενα φύλλα.
- β) Σε γηράσκοντα φύλλα περιοχών εύκρατου κλίματος.
- γ) Στις κάτω επιφάνειες επιπλεόντων φύλλων σε διάφορα υδρόβια φυτά.
- δ) Σε φύλλα φυτών που εντοπίζονται στον υποόροφο δασών.
- ε) Σε φύλλα που υπόκεινται σε διάφορες περιβαλλοντικές καταπονήσεις.

Η κυανιδίνη είναι η πιο χαρακτηριστική και διαδεδομένη χρωστική στα φύλλα κατά τα διάφορα αναπτυξιακά στάδια, με μια σειρά άλλων ανθοκυανινών να απαντώνται σε μικρότερη συχνότητα (Gitelson *et al.*, 2001).

Το φύλλο αποτελεί ιδανικό φυτικό όργανο για τη μελέτη της φωτοσύνθεσης, της λειτουργίας που επιτελούν οι αυτότροφοι οργανισμοί για να εξασφαλίζεται η βιωσιμότητα της ζωής στον πλανήτη με τη μορφή που έχει σήμερα. Τα φύλλα συνήθως φέρουν πράσινο χρώμα λόγω της χλωροφύλλης που περιέχουν. Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, κάποια φυτικά είδη φέρουν ερυθρό χρώμα στα φύλλα τους λόγω του ότι εμπεριέχουν ανθοκυανίνες σε

τέτοιες ιστολογικές θέσεις και συγκεντρώσεις που καμουφλάρουν το πράσινο χρώμα των χλωροφυλλών.

Στις περισσότερες των περιπτώσεων αυτή η ερυθρότητα των φύλλων είναι παροδική και μόνο σε μερικές ο ανθοκυανικός χαρακτήρας είναι μόνιμος. Η παροδική ερυθρότητα μπορεί να οφείλεται σε αναπτυξιακούς ή περιβαλλοντικούς λόγους. Όσον αφορά τους αναπτυξιακούς λόγους, η ερυθρότητα εμφανίζεται σε σχέση με την ηλικιακή φάση όπως γίνεται στις περιπτώσεις νεαρών ή γηράσκοντων φύλλων. Η περίπτωση όπου περιβαλλοντικοί λόγοι προκαλούν συσσώρευση ανθοκυανινών αφορά συνήθως ώριμα φύλλα. Η ερυθρότητα αυτή εμφανίζεται ως αποτέλεσμα πληγής του φυτικού ιστού (Stone *et al.*, 2001), προσβολής από παθογόνους οργανισμούς (Hipskind *et al.*, 1996), έλλειψης θρεπτικών συστατικών (Hodges & Nozzolillo, 1996; Kumar & Sharma, 1999), έκθεσης σε UV-B ακτινοβολία (Mendez *et al.*, 1999) ή λόγω του συνδυασμού υψηλών εντάσεων φωτός με χαμηλές θερμοκρασίες (Pietrini *et al.*, 2002). Γενικά, μπορεί να υποστηριχθεί πως η επαγωγή των ανθοκυανινών παρατηρείται τις περισσότερες φορές υπό συνθήκες υψηλής φωτεινής ακτινοβολίας, ενώ τα επίπεδα αυτών των χρωστικών δεν εξαρτώνται μόνο από την ένταση του φωτός που δέχονται αλλά και από το είδος του ιστού που δέχεται αυτήν την περιβαλλοντική καταπόνηση (Mol *et al.*, 1996). Ενδογενή σήματα, το αναπτυξιακό στάδιο, άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες και το παρελθόν του οργανισμού όσον αφορά την έκθεσή του στο φως, τροποποιούν την επίδραση που έχει η φωτεινή ακτινοβολία στη σύνθεση των ανθοκυανινών (Mancinelli, 1983).

Η σύνθεση τόσο των ανθοκυανινών όσο και των φωτοσυστημάτων I (PSI) και II (PSII) ρυθμίζεται μέσω της ενεργοποίησης του φυτοχρώματος μετά από μεταφορά σημάτων σε συγκεκριμένα βιοσυνθετικά μονοπάτια (Bowler *et al.*, 1994). Εξωτερικά ερεθίσματα επηρεάζουν τις βιοσυνθετικές διεργασίες με αποτέλεσμα, εκτός από τη σύνθεση των πιο πάνω, να λαμβάνουν χώρα και φαινοτυπικές αλλαγές όπως για παράδειγμα αλλαγές του πάχους των φύλλων. Έτσι, γίνεται αντιληπτό πως η συσσώρευση ανθοκυανινών υπό

καταπονητικές συνθήκες έντονου ορατού φωτός αποτελεί ένα μόνο κομμάτι της όλης απόκρισης του φυτικού οργανισμού έναντι της καταπόνησης που δέχεται.

Λόγω του ότι οι ανθοκυανίνες απορροφούν ορατό φως, στερούν από τη φωτοσυνθετική μηχανή φωτεινή ενέργεια, γεγονός που πιθανόν περιορίζει τη φωτοσύνθεση. Παρόλο που εκ πρώτης όψεως αυτό φαίνεται να είναι μειονέκτημα στην περίπτωση ενός υγιούς φύλλου που ζει σε βέλτιστες συνθήκες, εντούτοις μπορεί να αποτελέσει πλεονέκτημα υπό καταπονητικές συνθήκες κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων αναπτυξιακών σταδίων του φύλλου (Kyparissis *et al.*, 2007). Στην ουσία, η συσσώρευση των ανθοκυανινών προϋποθέτει διπλό κόστος για το φύλλο. Δηλαδή, το κόστος δομικών λίθων που χρησιμοποιούνται για τη βιοσύνθεση αυτών των χρωστικών καθώς και όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, το φωτοσυνθετικό κόστος που προκύπτει λόγω του ανταγωνισμού μεταξύ ανθοκυανινών και χλωροφυλλών για τη δέσμευση φωτεινής ενέργειας. Το μεταβολικό κόστος της παροδικής παρουσίας των ανθοκυανινών πρέπει να είναι χαμηλότερο από το όφελος που αυτές προσδίδουν στο φυτικό οργανισμό. Αυτή είναι η εξελικτική βάση που τροφοδοτεί τη σκέψη της επιστημονικής κοινότητας να διερευνήσει και αν είναι δυνατόν να κατανοήσει τον πιθανό ρόλο ή ρόλους που έχουν οι ανθοκυανίνες.

1.3.2 Ρόλοι των ανθοκυανινών στα φύλλα

Δύο είναι οι δημοφιλέστεροι ρόλοι που αποδίδονται στις ανθοκυανίνες των φύλλων. Ο ένας αφορά την προστασία έναντι αβιοτικών παραγόντων και εξετάζεται με τρεις βασικές υποθέσεις, τη φωτοπροστασία, την ωσμωτική ρύθμιση και την αύξηση της θερμοκρασίας του ιστού. Μέχρι σήμερα, μόνο η υπόθεση που υποστηρίζει το φωτοπροστατευτικό ρόλο των ανθοκυανινών έχει εξεταστεί σε σημαντικό βαθμό. Ο άλλος ρόλος που τους αποδίδεται σχετίζεται με την εμπλοκή τους στη διαμόρφωση μιας σειράς

αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυτών και ζωικών οργανισμών. Αυτές μπορεί να είναι η διασπορά των σπερμάτων και αμυντικοί μηχανισμοί έναντι των θηρευτών.

Οι επικρατέστερες υποθέσεις για το ρόλο των ανθοκυανινών στα φύλλα φαίνονται σε τίτλους πιο κάτω και στη συνέχεια αναπτύσσεται ο κάθε ένας ξεχωριστά (Lee & Gould, 2002):

- α) Φωτοπροστασία
- β) Αντιοξειδωτική προστασία
- γ) Άμυνα έναντι φυτοφάγων εντόμων και παθογόνων
- δ) Προστασία έναντι UV-B ακτινοβολίας
- ε) Συμβολή στην ωσμωρρύθμιση - αντίσταση στην έλλειψη νερού
- στ) Θέρμανση του φύλλου

α) Φωτοπροστασία

Ο φωτοπροστατευτικός ρόλος των ανθοκυανινών είναι και ο πιο δημοφιλής μεταξύ των φυσιολόγων φυτών. Σύμφωνα με αυτόν το ρόλο που τους αποδίδεται, οι χρωστικές προστατεύουν τη φωτοσυνθετική μηχανή από την περίσσεια φωτός αφού λειτουργούν είτε ως αντηλιακά (Chalker-Scott, 1999) είτε ως εξουδετερωτές των επιβλαβών ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Έχει προταθεί σε νεαρά φύλλα (Lee *et al.*, 1987), σε καρπούς (Merzlyak & Chivkunova, 2000), σε φύλλα που υπόκεινται καταπόνηση ψύχους (Krol *et al.*, 1995; Close *et al.*, 2000) καθώς και σε φύλλα που αναπτύσσονται στον υποόροφο των τροπικών δασών και δέχονται τη στιγμιαία αλλά επικίνδυνη για τη φωτοσύνθεση επίδραση των ηλιοκληλίδων (Gould *et al.*, 2000).

Υπάρχει πληθώρα εργασιών στις οποίες γίνεται προσπάθεια σύγκρισης της φωτοχημικής ικανότητας των κόκκινων φύλλων, δηλαδή πλούσιων σε ανθοκυανίνες, με την αντίστοιχη των πράσινων. Αυτό γίνεται για να εξεταστεί το ενδεχόμενο οι ανθοκυανίνες να προσδίδουν στα φύλλα που τις εμπεριέχουν φωτοπροστατευτικό πλεονέκτημα έναντι των μη ανθοκυανικών-πράσινων φύλλων. Σε εργασίες όπου μετρήθηκε η μέγιστη φωτοσυνθετική

απόδοση φύλλων σε πράσινους και ερυθρούς φαινότυπους, βρέθηκαν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Κάποιες εμφανίζουν τους ερυθρούς φαινότυπους με μειωμένη τη μέγιστη φωτοσυνθετική ικανότητα του PSII σε σχέση με τους πράσινους (Burger & Edwards, 1996; Dodd *et al.*, 1998), άλλες το ακριβώς αντίθετο (Gould *et al.*, 1995), ενώ δεν απουσιάζουν και εργασίες όπου παρουσιάζουν τους δύο φαινότυπους με παρόμοια μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση (Pietrini *et al.*, 2002). Επιπλέον, τα φύλλα που φέρουν ανθοκυανίνες βρέθηκε πως έχουν αυξημένη (Gould *et al.*, 1995; Mendez *et al.*, 1999; Feild *et al.*, 2001) ή την ίδια (Dodd *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003) ικανότητα για αποφυγή της χρόνιας φωτοαναστολής της φωτοσύνθεσης σε σχέση με τα πράσινα.

Δεδομένου ότι οι ανθοκυανίνες απορροφούν εν μέρει και στην μπλε περιοχή του φάσματος πιθανόν να προστατεύουν τα φωτοσυστήματα σε συνθήκες περίσσειας φωτός, αφού σε αυτήν την περιοχή απορροφά κυρίως και η χλωροφύλλη β (Hughes & Smith, 2007). Ο φωτοπροστατευτικός ρόλος των ανθοκυανινών υποστηρίζεται πιο έντονα στην περίπτωση νεαρών φύλλων αφού η συσσώρευση ανθοκυανινών σε αυτά μπορεί κάποιες φορές να προηγείται της παραγωγής άλλων φωτοπροστατευτικών χρωστικών όπως είναι για παράδειγμα οι ξανθοφύλλες (Gamon & Surfus, 1999). Σε αντίθεση με τα ώριμα φύλλα, τα νεαρά δεν φέρουν προστατευτικούς αντιηλιακούς σχηματισμούς, όπως είναι για παράδειγμα τα κεριά, αφού ο φυτικός ιστός δεν έχει ολοκληρώσει ακόμη την ανάπτυξή του (Barker *et al.*, 1997). Οι Hoch *et al.* (2001), πρότειναν ότι οι ανθοκυανίνες έχουν φωτοπροστατευτικό ρόλο των ανθοκυανινών και στα γηράσκοντα φύλλα, μέσω ουσιαστικά της μείωσης της φωτοοξειδωτικής ζημιάς κατά την αποικοδόμηση των χλωροφυλλών. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασε και η εργασία των Feild *et al.* (2001).

Υπάρχουν όμως και πολλοί ερευνητές που εκφράζουν ενστάσεις σχετικά με το φωτοπροστατευτικό ρόλο των ανθοκυανινών στα φύλλα. Η κύρια διαφωνία πηγάζει από το γεγονός ότι οι ανθοκυανίνες απορροφούν κυρίως στην πράσινη και λιγότερο στην μπλε και κίτρινη περιοχή του φάσματος, ενώ

τις διαπερνά το ερυθρό και κοντινό υπέρυθρο φως. Κατά αυτόν τον τρόπο, στερούν από τις χλωροφύλλες το πράσινο φως. Μία χρωστική αποτελεί ιδανικό αντιηλιακό όταν απορροφά μήκη κύματος του φωτός στην περιοχή που απορροφά σε μέγιστο βαθμό η κύρια φωτοσυνθετική χρωστική, δηλαδή η χλωροφύλλη. Παρόλα αυτά, όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι ανθοκυανίνες απορροφούν κυρίως στην πράσινη περιοχή του φάσματος όπου οι χλωροφύλλες απορροφούν ελάχιστα (Manetas, 2006). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως οι ανθοκυανίνες δεν φέρουν τις ιδανικές οπτικές ιδιότητες για να λειτουργήσουν έναντι της φωτοαναστολής εκτός εάν το πράσινο φως καταστεί φωτοσυνθετικά επιβλαβές. Εντούτοις, μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι κάτι τέτοιο μπορεί να συμβεί (Manetas, 2006). Ακόμη ένα επιχείρημα ενάντια στο φωτοπροστατευτικό ρόλο των ανθοκυανινών μπορεί να αποτελέσει το γεγονός της παρουσίας αυτών των χρωστικών στα νεαρά φύλλα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα νεαρά φύλλα εμφανίζονται κατά την περίοδο του έτους όπου οι συνθήκες για ανάπτυξη είναι ευνοϊκές και ο κίνδυνος να υποστούν φωτοαναστολή ελάχιστος, άρα και η ανάγκη αυτών για φωτοπροστασία εμφανίζεται πιθανώς μειωμένη. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί και το γεγονός ότι η φωτοσυνθετική συσκευή των νεαρών φύλλων δεν είναι ακόμη έτοιμη και έτσι καθίσταται περισσότερο ευάλωτη.

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί πως η συσσώρευση ανθοκυανινών για φωτοπροστασία (Gould *et al.*, 2000) είναι μάλλον ένας δευτερεύων αμυντικός μηχανισμός που έχουν αναπτύξει εξελικτικά οι φυτικοί οργανισμοί. Υπάρχει πλήθος βασικών φωτοπροστατευτικών στρατηγικών που εξυπηρετούν την ανάγκη των φυτών για φωτοπροστασία. Σε αυτές περιλαμβάνονται η αποφυγή του έντονου φωτός, η καταστολή της δραστικότητας του απορροφούμενου φωτός μέσω μετατροπής του σε άλλη μορφή ενέργειας και η ανάπτυξη αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Όσον αφορά την πρώτη στρατηγική, οι φυτικοί οργανισμοί αναπτύσσουν δομικές και μορφολογικές παραλλαγές όπως για παράδειγμα διαφορετικούς προσανατολισμούς των φύλλων και συσσώρευση κεριών (Shepherd & Griffiths, 2006) ή ακόμη κατασκευάζοντας

τρίχες (Morales *et al.*, 2002) που αυξάνουν το ποσοστό του φωτός που ανακλάται από την επιφάνεια του φωτοσυνθετικού ιστού. Η δεύτερη στρατηγική φαίνεται να συνδέεται με τα καρωτενοειδή και ειδικότερα με τον κύκλο των ξανθοφυλλών (Müller *et al.*, 2001) ενώ στην τρίτη στρατηγική περιλαμβάνονται μια σειρά από ενζυματικούς και μη ενζυματικούς μηχανισμούς οι οποίοι εμπλέκονται άμεσα στην εξουδετέρωση των ROS (Reactive Oxygen Species) (Mittler, 2002).

β) Αντιοξειδωτική προστασία

Η περίσσεια ενέργειας που απορροφάται από ένα φωτοσυνθετικό ιστό και δεν μπορεί να αποσβεστεί με κάποιον αμυντικό προστατευτικό μηχανισμό, ενδέχεται να μεταφερθεί στο μοριακό οξυγόνο (O_2). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενεργών μορφών οξυγόνου όπως O_2^- , H_2O_2 , κ.λ.π. (Ort, 2001; Mittler, 2002) οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε καταστροφή των φυτικών κυττάρων. Οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) σε μεγάλες συγκεντρώσεις αντιδρούν με τις κυτταρικές πρωτεΐνες και τα λιπίδια οξειδώνοντάς τα, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλουν ένζυμα και προκαλούν βλάβη στο DNA και RNA (Mittler, 2002). Οι ανθοκυανίνες αντιδρούν με κάποιες από τις πιο πάνω ενεργές μορφές οξυγόνου επιτυγχάνοντας την εξουδετέρωσή τους. Επίσης, προστατεύουν αντιοξειδωτικά ένζυμα ενώ μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλα μόρια συμμετέχουν σε αντιοξειδωτικά βιοχημικά μονοπάτια. Αυτή τους η αντιοξειδωτική ιδιότητα *in vitro*, φαίνεται να είναι μάλιστα τέσσερις φορές πιο αποδοτική από την αντίστοιχη χημικών ενώσεων όπως η α -τοκοφερόλη και το ασκορβικό οξύ (Lee & Gould, 2002; Mittler, 2002).

Όπως αναφέρθηκε, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου όπως το O_2^- , ρίζες υδροξυλίου ($OH^\cdot$) και H_2O_2 μπορούν να εξουδετερωθούν από τις ανθοκυανίνες όπως έδειξαν *in vitro* πειράματα. Οι ROS αυτές δημιουργούνται κυρίως στον χλωροπλάστη. Έτσι, σε *in vivo* συνθήκες γεννιέται το ερώτημα κατά πόσο οι ανθοκυανίνες μπορούν να δράσουν αντιοξειδωτικά επί αυτών των ROS λόγω του ότι χωροταξικά βρίσκονται σε κάποια απόσταση (εντός

των χυμοτοπιών των κυττάρων του μεσοφύλλου ή των επιδερμικών κυττάρων) από το σημείο γένεσης αυτών των επιβλαβών ριζών οξυγόνου. Συγκεκριμένα, σε *in vivo* πειράματα οι Kytridis και Manetas (2006) έδειξαν πως οι ανθοκυανίνες ενδέχεται να δράσουν ως αντιοξειδωτικά σε δεύτερη φάση, στις περιπτώσεις όπου κάποιες από αυτές τις ROS ξεπεράσουν την πρώτη αμυντική-αντιοξειδωτική γραμμή προστασίας που φέρουν οι χλωροπλάστες. Ωστόσο, προϋπόθεση γι' αυτό είναι οι ανθοκυανίνες να βρίσκονται στα χυμοτόπια των κυττάρων του μεσοφύλλου, ενώ αν βρίσκονται στα χυμοτόπια των επιδερμικών κυττάρων δεν παρέχουν καμία αντιοξειδωτική προστασία.

Τέλος, έχει παρατηρηθεί πως στην περίπτωση τραυματισμού ερυθρών φύλλων και στην επακόλουθη δημιουργία αυξημένων επιπέδων ROS, επεμβαίνουν οι ανθοκυανίνες και τα εξουδετερώνουν, συνεισφέροντας με αυτόν τον τρόπο στην προστασία του τραυματισμένου φυτικού ιστού. Επίσης, σε πράσινα φύλλα έχει παρατηρηθεί συσσώρευση ανθοκυανινών στις περιοχές τραυματισμού από φυτοφάγα έντομα (Gould *et al.*, 2002).

γ) Άμυνα έναντι φυτοφάγων εντόμων και παθογόνων

Ο πλέον προφανής και ευρέως αποδεκτός ρόλος των ανθοκυανινών σε άνθη και καρπούς είναι αυτός που σχετίζεται με την επικονίαση και τη διασπορά των σπερμάτων. Στην περίπτωση των ερυθρών φύλλων όμως τα πράγματα φαίνεται να είναι πιο σύνθετα. Έχει παρατηρηθεί σε φυτικούς οργανισμούς η συσσώρευση ανθοκυανινών ως απόκριση στη φυτοφαγία (Borpp, 1959) και στη προσβολή από παθογόνα (Hipskind *et al.*, 1996) και μύκητες (Fang *et al.*, 1999). Οι ανθοκυανίνες απαντώνται στα νεαρά, στα ώριμα καθώς και στα γηράσκοντα φύλλα διαφόρων φυτών. Έτσι, για κάθε μια από αυτές τις περιπτώσεις, η παρουσία τους μπορεί να αιτιολογείται με διαφορετικό τρόπο την κάθε φορά.

Τα νεαρά πλούσια σε ανθοκυανίνες φύλλα ενδεχομένως εμπεριέχουν υψηλές συγκεντρώσεις και άλλων φαινολικών ουσιών όπως παρατήρησαν οι

Lee και Lowry (1980), σε νεαρά φύλλα ορισμένων τροπικών φυτών. Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι οι ανθοκυανίνες μαζί με μια σειρά άλλων φαινολικών ακολουθούν παρόμοια βιοσυνθετικά βήματα στο βιοχημικό μονοπάτι των φαινυλοπροπανοειδών (Winkel-Shirley, 2002). Ακόμη, οι Karageorgou και Manetas (2006), εξετάζοντας νεαρά φύλλα του *Quercus coccifera* εντόπισαν μικρότερο βαθμό προσβολής από φυτοφάγα έντομα στα ερυθρά παρά στα πράσινα φύλλα. Όσον αφορά τα ώριμα φύλλα, βρέθηκε πως τα έντομα πιθανόν να προτιμούν τα πράσινα φύλλα για τροφή ή ωοαπόθεση αντί των ερυθρών. Μία σειρά από πειράματα συμπεριφοράς που έγιναν έδειξαν πως αρκετά φυτοφάγα είδη εντόμων προσελκύονταν από αντικείμενα που είχαν πράσινο ή κίτρινο χρώμα (Prokopy & Owens, 1983). Έχει προταθεί πως η παρουσία των ανθοκυανινών στα γηράσκοντα φύλλα μπορεί να αποτελεί ένα οπτικό προειδοποιητικό σήμα προς τους φυτοφάγους καταναλωτές αποτρέποντάς τους έτσι να καταναλώσουν φύλλα τα οποία φέρουν υψηλές συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών (Hamilton & Brown, 2001; Lev-Yadum, 2001).

Μερικές φαινολικές ουσίες φαίνεται να λειτουργούν αποτρεπτικά έναντι της φυτοφαγίας από έντομα γενικευτές (Bennett & Wallsgrove, 1994). Σε αυτήν την περίπτωση το σήμα των ερυθρών φύλλων προς τα φυτοφάγα έντομα θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως «έντιμο». Τα ερυθρά φύλλα εμπεριέχουν εκτός από ανθοκυανίνες και σειρά από άλλες φαινολικές ουσίες που είναι απωθητικές επειδή έχουν δυσάρεστη γεύση ενώ συνάμα θα είναι δύσπεπτα και με χαμηλή διατροφική αξία (Hamilton & Brown, 2001). Κατά αυτόν τον τρόπο, τα φυτά ωφελούνται λόγω του αποτρεπτικού αυτού σήματος αφού υποφέρουν σε μικρότερο βαθμό από φυτοφαγία και επωφελούνται τόσο σε φωτοσυνθετικό ιστό, άρα και σε φωτοσυνθετική επιφάνεια, όσο και σε εξοικονόμηση συστατικών που χρησιμοποιούνται για ανάπτυξη άλλων αμυντικών δομών ή συστατικών. Εν αντιθέσει, το σήμα της ερυθρότητας των φύλλων μπορεί να χαρακτηριστεί ως «ανέντιμο» όταν η ερυθρότητα δεν συνοδεύεται από μεγάλες συγκεντρώσεις φαινολικών

(Karageorgou *et al.*, 2008). Στην περίπτωση των νεαρών φύλλων του πουρναριού παρατηρήθηκε ότι η ερυθρότητα των φύλλων συνοδεύεται από υψηλές συγκεντρώσεις και άλλων φαινολικών ουσιών. Έτσι, αποτελεί στην ουσία ένα «έντιμο» σήμα που αποθαρρύνει τα φυτοφάγα έντομα, μειώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο τον βαθμό προσβολής (Karageorgou & Manetas, 2006). Ο Stone (1979), κατέληξε στο συμπέρασμα πως τα ερυθρά φύλλα ουσιαστικά μιμούνται τα νεκρά ή τα χαμηλής θρεπτικής αξίας φύλλα μειώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο την ένταση φυτοφαγίας που δέχονται.

Επίσης, έχει προταθεί ότι η παρουσία ανθοκυανινών στα φύλλα τα καθιστά λιγότερο διακριτά από τα έντομα (Manetas, 2006). Η όραση στα περισσότερα φυτοφάγα έντομα εξυπηρετείται κυρίως μέσω δύο διαφορετικών τύπων υποδοχέων του φωτός. Ο πρώτος παρουσιάζει ευαισθησία στην UV περιοχή (≈ 350 nm) και ο δεύτερος στην πράσινη (≈ 540 nm) επιτρέποντας έτσι τον οπτικό συνδυασμό μικρών και μεγάλων μηκών κύματος του φάσματος ακτινοβολίας. Ένας τρίτος υποδοχέας επιτρέπει τη διάκριση στην μπλε περιοχή του φάσματος (≈ 440 nm). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργείται μια δυσκολία διάκρισης του ερυθρού χρώματος, όπως το αντιλαμβάνεται το ανθρώπινο μάτι, μιας και οι φωτοϋποδοχείς που υπάρχουν δεν καλύπτουν τη διάκριση αντικειμένων που βρίσκονται εκτός της περιοχής 300 nm - 620 nm (Kelber *et al.*, 2003).

Τέλος, τα ερυθρά φύλλα μπορεί να είναι ένα «αφιλόξενο» περιβάλλον για τα έντομα. Αυτό στηρίζεται στην άποψη ότι στο ερυθρό υπόστρωμα των ανθοκυανικών φύλλων αναιρείται ουσιαστικά το καμουφλάζ των πράσινων κυρίως φυτοφάγων εντόμων που επικάθονται σε αυτά, καθιστώντας τα έτσι πιο ευδιάκριτα στους διάφορους θηρευτές τους (Lev-Yadum *et al.*, 2004; Karageorgou & Manetas, 2006).

δ) Προστασία έναντι UV-B ακτινοβολίας

Σε φυτικά κύτταρα ή ιστούς όπου οι ανθοκυανίνες αποτελούν την κύρια χρωστική που απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία, μπορεί να υποστηριχθεί

πως είναι αυτές που προσδίδουν προστασία έναντι της UV-B ακτινοβολίας (Takahashi *et al.*, 1991; Burger & Edwards, 1996). Αυτή η προστασία επιτυγχάνεται είτε μέσω της απευθείας δέσμευσης της ακτινοβολίας από τις ανθοκυανίνες είτε μέσω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, αφού φέρουν την ιδιότητα να εξουδετερώνουν τοξικές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Stintzing & Carle, 2004). Στις περισσότερες περιπτώσεις όμως, μαζί με τις ανθοκυανίνες συμπεριλαμβάνονται και άλλα φλαβονοειδή και φαινολικά, ουσίες που έχουν πολλές φορές την ίδια δράση με τις ανθοκυανίνες. Η διαπίστωση όμως ότι οι συγκεντρώσεις των ανθοκυανινών αποτελούν ένα πολύ μικρό ποσοστό (1 - 1,5%) της συνολικής συγκέντρωσης της δεξαμενής φαινολικών (Grace *et al.*, 1998; Woodall & Stewart, 1998, Jaakola *et al.*, 2004) περιορίζει στο ελάχιστο την πιθανότητα συμμετοχής τους στην προστασία έναντι της UV-B ακτινοβολίας.

Έτσι, η προστασία των ανθοκυανινών έναντι της UV-B ακτινοβολίας, λειτουργώντας είτε ως «ομπρέλα» προστασίας είτε ως αντιοξειδωτικό μέσο, είναι δύσκολο να εκτιμηθεί λόγω της ταυτόχρονης παρουσίας τους με διάφορες φαινόλες και φλαβονοειδή που συνήθως απαντώνται στους φυτικούς ιστούς και μάλιστα σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από αυτές. Οι φαινόλες και τα φλαβονοειδή εμφανίζουν παρόμοια αντιοξειδωτική δράση όσο και απορροφητική ικανότητα στην UV-B ακτινοβολία, ενώ η θέση τους μπορεί να είναι τέτοια, ενδοκυτταρική ή εξωκυτταρική, που να μπορούν να εξυπηρετούν τον πιο πάνω ρόλο καλύτερα από ότι οι ανθοκυανίνες.

ε) Συμβολή στην ωσμωρρύθμιση - αντίσταση στην έλλειψη νερού

Έχει αναφερθεί πως ένας ακόμη ρόλος που μπορεί να αποδοθεί στις ανθοκυανίνες είναι ο ωσμωρρυθμιστικός. Προτάθηκε, πως με τη συσσώρευση τους οι ανθοκυανίνες προκαλούν ταπείνωση στο δυναμικό νερού των φυτικών ιστών με επακόλουθο να δίνεται η δυνατότητα στο φυτό να αντιμετωπίζει μικρότερα δυναμικά νερού του εδαφικού διαλύματος σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης. Όμως, ακόμη και στα πολύ έντονα κόκκινα

φύλλα η συγκέντρωση των ανθοκυανινών είναι πολύ μικρή ($1 - 4 \text{ mmol kg}^{-1}$), και έτσι δύσκολα μπορεί να υποστηριχτεί ο ωσμωρρυθμιστικός τους ρόλος (Chalker-Scott, 1999).

στ) Θέρμανση του φύλλου

Η ενέργεια των απορροφηθέντων από τις ανθοκυανίνες φωτονίων μπορεί να μετατραπεί σε θερμότητα ανεβάζοντας κατά αυτόν τον τρόπο τη θερμοκρασία του φύλλου. Παρατηρήθηκε πως φυτά που φύονται σε ψυχρές και υψηλού υψόμετρου περιοχές, πολλές φορές φέρουν ανθοκυανίνες στα φύλλα τους (Hoch *et al.*, 2001). Στη σύγκριση μεταξύ πράσινων και κόκκινων φύλλων κωνοφόρων δέντρων βρέθηκαν διαφορές στη θερμοκρασία των φύλλων τους (Sturgeon & Mitten, 1980), ενώ κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε όταν εξετάστηκαν τροπικά φυτικά είδη (Lee *et al.*, 1987). Όπως γίνεται κατανοητό ο πιο πάνω ρόλος των ανθοκυανινών χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

1.4 Φωτοσύνθεση

1.4.1 Γενικά περί φωτοσύνθεσης

Η απαιτούμενη ενέργεια που χρειάζονται τα φυτά για να επιβιώσουν εξασφαλίζεται μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης κατά την οποία η δεσμευόμενη φωτεινή ενέργεια μετατρέπεται σε χημική. Η συγκεκριμένη διαδικασία αποτελεί τη βάση της ζωής στον πλανήτη. Για διδακτικούς κυρίως λόγους, η φωτοσύνθεση χωρίζεται στις φωτεινές και τις λεγόμενες σκοτεινές αντιδράσεις. Οι πρώτες αφορούν το φωτο-εξαρτώμενο τμήμα της φωτοσυνθετικής λειτουργίας ενώ αντίθετα οι σκοτεινές αντιδράσεις αποτελούν το βιοχημικό τμήμα της όλης διαδικασίας, το οποίο αφορά τη δέσμευση του άνθρακα από το ατμοσφαιρικό CO₂. Οι πιο πάνω αντιδράσεις είναι στενά συνδεδεμένες και συνοπτικά περιγράφονται με την εξής αντίδραση:

Η παραπάνω αντίδραση βέβαια, αποτελεί τη γενικευμένη εξίσωση της φωτοσύνθεσης για τα ανώτερα φυτά, τα φύκη και τα κυανοβακτήρια. Θα πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπόψη πως τα φυτά παράλληλα με τη φωτοσύνθεση επιτελούν και αναπνοή, μια διαδικασία που στην ουσία αποτελεί μια αντιστροφή της φωτοσύνθεσης. Έτσι, κατά τη μέτρηση της ταχύτητας της φωτοσύνθεσης δημιουργούνται σημαντικές παρεμβολές, των οποίων η ένταση εξαρτάται κάθε φορά από το επίπεδο μελέτης της φωτοσυνθετικής λειτουργίας (μόρια, οργανίδια, κύτταρα, φύλλα, άτομα, φυτοκοινωνίες).

Προτού ακολουθήσει η ανάλυση των φωτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης κρίνεται σκόπιμο να αναφερθούν λίγα λόγια για τις φωτοσυνθετικές χρωστικές. Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές είναι οι έγχρωμες ενώσεις που συνθέτουν τις φωτοσυνθετικές κεραίες συμμετέχοντας στη διαδικασία σύλληψης και μεταφοράς φωτεινής ενέργειας προς τα ενεργά

κέντρα της φωτοσύνθεσης. Υπάρχουν οι βοηθητικές και οι κύριες φωτοσυνθετικές χρωστικές. Στην πρώτη κατηγορία εντάσσονται οι χλωροφύλλες a (Chl a) και b (Chl b) καθώς και τα καρωτινοειδή, ενώ ως κύριες χαρακτηρίζονται μόνο τα μόρια εκείνα της Chl a που εντοπίζονται στα ενεργά κέντρα των δύο φωτοσυστημάτων. Στην Εικόνα 1.2 φαίνονται τα φάσματα απορρόφησης των χρωστικών στην ορατή περιοχή του φάσματος. Οι χλωροφύλλες έχουν μέγιστα απορρόφησης στην κυανή και ερυθρή περιοχή του ορατού φάσματος και σε αυτό το γεγονός οφείλεται το πράσινο χρώμα των φύλλων. Οι βοηθητικές χρωστικές απορροφούν σε χαμηλότερα μήκη κύματος από ότι η Chl a και έτσι αυξάνουν το εύρος του ηλιακού φάσματος που είναι διαθέσιμο για φωτοσύνθεση. Η μεταφορά της ηλιακής ενέργειας ακολουθεί την πιο κάτω αλληλουχία:

Βασικά, η φωτοσυλλεκτική κεραία λειτουργεί ως χοάνη που οδηγεί την ενέργεια των απορροφούμενων φωτονίων στο κέντρο της αντίδρασης (δύο μόρια Chl a).

Εικόνα 1.2 . Φάσμα απορρόφησης χλωροφυλλών και καρωτινοειδών

Εκτός από τις χρωστικές, οι φωτοσυλλεκτικές κεραίες περιέχουν και δομικές πρωτεΐνες οι οποίες είναι διαφορετικές για το κάθε φωτοσύστημα. Τα σύμπλοκα πρωτεΐνης-χρωστικής αναφέρονται ως φωτοσυλλεκτικά σύμπλοκα I και II (LHCI και LHCII), τα οποία συνδέονται αντίστοιχα με το PSI και το PSII.

1.4.2 Φωτεινές αντιδράσεις

Οι αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης λαμβάνουν χώρα σε ειδικευμένα οργανίδια, τους χλωροπλάστες (Εικόνα 1.3). Οι χλωροπλάστες είναι οργανίδια τα οποία ανήκουν στα λεγόμενα πλαστίδια που απαντώνται στα φυτικά κύτταρα και στα φύκη. Περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη (πλαστιδιακός φάκελος) και στο εσωτερικό τους διαθέτουν ένα αρκετά ανεπτυγμένο εσωτερικό σύστημα αναδιπλούμενων μεμβρανών, τα θυλακοειδή. Αυτά αναφέρονται ως θυλακοειδή του στρώματος, όταν είναι μονήρη, και ως θυλακοειδή των grana, όταν σχηματίζουν συστοιχίες. Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές βρίσκονται στις μεμβράνες των θυλακοειδών μαζί με μια σειρά από πρωτεΐνες-ένζυμα και μόρια που εμπλέκονται στη μεταφορά ηλεκτρονίων. Τέλος, στην περιοχή του στρώματος εντοπίζονται DNA, RNA, ριβοσώματα και πρωτεΐνες που βοηθούν στη διαδικασία κατήλωσης του CO₂.

Εικόνα 1.3. Σχηματική απεικόνιση της δομής χλωροπλάστη

Στα θυλακοειδή των χλωροπλαστών λαμβάνουν χώρα οι φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης. Η διεύθετηση όλων των εμπλεκόμενων δομών είναι με τέτοιο τρόπο όπου η ροή των ηλεκτρονίων επιτυγχάνεται σχηματίζοντας ένα νοητό Z. Αυτό αποτέλεσε αφορμή για να αποδοθεί στις φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης ο όρος «σχήμα Z» της φωτοσύνθεσης (Εικόνα 1.4).

Εικόνα 1.4. «Σχήμα Z» της φωτοσύνθεσης

Η φωτεινή ενέργεια (Photon) απορροφάται από τη φωτοσυλλεκτική κεραία και κατευθύνεται αρχικά στο ενεργό κέντρο του PSII. Για κάθε φωτόνιο που απορροφάται, ένα διεγερμένο ηλεκτρόνιο μεταφέρεται σε ένα δέκτη ηλεκτρονίων του PSII και αναπληρώνεται από το H₂O, το οποίο μέσω του συμπλόκου έκλυσης οξυγόνου λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων. Έπειτα, τα ηλεκτρόνια από το PSII περνούν μέσω της πλαστοκινόνης (plastoquinone-Q) στο σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων (cytochrome complex b6f) και στη συνέχεια στη πλαστοκυανίνη (plastocyanin-pC). Η pC λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων στο PSI, όπου αναπληρώνει το διεγερμένο ηλεκτρόνιο που έχασε μετά την απορρόφηση της φωτεινής ενέργειας. Μετέπειτα, το ηλεκτρόνιο από το PSI θα περάσει στη φερρεδοξίνη (ferredoxin-Fd) και θα καταλήξει στην αναγωγή του NADP (NADP reductase), ένζυμο που ανάγει το NADP σε

NADPH₂ παράγοντας κατά αυτόν τον τρόπο αναγωγική δύναμη. Κατά τη διάρκεια της ροής ηλεκτρονίων δημιουργείται κλίση στη συγκέντρωση πρωτονίων λόγω αύξησης του αριθμού πρωτονίων στον εσωτερικό μικροχώρο των θυλακοειδών. Αυτή εν συνεχεία, εκτονώνεται μέσω της ATP-συνθετάσης (πρωτεϊνική διαμεμβρανική αντλία) με αποτέλεσμα τη σύνθεση των πλούσιων ενεργειακά μορίων ATP. Η πιο πάνω ροή ηλεκτρονίων που έχει περιγραφεί αποτελεί τη μη-κυκλική ή γραμμική ροή. Υπάρχει και η κυκλική ροή ηλεκτρονίων, όπου σημειώνεται γύρω από το PSI και συνοδεύεται από παραγωγή ATP μόνο, αφού αναγωγική δύναμη υπό μορφή NADPH₂ δεν παράγεται.

1.4.3 Σκοτεινές αντιδράσεις

Οι σκοτεινές αντιδράσεις αφορούν το βιοχημικό κομμάτι της φωτοσύνθεσης. Σε αυτήν τη φάση της φωτοσύνθεσης επιτυγχάνεται η μετατροπή του ανόργανου άνθρακα του ατμοσφαιρικού CO₂ σε οργανικές ουσίες. Η μεταβολική πορεία που αφήνει καθαρό κέρδος σε οργανικό άνθρακα ονομάζεται κύκλος του Calvin ή αλλιώς κύκλος C₃, λόγω του ότι το πρώτο σταθερό προϊόν που σχηματίζεται φέρει τρία άτομα άνθρακα στη δομή του (Εικόνα 1.5).

Εικόνα 1.5. Κύκλος Calvin ή C₃

Ο πιο πάνω κύκλος αντιδράσεων λαμβάνει χώρα στο στρώμα των χλωροπλαστών. Το ένζυμο με τον κυρίαρχο ρόλο σε αυτήν τη μεταβολική πορεία είναι η καρβοξυλάση/οξυγονάση της διφωσφοριβουλόξης, που σε σύντμηση αναφέρεται ως Rubisco. Πρόκειται για ένζυμο με μοριακό βάρος 560.000, το οποίο απαντάται στα κυανοβακτήρια και στους περισσότερους ευκαρυωτικούς φωτοσυνθετικούς οργανισμούς. Όσον αφορά τη δομή του, πρόκειται ουσιαστικά για ένα δεκαεξαμερές μόριο (8 μεγάλες + 8 μικρές υπομονάδες). Με τη βοήθεια μιας συνοδού πρωτεΐνης επιτυγχάνεται η ορθή διεύθυνση όλων των υπομονάδων στο στρώμα των χλωροπλαστών. Όπως γίνεται αντιληπτό και από την ανάγνωση του ονόματός του φέρει διττό ρόλο. Αφενός, συμπεριφέρεται ως οξυγονάση όταν οξυγονώνει το πρώτο και βασικό υπόστρωμα του κύκλου C₃, την 1,5 διφωσφοριβουλόξη και αφετέρου, λειτουργεί ως καρβοξυλάση του ίδιου μορίου κατά τη δέσμευση του ατμοσφαιρικού CO₂ στην αρχή του κύκλου. Για αυτόν το λόγο το Rubisco χαρακτηρίζεται ως πρωτεύον ένζυμο και αποτελεί την αφθονότερη πρωτεΐνη στον πλανήτη αποτελώντας το 50% της συνολικής πρωτεΐνης των φύλλων.

Ο κύκλος του Calvin περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια: την καρβοξυλίωση, την αναγωγή και την αναγέννηση. Κατά το πρώτο στάδιο, η 1,5 διφωσφοριβουλόζη (σάκχαρο με 5 άτομα άνθρακα + 2 φωσφορικές ομάδες) υποδέχεται το CO₂. Με τη δράση του Rubisco γίνεται καρβοξυλίωση και παράγεται ένα ασταθές προϊόν που ακαριαία διασπάται σε δύο μόρια 3-φωσφογλυκερικού οξέος (PGA). Ακολουθεί το δεύτερο στάδιο του κύκλου όπου το PGA ανάγεται σε 3-φωσφογλυκεριναλδεύδη που στην ουσία πρόκειται για σάκχαρο με τρία άτομα άνθρακα (τριόζη). Για κάθε μόριο PGA που ανάγεται απαιτείται ένα μόριο ATP και ένα μόριο NADPH₂. Το τρίτο και τελευταίο στάδιο του κύκλου περιλαμβάνει την αναγέννηση του μορίου-δέκτη του CO₂ (1,5 διφωσφοριβουλόζη). Τα 5/6 των παραγόμενων μορίων τριόζης χρησιμοποιούνται για αυτόν το σκοπό ενώ το υπόλοιπο 1/6 κατευθύνεται προς τη βιοσύνθεση χρήσιμων τελικών προϊόντων (εξόζες, λιπαρά οξέα και αμινοξέα). Από τις εξόζες παράγεται ο δισακχαρίτης σακχαρόζη και μεταφέρεται σε όλο το φυτό αλλά και ο πολυσακχαρίτης άμυλο που αποθηκεύεται στο χλωροπλάστη και ενεργοποιείται όταν παραστεί ανάγκη από το φυτό. Εν τέλει, για την αφομοίωση ενός μορίου CO₂ μέσω του κύκλου του Calvin απαιτούνται τρία μόρια ATP και δύο μόρια NADPH₂. Ένα μόριο ATP καταναλώνεται στη φάση αναγέννησης της 1,5 διφωσφοριβουλόζης και τα υπόλοιπα 2 ATP αλλά και τα 2 NADPH₂ χρησιμοποιούνται για την αναγωγή των δύο μορίων PGA. Έτσι γίνεται αντιληπτό πως για την καθαρή παραγωγή ενός μορίου εξόζης χρειάζονται έξι στροφές του κύκλου αφού για την παραγωγή 1 τριόζης απαιτούνται 3 στροφές του κύκλου.

1.4.4 Φθορισμός χλωροφύλλης

Η φωτεινή ενέργεια (A) που απορροφάται από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να παραχθεί φωτοχημικό έργο (P),

να μετατραπεί και να χαθεί ως θερμότητα (Q) ή να εκπεμφθεί ως φθορισμός (F) προς το περιβάλλον:

$$A = P + Q + F$$

Οι χλωροφύλλες είναι οι μόνες από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές που φέρουν την ικανότητα της αποδιέγερσης μέσω φθορισμού. Οι τρεις οδοί που περιγράφονται από την πιο πάνω εξίσωση είναι αμοιβαία ανταγωνιστικοί (Maxwell & Johnson, 2000). Αύξηση του F ή της Q έχει ως συνέπεια τη μείωση του P , δηλαδή της φωτοσύνθεσης. Άρα, μετρώντας τη μεταβολή του F μπορεί έμμεσα να εκτιμηθεί η αλλαγή στη φωτοσύνθεση.

Η παρακολούθηση των μεταβολών του φθορισμού της χλωροφύλλης υπό συνθήκες μεταβαλλόμενου φωτισμού παρέχει σημαντική πληροφορία για τη φυσιολογική κατάσταση της φωτοσυνθετικής συσκευής. Ιδιαίτερως χρήσιμη αποδεικνύεται η ανάλυση της πρώτης φάσης ανόδου του φθορισμού μετά από αιφνίδιο φωτισμό ενός φωτοσυνθετικού ιστού που έχει παραμείνει για αρκετή ώρα στο σκοτάδι. Η κινητική των μεταβολών του φθορισμού περιγράφηκε από τους Kautsky και Hirsch (1931).

Η κατανόηση της κινητικής επαγωγής του φθορισμού προϋποθέτει γνώση σχετικά με τη δομή και τη λειτουργία των φωτοσυστημάτων. Μετά από παραμονή του φωτοσυνθετικού ιστού στο σκοτάδι (ο χρόνος εξαρτάται από το είδος του ιστού και του φυτού καθώς και από τη φυσιολογική του κατάσταση), οι πρωτογενείς αποδέκτες ηλεκτρονίων του PSII (Q_A και Q_B) είναι πλήρως οξειδωμένοι. Έτσι, τα κέντρα αντίδρασης του PSII μπορούν να δεχθούν ενέργεια διέγερσης και να τη διοχετεύσουν ακολούθως προς τα Q_A και Q_B . Όταν τα κέντρα αντίδρασης βρίσκονται σε αυτήν τη φάση (σκοτάδι) χαρακτηρίζονται ως «ανοιχτά». Η ένταση του φθορισμού που σημειώνεται ακαριαία (σε μs) μετά από φωτισμό υψηλής έντασης στο προσκοτεινιασμένο φωτοσυνθετικό ιστό είναι το F_0 αντιπροσωπεύοντας την ένταση του φθορισμού όταν τα δραστικά κέντρα του PSII είναι «ανοιχτά». Η τιμή του αυξάνεται στις περιπτώσεις όπου ορισμένα κέντρα της αντίδρασης

καταστρέφονται ή παρεμποδίζεται η μεταφορά ενέργειας από τη φωτοσυλλεκτική κεραία προς τα ενεργά κέντρα της αντίδρασης. Εφόσον η φωτεινή ακτινοβολία που δέχεται ο ιστός είναι κεκορεσμένη για τη φωτοσύνθεση, τα αποθέματα των πρωτογενών αποδεκτών ηλεκτρονίων του PSII ανάγονται πλήρως και χαρακτηρίζονται ως «κλειστά». Σε αυτό το διάστημα το PSII δεν μπορεί να δεχθεί επιπλέον ενέργεια διέγερσης λόγω της έλλειψης οξειδωμένων Q_A και Q_B , αυξάνοντας έτσι τον αριθμό των «κλειστών» κέντρων αντίδρασης και κατά συνέπεια το φθορισμό. Ο μέγιστος εκπεμπόμενος φθορισμός (F_{max}) σημειώνεται τη στιγμή που όλα τα κέντρα αντίδρασης του PSII θεωρούνται «κλειστά».

Ακολούθως, τα Q_A και Q_B διοχετεύουν ηλεκτρόνια προς την πλαστοκινόνη και εν συνεχεία στο PSI με αποτέλεσμα να επανοξειδώνονται, τα κέντρα αντίδρασης να ανοίγουν σταδιακά, η φωτοχημική απόδοση του PSII να αυξάνεται και ο φθορισμός να μειώνεται. Έπειτα, η φωτοσυνθετική αφομοίωση του CO_2 ξεκινά και η τιμή του φθορισμού που λαμβάνεται εξαρτάται από το πόσο εύρυθμα συνεργάζονται τα δύο φωτοσυστήματα καθώς και από το πόσο αποδοτικά δουλεύει ο κύκλος C3. Επειδή οι απόλυτες τιμές του φθορισμού μπορεί να διαφέρουν ανάμεσα σε υγιή φύλλα του ίδιου είδους, στην πράξη υπολογίζονται οι αναλογίες των μετρούμενων μεγεθών. Ο λόγος $F_{max}-F_0/F_{max} = F_v/F_{max}$, όπου F_v είναι ο μεταβαλλόμενος φθορισμός (variable), θεωρείται ανάλογος της κβαντικής απόδοσης της παγίδευσης φωτονίων και αποτελεί μέτρο της μέγιστης φωτοχημικής ικανότητας του PSII.

Προχωρώντας σε εμβάθυνση της κινητικής επαγωγής του φθορισμού της χλωροφύλλης από το F_0 στο F_m , αποδεικνύεται η περιπλοκότητα και η δυσκολία να κατανοηθεί το όλο φαινόμενο σε βάθος. Η καμπύλη κινητικής επαγωγής του φθορισμού χαρακτηρίζεται από τις διακριτές φάσεις O-K-J-I-P κατά την τρέχουσα ονοματολογία. Αυτές οι φάσεις υποδεικνύουν τη ροή ενέργειας και ηλεκτρονίων από τους αρχικούς δότες ηλεκτρονίων (σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου- OEC) προς το PSII, μετά δια μέσου ενδιάμεσων φορέων ηλεκτρονίων προς το PSI και εν τέλει προς τους τελικούς τους αποδέκτες. Με

βάση την επεξεργασία των πιο πάνω κινητικών επαγωγής του φθορισμού, την τελευταία δεκαετία (Strasser *et al.*, 2004; Tsimilli-Michael & Strasser, 2008) έχουν προταθεί και αξιολογηθεί πολλοί και πιο ευαίσθητοι δείκτες της φωτοσυνθετικής ικανότητας σε σχέση με τον παραδοσιακό F_v/F_{max} . Αυτοί οι δείκτες περιγράφουν πλήρως το βιοφυσικό ανάγλυφο της φωτοσύνθεσης και των πιθανών περιοριστικών σταδίων στη ροή ενέργειας και ηλεκτρονίων. Αυτή η νέα καινοτόμος μέθοδος ονομάζεται εν συντομία «JIP-test» και χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή. Η ανάλυση αυτής της μεθόδου κρίνεται σκόπιμο να γίνει στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

Εν κατακλείδι, αξίζει να αναφερθεί πως η μέθοδος μέτρησης του φθορισμού κατέστη ιδιαίτερος δημοφιλής για τους ερευνητές της φωτοσύνθεσης τις τελευταίες δεκαετίες αφού είναι γρήγορη και μη επεμβατική. Προς αυτήν την κατεύθυνση βοήθησε βεβαίως η ανάπτυξη της τεχνολογίας και έτσι η εφαρμογή της επεκτάθηκε και υπό ρεαλιστικές συνθήκες πεδίου τις τελευταίες δύο δεκαετίες, αφού κατασκευάστηκαν φορητά και φιλικά προς το χρήστη όργανα μέτρησης του φθορισμού. Σήμερα στο εμπόριο συναντούμε πλήθος τέτοιων συσκευών, των λεγόμενων φθορισμόμετρων, τα οποία αποτελούν χρήσιμο εργαλείο στα χέρια του κάθε ερευνητή της φωτοσύνθεσης. Παρόλο που η εφαρμογή της μεθόδου είναι εύκολη, η ερμηνεία των σημάτων του φθορισμού καθώς και η αποτίμηση των υποκείμενων βιοφυσικών λειτουργιών στους φωτοσυνθετικούς ιστούς που εξετάζονται είναι δύσκολη.

1.5 Αναπαραγωγική προσπάθεια και επιτυχία

Η φωτοσυνθετική ικανότητα και η διακυμαινόμενη ασυμμετρία των φύλλων έχουν προταθεί ως έμμεσοι δείκτες της αρμοστικότητας των φυτών (Palmer & Strobeck, 1986; Hermans *et al.*, 2003). Ωστόσο, ο τελεσίδικος και ο πιο άμεσος δείκτης για την αρμοστικότητα ενός οργανισμού είναι η

αναπαραγωγική του επιτυχία, με την προϋπόθεση βέβαια ότι μπορεί να μετρηθεί με αξιοπιστία και σχετική ευκολία, ιδιαίτερα κάτω από φυσικές συνθήκες. Με αυτό το σκεπτικό, επιλέχθηκε ο θάμνος *Cistus creticus* κυρίως λόγω δύο πρακτικών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει. Πρώτον, εμφανίζει στον πληθυσμό του πράσινους και κόκκινους φαινότυπους και δεύτερον, τα άνθη του είναι εφήμερα (Manetas & Petropoulou, 2000), οπότε διευκολύνεται σημαντικά η εκτίμηση της αναπαραγωγικής προσπάθειας και αναπαραγωγικής επιτυχίας των ατόμων.

Η άμεση εκτίμηση της αρμοστικότητας των φυτών καθίσταται δυνατή με τον προσδιορισμό της αναπαραγωγικής επιτυχίας τους (αριθμός σπερμάτων/φυτό). Επικουρικά, μπορούν να βοηθήσουν και άλλες αναπαραγωγικές παράμετροι όπως η αναπαραγωγική προσπάθεια (αριθμός ανθέων/φυτό), η επικονιαστική επιτυχία (αριθμός καρπών/αριθμός ανθέων και αριθμός σπερμάτων/καρπό), το βάρος των σπερμάτων, καθώς και η ικανότητα φύτευσης των σπερμάτων.

Εάν αυτές οι παράμετροι συσχετιστούν με τους έμμεσους δείκτες αρμοστικότητας που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή, μπορούν να αποτελέσουν αξιόπιστη και χρήσιμη πληροφορία για την εκτίμηση της φυσιολογικής κατάστασης φυτικών ατόμων ή πληθυσμών.

2. Σκοπός διατριβής

Η παρούσα διατριβή στόχευσε στο να διερευνήσει και να ερμηνεύσει τις συσχετίσεις μεταξύ των παραμέτρων που αναφέρονται στον τίτλο της. Ο ανθοκυανικός χαρακτήρας των φύλλων (παροδική ερυθρότητα) ενδεχομένως να προσφέρει προστασία στη φωτοσυνθετική συσκευή έναντι της συνδυασμένης καταπόνησης από ψύχος και υψηλές εντάσεις φωτός (κύρια χαρακτηριστικά χειμερινής περιόδου στα Μεσογειακά οικοσυστήματα). Εξετάστηκε κατά πόσο ο φαινοτυπικός αυτός χαρακτήρας αφορά φωτοσυνθετικώς υγιή άτομα (που τα καθιστά υγιέστερα;) ή εγγενώς μειονεκτικά άτομα που έχουν ανάγκη περαιτέρω φωτοπροστασίας. Έγινε προσπάθεια στο να ελεγχθεί κατά πόσο η ένταση της ερυθρότητας αποτελεί ένα αξιόπιστο δείκτη φωτοσυνθετικού σφρίγους. Με βάση αναφοράς τον ανθοκυανικό χαρακτήρα των φύλλων η παρούσα εργασία προσπάθησε να εξετάσει κατά πόσο οι «ερυθροί» φαινότυποι έχουν υψηλότερη ή χαμηλότερη αρμοστικότητα υπό ρεαλιστικές συνθήκες. Για την εξυπηρέτηση αυτού του στόχου κύρια πειραματόφυτα ήταν το *Pistacia lentiscus* και το *Cistus creticus* τα οποία παρουσιάζουν ενδο-ειδική ποικιλότητα στην έκφραση του ανθοκυανικού χαρακτήρα. Στο δεύτερο πειραματόφυτο που αναφέρθηκε, εξετάστηκε η αρμοστικότητα των δύο φαινοτύπων του (πράσινου και ερυθρού) ως προς την αναπαραγωγική προσπάθεια και επιτυχία τους.

Ο δεύτερος στόχος της διατριβής ήταν ανεξάρτητος του ανθοκυανικού χαρακτήρα και αφορούσε την μορφολογική ασυμμετρία των ώριμων φύλλων. Σήμερα, είναι αποδεκτό πως η αδυναμία του γονοτύπου να εφαρμόσει το αναπτυξιακό του πρόγραμμα υπό συνθήκες καταπόνησης, έχει ως αποτέλεσμα την εγκατάσταση διακυμαινόμενης (τυχαίας) ασυμμετρίας στα φύλλα κατά τη νεότητά τους. Έγινε προσπάθεια να εξεταστεί κατά πόσο η νεανική καταπόνηση αφήνει το αποτύπωμα της στις φωτοσυνθετικές ιδιότητες των ώριμων φύλλων και κατά πόσο συσχετίζεται με τη φωτοσυνθετική

ικανότητα. Για την εκπλήρωση αυτού του στόχου εξετάστηκαν αρκετά φυτικά είδη με τη χρήση σύγχρονων μεθόδων ανάλυσης εικόνας και ανάλυσης των κινητικών του *in vivo* φθορισμού της χλωροφύλλης.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Επιλογή φυτών

3.1.1 Διακυμαινόμενη ασυμμετρία

Όλα τα φυτικά είδη που εξετάστηκαν ως προς τον τύπο της ασυμμετρίας των ώριμων φύλλων τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. Όπου εντοπίστηκε τυχαία ασυμμετρία των φύλλων, εξετάστηκε περαιτέρω η συσχέτισή της με τη φωτοσυνθετική ικανότητα μέσω μετρήσεων φθορισμού της Chl *a* (βλέπε Αποτελέσματα).

<i>Acacia cyanophylla</i>	<i>Myrtus communis</i>
<i>Ailanthus altissima</i>	<i>Nerium sp.</i>
<i>Arbutus unedo</i>	<i>Olea europea</i>
<i>Ceratonia siliqua</i>	<i>Phlomis fruticosa</i>
<i>Cercis siliquastrum</i>	<i>Pistacia lentiscus</i>
<i>Cistus creticus</i>	<i>Platanus orientalis</i>
<i>Dittrichia viscosa</i>	<i>Populus alba</i>
<i>Euphorbia helioscopia</i>	

Πίνακας 3.1. Κατάλογος 15 φυτικών ειδών που εξετάστηκαν ως προς τον τύπο της ασυμμετρίας των φύλλων τους. Σε 7 βρέθηκε διακυμαινόμενη ασυμμετρία (σκιασμένα)

3.1.2 Χειμερινή ερυθρότητα

3.1.2.1 *Pistacia lentiscus*

Κύριο πειραματόφυτο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε το *Pistacia lentiscus* L., κοινώς σχίνος (Εικόνα 3.1). Πρόκειται για χαρακτηριστικό αείφυλλο-σκληρόφυλλο θάμνο του μεσογειακού χώρου που η συστηματική του κατάταξη το εντάσσει στην οικογένεια Anacardiaceae. Στο φυτικό αυτό είδος, τα ώριμα φύλλα παραμένουν για χρονικό διάστημα 2 - 3 ετών και μετά, κατά το τέλος της άνοιξης με αρχές καλοκαιριού, αποβάλλονται (Orshan, 1989). Στο σχίνο όπως και σε κάποια άλλα είδη (π.χ. *Cistus creticus*), παρατηρείται χειμερινή ερυθρότητα στα ώριμά τους φύλλα. Αυτή η ερυθρότητα διαρκεί από τα μέσα Γενάρη μέχρι το τέλος Απρίλη και παρατηρείται μόνο σε ορισμένα άτομα του πληθυσμού, αφού την ίδια στιγμή γειτονικά τους άτομα παραμένουν πράσινα. Η ένταση της ερυθρότητας τόσο μεταξύ των φύλλων του κάθε ατόμου όσο και των ατόμων μεταξύ τους διακυμαίνεται. Λόγω αυτής της διακύμανσης στο *P. lentiscus*, δίνεται η δυνατότητα στον παρατηρητή να διακρίνει πράσινα και κόκκινα φύλλα όλων των αποχρώσεων δια γυμνού οφθαλμού. Κατά την υπόλοιπη διάρκεια του έτους, πλην της χειμερινής περιόδου, όλα τα άτομα σχίνου φέρουν ώριμα φύλλα με πράσινο χρώμα.

Εικόνα 3.1. *Pistacia lentiscus*

3.1.2.2 *Cistus creticus*

Το είδος *Cistus creticus* L. κοινώς λαδανιά (Εικόνα 3.2) ανήκει στην οικογένεια Cistaceae και πρόκειται για Μεσογειακό μαλακόφυλλο ημι-φυλλοβόλο πολύκλαδο θάμνο. Την άνοιξη εμφανίζει εφήμερα ρόδινα άνθη με ιδιαίτερη μορφή αφού μοιάζουν σαν τσαλακωμένα. Η ιδιότητά του να φέρει εφήμερα άνθη, το καθιστά ιδανικό πειραματόφυτο για τη μελέτη της αναπαραγωγικής προσπάθειας και επιτυχίας. Το συγκεκριμένο είδος εμφανίζεται ως πρωτοπόρο σε περιοχές που υπέστησαν πυρκαγιά, λόγω των πυρόφιλων σπερμάτων του που ευνοούν την εγκατάστασή του μετά τις φωτιές. Στα ώριμα φύλλα ορισμένων ατόμων, όπως και στο σχίνο, κατά τη χειμερινή περίοδο συσσωρεύονται ανθοκυανίνες.

Εικόνα 3.2. *Cistus creticus*

3.2 Μέτρηση ασυμμετρίας φύλλων

Στη δειγματοληψία των φύλλων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της τυχαίας ασυμμετρίας εξαιρέθηκαν από το δείγμα φύλλα τα οποία είτε έφεραν κάποιο τραυματισμό είτε ήταν προσβεβλημένα από έντομα ή παθογόνους μικροοργανισμούς. Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε καθορισμένο

πρότυπο συλλογής των φύλλων το οποίο περιλάμβανε τη συλλογή φύλλων νότιας έκθεσης που φύονταν στη δεύτερη από την κορυφή του κάθε κλάδου σειρά φύλλων. Οι δειγματοληψίες έγιναν μεσημβρινές ώρες (11:00 – 14:00) κατά τη διάρκεια αίθριων ημερών. Μετέπειτα, αποθηκεύτηκαν σε αεροστεγή σακουλάκια με βρεγμένο διηθητικό χαρτί και προσκοτεινιάστηκαν για 12 ώρες πριν από τη μέτρηση της φωτοσυνθετικής τους ικανότητας και της ηλεκτρονικής σάρωσης-φωτογράφισής τους στο εργαστήριο.

Υπάρχουν αρκετοί πιθανοί τρόποι να ελεγχθεί η τυχαία ασυμμετρία των φύλλων μιας και το ερώτημα είναι απλό: είναι η μία πλευρά του φύλλου σημαντικά μεγαλύτερη από την άλλη; Αν η απάντηση είναι καταφατική τότε υπάρχει ασυμμετρία. Εάν ακολούθως βρεθεί πως κάθε φορά η πλευρά που υπερέχει εναλλάσσεται από φύλλο σε φύλλο με τυχαίο ή καθορισμένο τρόπο τότε προσεγγίζεται ο τύπος της ασυμμετρίας. Στην προκειμένη περίπτωση, εξετάζονταν η ασυμμετρία σε κάθε όργανο-φύλλο ξεχωριστά μέσω της σύγκρισης των εμβαδών της δεξιάς και της αριστερής του επιφάνειας. Έτσι, για την απόδειξη του τύπου της ασυμμετρίας των φύλλων, ο πλέον αξιόπιστος στατιστικός έλεγχος κρίθηκε το paired t-test που εφαρμόστηκε στα δεδομένα για κάθε ένα από τα φυτικά είδη που εξετάστηκε στην παρούσα διατριβή. Επίσης, οι τιμές ελέχθησαν στο κατά πόσο ακολουθούν το κωδωνοειδές κανονικό πρότυπο κατανομής.

Τα σύγχρονα μέσα ανάλυσης εικόνας αναπαριστούν με απλό και ρεαλιστικό τρόπο το μέγεθος και το σχήμα των διαφόρων δομών στις οποίες εξετάζεται κάθε φορά η διακυμαινόμενη ασυμμετρία. Στην περίπτωση όπου αναλύεται εικόνα της προς μέτρηση δομής, όπως για παράδειγμα η φωτογραφία ενός φύλλου, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη τυχόν σφάλμα μετρήσεων που μπορεί να οφείλεται λόγω χαμηλής διακριτικής ικανότητας της μηχανής που φωτογραφίζει. Προς αποφυγή αυτού του σφάλματος, οι δομές (τα φύλλα) σαρώθηκαν σε σαρωτή Hewlett-Packard (Scanjet 6200 c, Houston, TX, USA) με μεγάλη διακριτική αναλυτική ικανότητα (600 dpi resolution) ελαχιστοποιώντας έτσι το προκύπτον λεγόμενο σφάλμα εικόνας.

Κατόπιν, οι φωτογραφίες έτυχαν επεξεργασίας με το πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας Image Pro-Plus 4.5. Το συγκεκριμένο πρόγραμμα προσδίδει πληροφορία με μεγάλη ακρίβεια (επίπεδο pixel).

Κατά αυτόν τον τρόπο, σειρά φυτικών ειδών (Πίνακας 3.1) εξετάστηκαν στην περιοχή της Πανεπιστημιούπολης Πατρών (38°18'N, 21°47'E). Στις περιπτώσεις όπου, μετά από προκαταρκτικό έλεγχο 50 φύλλων προερχόμενων από τουλάχιστον 6 άτομα, εμφανίστηκε τυχαία ασυμμετρία τότε εξετάστηκε και η φωτοσυνθετική ικανότητα των φύλλων. Συγκεκριμένα, στα φυτικά είδη που εντοπίστηκε τυχαία ασυμμετρία εξετάστηκαν εκατοντάδες φύλλα από τουλάχιστον 10 άτομα την κάθε φορά (βλέπε Αποτελέσματα). Η διακυμαινόμενη ασυμμετρία (ΔA) υπολογίστηκε από τον εξής τύπο (Hagen *et al.*, 2008):

$$\Delta A = |A - \Delta| / A + \Delta$$

όπου A και Δ τα εμβαδά επιφάνειας της αριστερής και της δεξιάς πλευράς του φύλλου, αντίστοιχα (Εικόνα 3.3).

Εικόνα 3.3. Αναπαράσταση υπολογισμού ΔA σε φύλλο του είδους *Populus alba*

3.3 Εκτίμηση περιεχομένων ανθοκυανινών και χλωροφυλλών

Οι περιεχόμενες ανθοκυανίνες αλλά και οι χλωροφύλλες εκτιμήθηκαν μέσα από μαθηματικούς δείκτες οι οποίοι προκύπτουν από ανάλυση εκατοντάδων φασμάτων ανάκλασης των φύλλων. Τα φάσματα αυτά ελήφθησαν με τη βοήθεια ειδικού φασματο-ανακλασίμετρου. Τόσο η περιγραφή της λειτουργίας αυτού του οργάνου όσο και ο μαθηματικός τρόπος υπολογισμού αυτών των δεικτών ανακλαστικότητας περιγράφεται πιο κάτω. Μετρήσεις της ανακλαστικότητας ερυθρών και πράσινων φύλλων έγιναν μόνο κατά το πρώτο κομμάτι εργασιών με πειραματόφυτο το *P. lentiscus*.

Φασματο-ανακλασίμετρο

Η φασματική ανακλαστικότητα φύλλων του σχίνου καταγράφηκε με το φασματο-ανακλασίμετρο UniSpec (PP Systems, Haverhill, MA, USA). Το όργανο αυτό διαθέτει μια διακλαδισμένη οπτική ίνα (bifurcated fiber optic) μικρής διαμέτρου (2.3 mm) και μια εσωτερική πηγή αλογόνου. Ο ένας κλάδος της οπτικής ίνας μεταφέρει φως από την εσωτερική πηγή του οργάνου προς το δείγμα ενώ ο δεύτερος επιστρέφει το ανακλώμενο φως στον ανιχνευτή. Η ανακλαστικότητα του φύλλου (I/I_0) υπολογίζεται με τη σύγκριση του φάσματος της ανακλαστικότητας του δείγματος (I) με αυτό ενός λευκού πρότυπου υλικού (reference standard for calibration) (I_0) που έχει σχεδόν πλήρη ανακλαστικότητα ($> 97\%$) σε μεγάλο εύρος μηκών κύματος.

Με τη βοήθεια του πιο πάνω φασματο-ανακλασίμετρου μετρήθηκε στο φάσμα 400 - 1100 nm η ανακλαστικότητα φύλλων των δύο φαινοτύπων του σχίνου. Από αυτές τις μετρήσεις υπολογίστηκαν οι δείκτες ανακλαστικότητας που παρατίθενται παρακάτω:

α) Anthocyanin reflectance index (ARI) ως $ARI = (R_{550})^{-1} - (R_{700})^{-1}$

όπου $(R_{550})^{-1}$ και $(R_{700})^{-1}$ είναι οι τιμές ανακλαστικότητας στα 550 και 700 nm αντεστραμμένες, αντίστοιχα. Ο δείκτης ARI είναι ανεξάρτητος της

συγκέντρωσης χλωροφύλλης που εμπεριέχεται στο προς μέτρηση φυτικό ιστό (Gitelson *et al.*, 2001).

β) Normalized difference index (NDI) ως $NDI = (R_{750} - R_{705}) / (R_{750} + R_{705})$

όπου R_{750} και R_{705} είναι αντίστοιχα οι τιμές ανακλαστικότητας στα 750 και 705 nm. Ο δείκτης NDI είναι ανεξάρτητος των επιπέδων συγκέντρωσης των ανθοκυανινών στο φύλλο και συνδέεται γραμμικά με τη συγκέντρωση των χλωροφυλλών (Gitelson & Merzlyak, 1994).

3.4 «Εργασία» μέτρησης φωτοσύνθεσης

Σήμερα, η αλματώδης αύξηση της τεχνολογίας σε συνδυασμό με τις νέες γνώσεις σχετικά με τη φωτοσύνθεση, επιτρέπουν την κυκλοφορία στο εμπόριο δεκάδων εκδόσεων οργάνων μέτρησης της φωτοσύνθεσης. Κάποια από αυτά τα όργανα εκτιμούν έμμεσα τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα μέσω μετρήσεων του φθορισμού της χλωροφύλλης *a* και κάποια άλλα την μετρούν άμεσα μέσω της αφομοίωσης του CO₂, δηλαδή της φωτοσύνθεσης σε πραγματικό χρόνο με τη βοήθεια αναλυτή αερίων. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο αυτοί τύποι οργάνων. Έγιναν μετρήσεις φθορισμού της χλωροφύλλης με φθορισμόμετρο τύπου Mini-PAM (Walz, Effeltrich, Germany) καθώς και με το συνεχές φθορισμόμετρο Handy PEA (Hansatech Instruments Ltd, King's Lynn, Norfolk, UK). Επίσης, ελήφθησαν υπό ρεαλιστικές συνθήκες πεδίου μετρήσεις αφομοίωσης του CO₂ με τη βοήθεια του αναλυτή αερίων Li-6400 (Li-cor, Lincoln, Ne, USA). Η σύντομη περιγραφή της αρχής λειτουργίας των προαναφερθέντων οργάνων καθώς και το θεωρητικό υπόβαθρο που τα υποστηρίζει αναλύεται στα υποκεφάλαια που ακολουθούν.

3.4.1 Φθορισμόμετρο Mini-PAM

Ιn vivo φθορισμός της χλωροφύλλης και φωτοσυνθετική ικανότητα

Στα φθορισμόμετρα τύπου PAM (Pulse Amplitude-Modulation) (Εικόνα 3.4) η διεγείρουσα ακτινοβολία είναι «παλλόμενη», δηλαδή αναβοσβήνει με μεγάλη συχνότητα και ο ανιχνευτής του εκπεμπόμενου φθορισμού είναι συντονισμένος με τέτοιο τρόπο που ενισχύει επιλεκτικά αυτήν την τιμή φθορισμού και την καταγράφει. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση του λόγου F_v/F_m . Όλο το σύστημα πηγών και δεκτών ακτινοβολίας εξυπηρετείται μέσω οπτικών ινών. Το συγκεκριμένο φθορισμόμετρο είναι εξοπλισμένο επίσης με «μανταλάκια» (dark leaf clips DLC-8) τα οποία στερεώνονται σε ειδική συσκευή συγκράτησης (leaf clip holder 2030-B) κρατώντας το φωτοσυνθετικό ιστό σε σταθερή ως προς τις οπτικές ίνες θέση κατά τη λήψη των μετρήσεων.

Εικόνα 3.4. Φθορισμόμετρο παλλόμενου παλμού Mini-PAM

Όπως εξηγήθηκε και στην Εισαγωγή, η φωτοχημική απόδοση του PSII υπολογίστηκε ως εξής: $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ (Maxwell & Johnson, 2000).

3.4.2 Φθορισμόμετρο Handy PEA

Οι κινητικές επαγωγής του φθορισμού της χλωροφύλλης σε άθικτα φύλλα που είχαν ισορροπήσει στο σκοτάδι για τουλάχιστον τρεις ώρες

μετρήθηκαν με το φθορισμόμετρο τύπου Handy PEA (Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK) (Εικόνα 3.5). Αυτό το όργανο είναι εφοδιασμένο με πηγή φωτός (LED, 650 nm, 3000 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) και ανιχνευτή φθορισμού που καταγράφει μήκη κύματος μεγαλύτερα των 700 nm ανά χρονικά διαστήματα 10 μs για τα πρώτα 300 μs και προοδευτικά αυξανόμενα διαστήματα μέχρι το 1s. Οι τιμές φθορισμού στα 20 μs (F_0), 2 ms (F_J), 30 ms (F_I) καθώς και αυτή του μέγιστου φθορισμού (F_m) θα αναλυθούν σύμφωνα με το λεγόμενο «JIP-test» (Strasser *et al.*, 1995; Krüger *et al.*, 1997), όπως αυτό βελτιώθηκε πρόσφατα (Tsimilli-Michael & Strasser, 2008) ώστε να συμπεριλάβει αξιολόγηση γεγονότων που λαμβάνουν χώρα όχι μόνο στο PSII αλλά και γύρω από το PSI. Η μαθηματική ανάλυση του JIP-test ακολουθεί αμέσως πιο κάτω.

Εικόνα 3.5. Συνεχές φθορισμόμετρο τύπου Handy PEA

JIP-test

Συνήθως σε μετρήσεις φθορισμού της χλωροφύλλης, ο δείκτης που υπολογίζεται είναι η φωτοχημική απόδοση του PSII ως η αναλογία των παγιδευθέντων προς τα απορροφηθέντα φωτόνια. Στηρίζεται στη μέτρηση του φθορισμού σε δύο ακραίες καταστάσεις της φωτοσυνθετικής συσκευής, όταν δηλαδή τα ενεργά κέντρα του PSII είναι όλα «ανοιχτά» (ελάχιστος

φθορισμός, F_0) ή όταν είναι όλα «κλειστά» (μέγιστος φθορισμός, F_m). Στο κεφάλαιο της Εισαγωγής και συγκεκριμένα στο υποκεφάλαιο Φθορισμός της χλωροφύλλης, παρουσιάζεται αναλυτικά ο τρόπος υπολογισμού της φωτοχημικής απόδοσης του PSII. Υγιή φυτά, με άριστη απόδοση, έχουν F_v/F_m που κυμαίνεται μεταξύ 0,80 και 0,85. Τιμές κάτω από αυτό το όριο υποδεικνύουν το βαθμό χρόνιας φωτοαναστολής της φωτοσύνθεσης.

Ωστόσο, η κινητική επαγωγής του φθορισμού της χλωροφύλλης από το F_0 έως το F_m είναι ιδιαίτερα περίπλοκη και χαρακτηρίζεται από διακριτές φάσεις που ήδη αναφέρθηκαν στην Εισαγωγή. Οι κινητικές επαγωγής του φθορισμού με την κατάλληλη μαθηματική επεξεργασία (Strasser *et al.*, 2004; Papageorgiou *et al.*, 2007; Tsimilli-Michael & Strasser, 2008) προτείνουν το δείκτη φωτοσυνθετικής ικανότητας με μεγάλη ευαισθησία PI_{total} αντί του παραδοσιακού $(F_m-F_0)/F_m$ καθώς και μια σειρά από άλλους δείκτες που εκφράζουν τα πιθανά περιοριστικά στάδια σε κάθε φάση της γραμμικής ροή ενέργειας και ηλεκτρονίων της φωτοσύνθεσης.

Αν η κλασική καμπύλη των Kautsky και Hirsch (1931), παρουσιαστεί σε λογαριθμική κλίμακα χρόνου, τότε αποκαλύπτεται η πολυφασική της φύση (φάσεις O-J-I-P, Strasser *et al.*, 2004) (Σχήμα 3.1). Η κάθε φάση της OJIP καμπύλης προσφέρει ξεχωριστή πληροφορία για τη ροή ενέργειας και ηλεκτρονίων σε κάθε σημείο της φωτοσυνθετικής λειτουργίας.

Σχήμα 3.1. Τοπική καμπύλη Kautsky σε λογαριθμισμένη κλίμακα χρόνου. Στα ένθετα εμφανίζεται η ίδια καμπύλη εκφραζόμενη σε διαφορετικές γραμμικές κλίμακες χρόνου μέχρι: a) τα 120 s, b) τα 0,2 s και c) τα 0,02 s (Strasser *et al.*, 2004).

Μετά από την πρώτη ακαριαία αύξηση του φθορισμού από το σημείο O (συνήθως στα 20 μ s) μέχρι το J που παρουσιάζεται ως το πρώτο πλάτωμα της καμπύλης (στα 2 ms), ακολουθεί περαιτέρω αύξηση του φθορισμού μέχρι το δεύτερο πλάτωμα στο λεγόμενο σημείο I (στα 30 ms). Το σημείο P (στα 400 - 600 ms) ορίζεται στο ανώτερο σημείο της καμπύλης και φέρει τη μέγιστη τιμή φθορισμού. Συγκεκριμένα, η πρώτη φάση O-J αφορά την αναγωγή της κινόνης A (Q_A), πρωτογενούς δέκτη ηλεκτρονίων. Η άνοδος του φθορισμού που ακολουθεί από το σημείο J μέχρι το I αφορά την αναγωγή των ενδιάμεσων φορέων ηλεκτρονίων (αποθέματα πλαστοκινόνης- Q) (Tóth *et al.*,

2007). Η τελευταία φάση αυτής της καμπύλης (I-P) σχετίζεται με γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στην αναγωγική πλευρά του PSI (Munday & Govindjee, 1969; Schansker *et al.*, 2005). Η πληροφορία που παρέχεται στην τελευταία αυτή φάση της OJIP καμπύλης, όπως γίνεται αντιληπτό έχει ιδιαίτερη σημασία αφού κατά αυτόν τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα μελέτης των δραστηριοτήτων των PSI και PSII ξεχωριστά. Αυτή η πληροφορία που παρέχει το JIP-test βοήθησε στην εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων στην παρούσα διατριβή και συγκεκριμένα στο κομμάτι εργασιών που αφορούσε την ενεργότητα των δύο φωτοσυστημάτων στο σχίνο υπό συνθήκες διακυμαινόμενης συγκέντρωσης αζώτου (βλέπε Αποτελέσματα).

Με βάση το JIP-test, όλες οι πιο πάνω τιμές φθορισμού χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή πολλών και χρήσιμων παραμέτρων της φωτοσύνθεσης (Strasser *et al.*, 2004). Παρακάτω αναλύονται οι βασικές τιμές του φθορισμού καθώς και οι παράμετροι που υπολογίζονται με χρήση αυτών των τιμών εντός μαθηματικών εξισώσεων:

- ♦ F_0 (ή $F_{20\mu s}$), φθορισμός στα 20 μs , αντιστοιχεί στην ένταση φθορισμού όταν θεωρητικώς όλα τα ενεργά κέντρα του PSII (reaction centers- RC) είναι «ανοιχτά»
- ♦ F_m , μέγιστος φθορισμός, αντιστοιχεί στην ένταση φθορισμού όταν θεωρητικώς όλα τα ενεργά κέντρα του PSII (reaction centers- RC) είναι «κλειστά»
- ♦ F_v , $(F_m - F_0)$, μεταβαλλόμενος φθορισμός
- ♦ M_0 , $4 \times (F_{300\mu s} - F_0) / (F_m - F_0)$, αρχική κλίση της καμπύλης επαγωγής του φθορισμού
- ♦ F_J ή I , φθορισμός στα 2 ms ή 30 ms, αντίστοιχα
- ♦ V_J , $(F_{2ms} - F_0) / (F_m - F_0)$, σχετικός φθορισμός στα 2 ms

- ♦ $V_L, (F_{30\text{ ms}} - F_0)/(F_m - F_0)$, σχετικός φθορισμός στα 30 ms

Απόδοση ηλεκτρονίων ή ρυθμός ροής ηλεκτρονίων

- ♦ ϕ_{P_0} ή TR_0/ABS , $F_v/F_m = 1 - F_0/F_m$, η μέγιστη ανά φωτόνιο απόδοση της πρωτογενούς φωτοχημείας (όπου TR και ABS η παγιδευμένη και η απορροφούμενη ενέργεια, αντίστοιχα)
- ♦ ψ_{E_0} ή ET_0/TR_0 , $1 - V_J = (F_m - F_J)/(F_m - F_0)$, η πιθανότητα διατήρησης της παγιδευμένης ενέργειας ως ροή ηλεκτρονίων
- ♦ ϕ_{E_0} ή ET_0/ABS , $\phi_{P_0} \times \psi_{E_0} = 1 - F_J/F_m$, η ανά φωτόνιο απόδοση της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το PSII στους ενδιάμεσους φορείς ηλεκτρονίων (όπου ET η ροή ηλεκτρονίων)
- ♦ δ_{R_0} , $(1 - V_I)/(1 - V_J) = (F_m - F_I)/(F_m - F_J)$, η πιθανότητα της μεταφοράς ηλεκτρονίων από τους ενδιάμεσους φορείς στους τελικούς αποδέκτες διαμέσου του PSI
- ♦ ϕ_{R_0} , $\phi_{P_0} \times \psi_{E_0} \times \delta_{R_0} = 1 - F_I/F_m$, η ανά φωτόνιο απόδοση της αναγωγής των τελικών αποδεκτών ηλεκτρονίων του PSI

Παράμετρος που σχετίζεται με γεγονότα εντός ή περί του PSI

- ♦ $1/V_L$, σχετικό απόθεμα των τελικών αποδεκτών του PSI

Δείκτης φωτοσυνθετικής απόδοσης

- ♦ PI_{total} , $RC/ABS \times \phi_{P_0}/(1 - \phi_{P_0}) \times \psi_{E_0}/(1 - \psi_{E_0}) \times \delta_{R_0}/(1 - \delta_{R_0})$, όπου RC/ABS η πυκνότητα των ενεργών κέντρων του PSII, ϕ_{P_0} η κβαντική απόδοση της σύλληψης φωτονίων, ψ_{E_0} η απόδοση της ροής παγιδευμένων ηλεκτρονίων από το PSII προς τους ενδιάμεσους φορείς και δ_{R_0} η απόδοση της ροής ηλεκτρονίων από τους ενδιάμεσους φορείς προς τους τελικούς αποδέκτες (NADPH) δια μέσου του PSI. Ο δείκτης

υπό κανονικές συνθήκες είναι ανάλογος της φωτοσυνθετικής αφομοίωσης CO₂ (van Heerden *et al.*, 2003).

3.4.3 Αναλυτής αερίων Li-6400

Μέτρηση φωτοσύνθεσης υπό ρεαλιστικές συνθήκες πεδίου

Εκτός από μετρήσεις φθορισμού της χλωροφύλλης για την εκτίμηση φωτοσυνθετικών παραμέτρων, πραγματοποιήθηκαν και άμεσες μετρήσεις της φωτοσύνθεσης σε ρεαλιστικές συνθήκες πεδίου στο είδος *P. lentiscus*. Αυτές έγιναν με αναλυτή αερίων διά υπέρυθρου ακτινοβολίας (infrared gas analyser- IRGA) τύπου Li-6400 (Li-cor, Lincoln, Ne, USA) (Εικόνα 3.6).

Εικόνα 3.6. Φορητός αναλυτής αερίων Li-6400 εξοπλισμένος με σύστημα ρύθμισης του CO₂

Όπως φαίνεται αναλυτικά και στην πιο κάτω σχηματική αναπαράσταση του συστήματος λειτουργίας του συγκεκριμένου αναλυτή αερίων πρόκειται για ένα «ανοικτό» σύστημα ροής αερίων (Εικόνα 3.7).

Εικόνα 3.7. Σχηματική αναπαράσταση τρόπου λειτουργίας του αναλυτή αερίων LI-6400, εξοπλισμένου με σύστημα ρύθμισης του CO₂ (6400-01) (Manual: *Using the LI-6400, Portable photosynthesis system, Version 5, LI-COR Biosciences*).

Αρχικά, ο ατμοσφαιρικός αέρας εισέρχεται στο σύστημα από οπή που βρίσκεται στη βάση του συστήματος. Ακολούθως διοχετεύεται προς τα δύο εξωτερικά φίλτρα-κύλινδρους που διαθέτει ο αναλυτής. Η ροή του αέρα στο κάθε ένα από αυτά ελέγχεται με ειδικές βαλβίδες που διευθετούνται στην είσοδο των φίλτρων. Το πρώτο φίλτρο στο οποίο διέρχεται ο αέρας ρυθμίζει τα επίπεδα CO₂ του διερχόμενου αέρα με τη βοήθεια φίλτρου CO₂ (CO₂ scrubber) και μετέπειτα, ο αέρας διέρχεται και από δεύτερο φίλτρο που περιέχει ξηραντικό υλικό (desiccant) που ελέγχει την υγρασία του αέρα. Η συνεχής ροή του αέρα στο σύστημα επιτυγχάνεται με εσωτερική αντλία που φέρει ο μετρητής και καταγράφεται διαρκώς με ειδικό ροόμετρο. Ο αέρας αφού διέλθει και από τα δύο φίλτρα, διοχετεύεται στο εσωτερικό του συστήματος και ακολούθως οδηγείται προς τον εξωτερικό θάλαμο αναφοράς (reference chamber). Ο τελευταίος, επικοινωνεί με το θάλαμο όπου πρόκειται να εγκλωβιστεί ο φωτοσυνθετικός ιστός-δείγμα (sample chamber) για να μετρηθεί η φωτοσυνθετική του δραστηριότητα. Αφού γίνει μηδενισμός έτσι ώστε να επιτευχθεί η απόλυτη ποιοτική εξίσωση του εγκλωβισμένου αέρα ανάμεσα στους δύο θαλάμους, στο θάλαμο του δείγματος τοποθετείται ο προς μέτρηση φωτοσυνθετικός ιστός. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση

μεταβολής στην αρχική αναλογία αναφοράς του CO₂ στο θάλαμο λόγω του ότι ο ιστός αναπνέει και φωτοσυνθέτει ταυτόχρονα όταν δέχεται φως. Αυτή η αλλαγή καταγράφεται και ακολούθως συγκρίνεται με την τιμή του CO₂ του θαλάμου αναφοράς που διατηρείται σταθερή. Με πολύπλοκες μαθηματικές εξισώσεις ο αναλυτής αερίων υπολογίζει μέσω αυτής της διαφοράς σειρά από παραμέτρους όπως:

- ♦ ο ρυθμός αφομοίωσης του CO₂ (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$),
- ♦ η αγωγιμότητα των στομάτων (g_s , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$),
- ♦ η διαπνοή (T , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$),
- ♦ η υποστοματία συγκέντρωση του CO₂ (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$) και
- ♦ η παράμετρος Water Use Efficiency (WUE, λόγος A/T).

Όπως γίνεται αντιληπτό μπορεί να προσδιοριστεί ο ρυθμός αναπνοής μέσω της μέτρησης του φωτοσυνθετικού ιστού υπό συνθήκες σκότους (dark respiration). Σε αυτήν την περίπτωση η φωτοσύνθεση είναι μηδενική αφού ο φυτικός ιστός μόνο αναπνέει. Εάν ακολούθως μετρηθεί η φαινόμενη-καθαρή φωτοσύνθεση (net photosynthesis) σε φως, μπορεί να υπολογιστεί και η πραγματική-ολική φωτοσύνθεση (gross photosynthesis). Η τιμή της τελευταίας θα είναι το άθροισμα της μετρούμενης φωτοσύνθεσης στο φως και της αντίστοιχης τιμής που λήφθηκε υπό συνθήκες σκότους, δηλαδή της αναπνοής.

Εκτός των πιο πάνω δυνατοτήτων μέτρησης, ο αναλυτής αερίων καταγράφει ανά πάσα στιγμή την τιμή της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος αέρα (T_{air}) και του φύλλου (T_{leaf}). Επίσης, καταγράφει τη συγκέντρωση του CO₂ και το ποσοστό της υγρασίας του αέρα που εσωκλείεται στους δύο θαλάμους. Είναι εξοπλισμένος με ανεμιστήρα που επιτρέπει τη λήψη μετρήσεων υπό καθορισμένη τιμή θερμοκρασίας στο φύλλο. Φέρει σειρά από διαφορετικές κεφαλές μέτρησης οι οποίες είναι εξοπλισμένες με λαμπτήρες LED παρέχοντας τη δυνατότητα στον χρήστη να καθορίζει τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά το φως που δέχεται ο προς μέτρηση φωτοσυνθετικός ιστός. Η

συγκέντρωση του CO₂ στους θαλάμους του αναλυτή μπορούν να πάρουν τιμές από 0 - 2100 ppm. Αυτό επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του συστήματος ρύθμισης του CO₂ (6400-01). Αυτό το σύστημα λειτουργεί μέσω κάψουλας συμπιεσμένου CO₂ που ενώνεται στο σύστημα και είναι σε θέση να παρέχει διάφορες συγκεντρώσεις CO₂ στον υπό μέτρηση ιστό (Εικόνα 3.7). Οι κλιμακωτές αυτές συγκεντρώσεις CO₂ στο θάλαμο (C_A) ανά τακτά χρονικά βήματα (3 min) παρέχουν τη δυνατότητα παρακολούθησης της απόκρισης του φωτοσυνθετικού ιστού ανά διαφορετικό περιβάλλον συγκέντρωσης CO₂. Αυτή η πληροφορία μπορεί μετέπειτα να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή των λεγόμενων καμπυλών A/Ci, οι οποίες δίνουν πληροφορίες για τους τυχόν περιορισμούς που μπορεί να θέτουν στη φωτοσύνθεση η ικανότητα καρβοξυλίωσης (carboxylation efficiency- CE) και τα στόματα (stomatal limitation- I). Η καμπύλη A/Ci έχει μορφή υπερβολής, όπου στην αρχή της οι δύο παράμετροι αυξάνονται γραμμικά, και στη συνέχεια ακολουθεί κύρτωμα μέχρι μιας μέγιστης τιμής για τη μεταβλητή A, όπου παρατηρείται πλάτωμα στην καμπύλη. Η κλίση της νοητής εφαπτομένης στο πρώτο τμήμα αυτής της καμπύλης περιγράφει την CE. Η παράμετρος I ορίζεται σύμφωνα με την εξής εξίσωση:

$$I=(A_o-A)/A_o$$

Όπου A_o και A ο ρυθμός αφομοίωσης του CO₂ απουσία και παρουσία στοματικών περιορισμών (Farquhar *et al.*, 1980). Η τιμή A χρησιμοποιείται όπως καταγράφηκε κατά τη μέτρηση και αναφέρεται στην τιμή της φωτοσύνθεσης του φύλλου όταν του διοχετεύτηκαν από τον εξωτερικό αέρα 400ppm CO₂ (C_A = 400ppm, δηλαδή παρουσία στοματικών περιορισμών) ενώ η τιμή A_o υπολογίζεται με τη βοήθεια της καμπύλης A/Ci. Η A_o ορίζεται από το σημείο τομής του κατακόρυφου άξονα με την κάθετη σε αυτόν νοητή ευθεία, που τέμνει την καμπύλη A/Ci στο σημείο όπου το Ci = 400ppm (δηλαδή η τιμή της φωτοσύνθεσης στην περίπτωση που τα φύλλα δεν είχαν επιδερμίδα και, κατά συνέπεια, δεν υπήρχε στοματικός περιορισμός).

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε ο αναλυτής αερίων τύπου Li-6400 (Li-cor, Lincoln, Ne, USA) τόσο για μετρήσεις απλής φωτοσύνθεσης όσο και για μετρήσεις φωτοσύνθεσης υπό σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση CO₂ υπό ρεαλιστικές συνθήκες πεδίου. Επειδή οι μετρήσεις έγιναν με πειραματόφυτο το σχίνο του οποίου τα φύλλα έχουν μικρή επιφάνεια χρησιμοποιήθηκε ο θάλαμος Arabidopsis (6400-15 Arabidopsis Chamber) (Εικόνα 4.8). Οι μετρήσεις έγιναν υπό συνθήκες φυσικού φωτισμού κατά τη διάρκεια ανέφελων ημερών, με την ένταση του φωτός να προκαλεί κορεσμό στη φωτοσυνθετική συσκευή των φύλλων (PAR 1400-1600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Εικόνα 3.8. Κεφαλή μέτρησης του αναλυτή Li-6400 με προσαρμοσμένο το θάλαμο Arabidopsis (6400-15 Arabidopsis Chamber)

3.5 Σχετικό περιεχόμενο φύλλων σε άζωτο

Ο προσδιορισμός του αζώτου που εμπεριέχεται στα φύλλα του είδους *P. lentiscus* έγινε με τη μέθοδο απόσταξης Kjeldahl (Allen, 1989; Horneck & Miller, 1998). Η ανάλυση αυτής της μεθόδου ακολουθεί αμέσως πιο κάτω.

Μέθοδος απόσταξης Kjeldahl

Αρχικά ο φυτικός ιστός (δείγμα) αφυδατώνεται σε κλίβανο, λειοτριβείται, ομογενοποιείται και εν τέλει αποθηκεύεται σε ξηραντήρα. Ακολουθεί η καύση ποσότητας του δείγματος σε φιάλη micro-Kjeldahl.

Στη συνέχεια γίνεται υγροποίηση του δείγματος, με πυκνό H_2SO_4 και ομογενοποιημένο μίγμα καταλύτη (1 g CuSO_4 , 8 g K_2SO_4 και 1 g SeO_2). Στη φάση αυτή όλο το οργανικό άζωτο του ιστού λόγω του όξινου περιβάλλοντος που δημιουργείται μετατρέπεται στη μορφή NH_4^+ . Ακολουθεί θέρμανση στους 410°C και κατά αυτόν τον τρόπο πραγματοποιείται οξείδωση του οργανικού φυτικού υλικού με αποτέλεσμα το άζωτο (πλην αυτού που βρίσκεται υπό μορφή νιτρικών ιόντων) να μετατρέπεται σε αμμωνία (NH_3) και αυτή μετέπειτα σε θειικό αμμώνιο ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

Το προϊόν της καύσης μεταφέρεται σε κυλινδρική φιάλη τύπου Kjeldahl όπου του προστίθεται NaOH 40% w/v και με τη βοήθεια αποστακτήρα, ξεκινά η διαδικασία της απόσταξης κατά την οποία το $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ που παράγεται στην κυλινδρική φιάλη kjeldahl διασπάται όταν βρεθεί σε αλκαλικό περιβάλλον, με αποτέλεσμα την παραγωγή πτητικής NH_3 . Η τελευταία διαβιβάζεται στην κωνική φιάλη που περιέχει διάλυμα του βορικού οξέος όπου και δεσμεύεται σχηματίζοντας βορικό αμμώνιο.

Τέλος, γίνεται τιτλοδότηση των δειγμάτων με HCL N/28. Το σημείο εξουδετέρωσης ορίζεται μέσω αλλαγής του δείκτη Conway από ανοικτό πράσινο σε ροζ χρώμα. Μετέπειτα γίνεται ο μαθηματικός υπολογισμός της συγκέντρωσης του περιεχομένου στα φύλλα αζώτου με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης.

3.6 Περιοχές δειγματοληψίας και πειραματικό υλικό

Παρακάτω, αναλύονται οι περιοχές όπου έγιναν οι δειγματοληψίες των φύλλων καθώς και τα φυτικά είδη που αποτέλεσαν τα πειραματόφυτα της

παρούσας διατριβής. Αυτή η ανάλυση χωρίζεται ανάλογα με την πειραματική προσέγγιση που έγινε την κάθε φορά.

3.6.1 Διακυμαινόμενη ασυμμετρία

Για κάθε φυτικό είδος που εξετάστηκε συλλέχτηκαν εκατοντάδες φύλλα από τουλάχιστον 10 άτομα στην περιοχή της Πανεπιστημιούπολης Πατρών (38°18'N, 21°47'E) κατά τις μεσημβρινές ώρες (11:00 - 14:00) των πιο καταπονητικών εποχών του χρόνου (καλοκαίρι και χειμώνας) για τα μεσογειακά φυτά. Οι δειγματοληψίες φύλλων κάποιων ειδών έγιναν το 2008 και άλλων το 2009. Αφού συλλέχθηκαν, μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο όπου και σαρώθηκαν και ακολούθως υπολογίστηκε η ασυμμετρία τους.

Στον Πίνακα 3.2 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα φυτικά είδη στα οποία εντοπίστηκε τυχαία ασυμμετρία στα φύλλα τους. Τα είδη αυτά εξετάστηκαν περαιτέρω ως προς τη φωτοσυνθετική τους ικανότητα με μετρήσεις φθορισμού της χλωροφύλλης που έγιναν με τη βοήθεια του φθορισμόμετρου Handy PEA. Εκατοντάδες φύλλα συλλέχθηκαν από το πεδίο και τοποθετήθηκαν σε πλαστικά αεροστεγή σακουλάκια μαζί με βρεγμένο διηθητικό χαρτί για όλο το βράδυ (overnight). Ακολούθως, σε κάθε φύλλο ελήφθησαν 2 μετρήσεις φθορισμού χλωροφύλλης σε δύο σημεία εκατέρωθεν του κεντρικού νεύρου. Η τιμή φθορισμού ανά φύλλο προέκυψε από τη μέση τιμή αυτών των δύο μετρήσεων. Με μαθηματικό τρόπο μέσω του JIP-test υπολογίστηκε η παράμετρος PI_{total} και έγινε προσπάθεια να εξεταστεί η συσχέτιση αυτής αλλά και του παραδοσιακού δείκτη F_v/F_m με τον βαθμό της τυχαίας ασυμμετρίας των φύλλων.

<i>Arbutus unedo</i>	<i>Pistacia lentiscus</i>
<i>Ceratonia siliqua</i>	<i>Platanus orientalis</i>
<i>Cercis siliquastrum</i>	<i>Populus alba</i>
<i>Olea europea</i>	

Πίνακας 3.2. Είδη τα οποία φέρουν διακυμαινόμενη ασυμμετρία

Τα υπόλοιπα φυτικά είδη που παρουσιάστηκαν στον Πίνακα 3.1 και απουσιάζουν από τον παραπάνω πίνακα έφεραν κατευθυνόμενη ασυμμετρία στα φύλλα τους και δεν εξετάστηκαν περαιτέρω.

3.6.2 *Pistacia lentiscus*

α) Ένταση χειμερινής ερυθρότητας και φωτοχημική απόδοση του PSII (κίνδυνος φωτοαναστολής)

Όσον αφορά το πρώτο κομμάτι εργασιών με το σχίνο, μελετήθηκε ένας καλά εδραιωμένος πληθυσμός στην παραλιακή περιοχή Καλόγρια της Δυτικής Πελοποννήσου (38°09'N, 21°22'E, 3 m a.s.l.). Κατά τη δειγματοληψία αποφεύχθηκε η λήψη «ελαττωματικών» φύλλων (προσβεβλημένα από έντομα ή παθογόνους μικροοργανισμούς). Στο σχίνο τα φύλλα διατηρούνται επί του φυτού για διάστημα 2 - 3 ετών, με τα γερασμένα φύλλα να πέφτουν στο τέλος της άνοιξης/αρχές καλοκαιριού (Orshan, 1989). Επιλέχθηκαν ώριμα φύλλα ηλικίας 1 - 1,5 έτους και κατά αυτόν τον τρόπο αποφεύχθηκε η λήψη γερασμένων ή ανώριμων φύλλων. Η ερυθρότητα των φύλλων παρατηρείται κατά τους χειμερινούς μήνες και διατηρείται μέχρι και την αρχή της άνοιξης. Αυτή η ερυθρότητα είναι ορατή δια γυμνού οφθαλμού και εμφανίζεται σε ορισμένα μόνο άτομα των πληθυσμών του σχίνου ενώ την ίδια στιγμή γειτονικά τους άτομα (υπό ίδια έκθεση και σύσταση εδάφους) παραμένουν πράσινα. Η ένταση της ερυθρότητας διαφέρει τόσο από άτομο σε άτομο όσο και μεταξύ των ερυθρών φύλλων του ίδιου ατόμου. Στο τέλος Φεβρουαρίου (24/02) του 2007 μαρκαρίστηκαν 43 άτομα πράσινου και 19 κόκκινου φαινότυπου σχίνου και ακολούθως έγινε δειγματοληψία 4 φύλλων από κάθε άτομο (συνολικά 248 φύλλα). Τα φύλλα από κάθε θάμνο τοποθετήθηκαν ξεχωριστά σε αεροστεγή πλαστικά σακουλάκια που περιείχαν βρεγμένο διηθητικό χαρτί και μεταφέρθηκαν υπό συνθήκες σκότους στο εργαστήριο. Εφόσον είχαν συμπληρώσει τουλάχιστον 3 ώρες παραμονής στο σκοτάδι, ελήφθησαν μετρήσεις φθορισμού της χλωροφύλλης, δύο ανά φύλλο (μία δεξιά

και μία αριστερά του κεντρικού νεύρου). Οι μετρήσεις φθορισμού έγιναν με φθορισμόμετρο τύπου Mini-PAM (Walz, Effeltrich, Germany). Επίσης, στα ίδια δύο σημεία κάθε φύλλου μετρήθηκε η ανακλαστικότητα στο φάσμα 400 - 1100 nm (ορατό-κοντινό υπέρυθρο φως) με τη βοήθεια ειδικού φασματο-ανακλασίμετρου (UniSpec, PP Systems, Haverhill, MA, USA). Για κάθε φυτικό άτομο ελήφθησαν 8 τιμές ανακλαστικότητας ($N = 2 \times 4 = 8$).

Στο τέλος του χειμώνα της επόμενης χρονιάς (Φεβρουάριος 2008) έγινε επίσκεψη ξανά στην ίδια περιοχή και με τυχαίο τρόπο επιλέχθηκαν 12 άτομα (6 πράσινα και 6 κόκκινα) από ένα σύνολο 62 ατόμων που μαρκαρίστηκαν την περασμένη χρονιά. Ουσιαστικά, με το πιο πάνω επαναληπτικό πείραμα επιχειρήθηκε η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν την ίδια εποχή του 2007. Μια τρίτη επίσκεψη πραγματοποιήθηκε στα μέσα φθινοπώρου του (Οκτώβριος) 2008, κατά τη λεγόμενη «πράσινη» περίοδο του έτους. Η περίοδος παίρνει αυτόν το χαρακτηρισμό λόγω του ότι όλα τα άτομα τότε φέρουν πράσινο χρώμα στα φύλλα τους με την ερυθρότητα να μην είναι πλέον ορατή. Σε αυτήν τη δειγματοληψία επιλέχθηκαν τα ίδια 12 άτομα που εξετάστηκαν το χειμώνα του 2008 και επανεξετάστηκε η φωτοσυνθετική τους κατάσταση με στόχο να αποκαλυφθεί η φωτοσυνθετική τους συμπεριφορά κατά την ευνοϊκή-«πράσινη» περίοδο του έτους.

Στατιστική ανάλυση

Στο συγκεκριμένο κομμάτι εργασιών χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS (v.15.0 statistical package) τόσο στον έλεγχο των παραμέτρων που μελετήθηκαν όσο και στην εξαγωγή των συσχετίσεων που προέκυψαν. Όπου χρειάστηκε να εξεταστούν τυχόν διαφορές μεταξύ των δύο φαινοτύπων, τόσο κατά την «κόκκινη» όσο και κατά την «πράσινη» περίοδο του χρόνου, αυτές ελέγχθηκαν στατιστικά με μονόδρομη ανάλυση διασποράς (one-way ANOVA) με τη χρήση του ίδιου στατιστικού πακέτου.

β) Επίπεδα αζώτου, ικανότητα καρβοξυλίωσης και φωτοσύνθεση στον ερυθρό και τον πράσινο φαινότυπο

Χρησιμοποιήθηκε φυσικός πληθυσμός σχίνου στην περιοχή της Πανεπιστημιούπολης Πατρών (38°18'N, 21°47'E). Τα άτομα που μελετήθηκαν έφεραν τον ίδιο προσανατολισμό και εκτίθεντο πλήρως στο ηλιακό φως. Ελήφθησαν μετρήσεις απλής φωτοσύνθεσης (ρυθμός αφομοίωσης CO₂- A, αγωγιμότητα στομάτων- g_s) με τη βοήθεια του αναλυτή αερίων Li-6400 σε νότιας έκθεσης φύλλα ερυθρού και πράσινου φαινότυπου. Οι μετρήσεις έγιναν κατά τη διάρκεια ημερών με πλήρη ηλιοφάνεια (PAR 1400 - 1600 μmol⁻²s⁻¹), υπό θερμοκρασία και συγκέντρωση CO₂ (400 ppm) περιβάλλοντος. Λόγω του μικρού μεγέθους των φύλλων του σχίνου χρησιμοποιήθηκε ο θάλαμος Arabidopsis (6400 - 15 Arabidopsis Chamber). Οι μετρήσεις έγιναν σε πέντε διαφορετικές ημερομηνίες του 2010, στην αρχή (02/03), στα μέσα (17/03) και στο τέλος (27/03) Μαρτίου, μία στα μέσα Ιουνίου (14/06) και μία στο τέλος Οκτωβρίου (24/10). Σε κάθε εποχή (άνοιξη, καλοκαίρι, φθινόπωρο) μετρήθηκαν 3 φύλλα ανά άτομο από συνολικά 20 μαρκαρισμένα άτομα (10 ερυθρά και 10 πράσινα). Οι μετρήσεις που έγιναν στην αρχή της άνοιξης αντιπροσωπεύουν την «ερυθρή» περίοδο ενώ αυτές του καλοκαιριού και του φθινοπώρου την «πράσινη». Όλες οι μετρήσεις λήφθηκαν υπό θερμοκρασία περιβάλλοντος για την κάθε εποχή. Στο τέλος του Μάρτη (27/03) έγιναν επικουρικά μετρήσεις για αποτίμηση της σχέσης μεταξύ αφομοίωσης του CO₂ (A) με τη συγκέντρωση του CO₂ στον υποστομάτιο χώρο των φύλλων (Ci). Αυτό επιτεύχθηκε με τη βοήθεια συστήματος ρύθμισης του CO₂ (6400-01) που προσαρμόστηκε στον αναλυτή αερίων Li-6400. Σε δέκα προκαθορισμένα βήματα (ανά 3 min) αυξανόμενης συγκέντρωσης CO₂ στο εύρος 100 - 2100 ppm, έγιναν μετρήσεις φωτοσύνθεσης σε 15 φύλλα (8 από ερυθρά και 7 από πράσινα άτομα) υπό θερμοκρασία περιβάλλοντος (23,1 ± 1,7°C). Οι τιμές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή καμπυλών A/Ci, μέσω των οποίων επιτεύχθη η εκτίμηση των περιορισμών που θέτουν τα στόματα (I) αλλά και η ικανότητα καρβοξυλίωσης (CE) στη φωτοσύνθεση. Ο τρόπος υπολογισμού των πιο πάνω αναφέρεται αναλυτικά στην ενότητα των Αποτελεσμάτων. Τέλος, σε τρεις ημερομηνίες (μέσα Μαρτίου, μέσα Ιουνίου

και τέλος Οκτωβρίου), τα φύλλα που συλλέχτηκαν εξετάστηκαν περαιτέρω ως προς το περιεχόμενο τους σε άζωτο με τη μέθοδο απόσταξης Kjeldahl (βλέπε υποκεφάλαιο 4.5).

Στατιστική ανάλυση

Όλα τα αποτελέσματα που προέκυψαν σε αυτήν τη φάση εργασιών ελέχθησαν τόσο ως προς την κανονικότητα (Kolmogorov-Smirnov statistic) όσο και ως προς την ομοιογένεια των διασπορών τους (Levene's statistic). Σε κάποιες παραμέτρους κρίθηκε σκόπιμο να γίνει λογαριθμικός μετασχηματισμός μετρήσεων έτσι ώστε να επιτευχθεί η κανονικότητα και η ομοιογένειά τους. Οι διαφορές των παραμέτρων μεταξύ πράσινων και ερυθρών φαινοτύπων εξετάστηκαν με one-way ANOVA. Όλες οι στατιστικές ανάλυσης έγιναν με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου SPSS (v.15.0 statistical package).

γ) Ενδείξεις για επιλεκτική επίδραση του ελλείμματος αζώτου των φύλλων στην ενεργότητα του φωτοσυστήματος I (PSI)

Στο τρίτο και τελευταίο κομμάτι εργασιών με πειραματόφυτο το *P. lentiscus* εξετάστηκε η επίδραση της έλλειψης αζώτου στη φωτοσύνθεση των φύλλων και πώς αυτό το έλλειμμα επιδρά στις λεγόμενες φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης υπό φυσιολογικές συνθήκες πεδίου. Η παρούσα μελέτη εκμεταλλεύτηκε τις φυσιολογικές διακυμάνσεις του αζώτου ώριμων φύλλων του *P. lentiscus*, οι οποίες μετρήθηκαν με τη μέθοδο απόσταξης Kjeldahl. Αυτές συνδυάστηκαν με την ανάλυση των αντίστοιχων καμπυλών ταχείας ανόδου του φθορισμού της χλωροφύλλης (JIP-test) κατά τη διάρκεια αιφνίδιου φωτισμού υλικού που είχε εκ των προτέρων εξισορροπήσει στο σκοτάδι (overnight) (Strasser *et al.*, 2004; Tsimilli-Michael & Strasser, 2008; Stirbet & Govindjee, 2011). Κατά αυτόν τον τρόπο έγινε εφικτή η εκτίμηση της εν δυνάμει δραστηριότητας και των δύο φωτοσυστημάτων.

Ο πληθυσμός μελέτης αυτής της εργασίας εντοπίζεται στην περιοχή της Πανεπιστημιούπολης Πατρών (38°18'N, 21°47'E). Σε αυτήν μαρκαρίστηκαν 10 άτομα σχίνου και ακολούθησε δειγματοληψία φύλλων σε δύο εποχές: μια στο τέλος του χειμώνα (25/02) και μια στα μέσα του φθινοπώρου (24/10) του 2010. Οι δειγματοληψίες έγιναν τις μεσημβρινές ώρες σε ημέρες με πλήρη ηλιοφάνεια (2 φύλλα/άτομο τον Φλεβάρη και 5 φύλλα/άτομο τον Οκτώβριο). Τα συλλεχθέντα φύλλα αποθηκεύτηκαν χωριστά σε αεροστεγή πλαστικά σακουλάκια που περιείχαν βρεγμένο διηθητικό χαρτί και εν συνεχεία μεταφέρθηκαν υπό συνθήκες σκότους στο εργαστήριο. Τα φύλλα παρέμειναν για όλο το βράδυ (overnight) σε συνθήκες σκότους και ακολούθως μετρήθηκε ο φθορισμός της χλωροφύλλης σε δύο σημεία ανά φύλλο, ένα δεξιά και ένα αριστερά του κεντρικού νεύρου. Η λήψη αυτών των μετρήσεων έγινε με τη βοήθεια του φθορισμόμετρου Handy PEA (Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK). Η μέση τιμή φθορισμού που προέκυψε από αυτές τις δύο μετρήσεις σε κάθε φύλλο, συσχετίστηκε ακολούθως με το περιεχόμενό του σε άζωτο.

Στατιστική ανάλυση

Το στατιστικό πακέτο SPSS (v.15.0 statistical package) χρησιμοποιήθηκε για άλλη μια φορά για την εξαγωγή συσχετίσεων μεταξύ μιας σειράς παραμέτρων του JIP-test και του περιεχομένου στα αντίστοιχα φύλλα αζώτου. Οι διαφορές μεταξύ των παραμέτρων που μετρήθηκαν στις δύο εποχές, ελέγχθησαν στατιστικά με one-way ANOVA με τη βοήθεια του ίδιου στατιστικού πακέτου.

3.6.3 Cistus creticus

3.6.3.1 Ανθοκυανίνες και αρμοστικότητα στην περιβαλλοντική καταπόνηση

Ακόμη ένα φυτικό είδος χαρακτηριστικό του Μεσογειακού χώρου είναι το *Cistus creticus*. Πρόκειται για είδος που φέρει σειρά πλεονεκτημάτων που το καθιστούν ιδανικό πειραματόφυτο για τη διερεύνηση των ερωτημάτων της

παρούσας διατριβής. Παρουσιάζει, εποχιακή ερυθρότητα στα φύλλα του λόγω συσσώρευσης ανθοκυανινών καθώς και εφήμερα άνθη την άνοιξη. Η παρούσα διατριβή εκμεταλλεύτηκε το τελευταίο του χαρακτηριστικό για να προσεγγίσει ερωτήματα που σχετίζονται με την αναπαραγωγική προσπάθεια. Η σημασία του χαρακτηριστικού των εφήμερων ανθέων έγκειται στο γεγονός ότι αφού το κάθε άνθος ολοκληρώνει τον κύκλο ζωής του σε 24 ώρες αποκλείει την επανακαταμέτρησή του ή την ανάγκη μαρκαρίσματος του σε κάθε επίσκεψη του παρατηρητή κατά την τριμηνιαία περίοδο ανθοφορίας.

Η περιοχή μελέτης υπέστη πυρκαγιά το έτος 1989 και σήμερα την υποστηρίζουν οι φυτοκοινωνίες με τα είδη *Cistus creticus*, *Cistus salvifolius* καθώς και κάποια αείφυλλα σκληρόφυλλα είδη και πεύκα. Εντοπίζεται στην περιοχή Πλατανιού Αχαΐας (38.14°N, 21.44°E, 250 m a.s.l.) και πρόκειται για πλευρά λόφου με νότια έκθεση. Το χειμώνα του 2008 μαρκαρίστηκαν 29 άτομα, 15 πράσινα και 14 κόκκινα, με στόχο να εξεταστεί η αναπαραγωγική προσπάθεια και επιτυχία των δύο φαινοτύπων. Οι πιο πάνω πειραματικές εργασίες είχαν ξαναγίνει από τον Βέλη Κυτρίδη, μέλος της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου μας, κατά το έτος 2006. Στην παρούσα διατριβή επαναλήφθηκαν προς επιβεβαίωση αυτών των προηγούμενων αποτελεσμάτων. Επίσης, κατά την ίδια περίοδο εξετάστηκαν από άλλα μέλη του εργαστηρίου μας οι δύο φαινότυποι του *C. creticus* ως προς τη φωτοσυνθετική τους απόδοση, τον σχετικό ρυθμό ανάπτυξης καθώς και ως προς τα επίπεδα των συσσωρευμένων ανθοκυανινών στα ώριμα τους φύλλα. Τα ευρήματα συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα της πράσινης περιόδου του έτους.

3.6.3.2 Μέτρηση αναπαραγωγικών παραμέτρων

Αρχικά μετρήθηκε η αναπαραγωγική προσπάθεια όλων των μαρκαρισμένων ατόμων λαδανιάς ως ο αριθμός των ανθέων ανά άτομο. Θα πρέπει να αναφερθεί πως όλα τα άτομα επιλέχθηκαν έτσι ώστε να έχουν περίπου το ίδιο μέγεθος. Το μέγεθος κάθε θάμνου μετρήθηκε με σκοπό τα

αποτελέσματα που θα προκύψουν να ομαλοποιηθούν και να αποφευχθεί τυχόν σφάλμα στην υπολογιζόμενη τιμή της αναπαραγωγικής προσπάθειας. Τα άνθη του *C. creticus* εμφανίζονται κατά το χάραμα και αργά το απόγευμα, γερασμένα πλέον, αποβάλλονται από την κόμη του θάμνου (Manetas & Petropoulou, 2000). Κατά τις μεσημβρινές ώρες, σε όλη τη διάρκεια της περιόδου ανθοφορίας (τέλος Απρίλη μέχρι αρχές Ιούνη), πραγματοποιήθηκαν επισκέψεις σε σχεδόν καθημερινή βάση στην περιοχή δειγματοληψίας και κάθε φορά καταγραφόταν ο αριθμός των ανθέων που έφερε κάθε άτομο.

Στα μέσα Ιουλίου συλλέχτηκαν όλοι οι καρποί (πεντάχωρες κάψες) από τα μαρκαρισμένα άτομα, αφού πρώτα είχαν φτάσει στην τελική τους ωρίμανση με τον αριθμό τους να καταγράφεται ανά άτομο. Στη συνέχεια απομονώθηκαν τα σπέρματα που περιείχαν οι καρποί. Επιλέχθηκαν, με τυχαίο τρόπο, πενήντα σπέρματα από κάθε άτομο και αφού ζυγίστηκαν υπολογίστηκε η μέση τιμή βάρους σπέρματος. Έπειτα, ζυγίστηκαν όλα τα σπέρματα κάθε ατόμου και κατά προσέγγιση υπολογίστηκε ο συνολικός αριθμός σπερμάτων ανά άτομο. Η επιτυχία επικονίασης καταγράφηκε ως ο αριθμός καρπών ανά αριθμός ανθέων ανά άτομο, καθώς και ως ο αριθμός σπερμάτων ανά καρπό ανά άτομο. Η αναπαραγωγική επιτυχία εκτιμήθηκε ως ο συνολικός αριθμός σπερμάτων ανά άτομο ομαλοποιημένο προς το μέγεθος του κάθε ατόμου. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι βλαστικότητας (germinability test) των σπερμάτων. Σε κάθε τρυβλίο petri τοποθετήθηκε βρεγμένο διηθητικό χαρτί και εναποτέθηκαν 25 σπέρματα προερχόμενα από το ίδιο άτομο κάθε φορά. Τα τρυβλία ακολούθως εισήχθησαν σε θάλαμο ανάπτυξης (growth chamber) και εκτέθηκαν σε συνθήκες 12ωρης φωτοπεριόδου ($PAR = 30 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 250 A light meter, LI-COR, NE) και θερμοκρασίες 20 °C τη φωτεινή και 15 °C τη σκοτεινή περίοδο. Η φάση όπου το ριζίδιο κάθε σπέρματος γινόταν για πρώτη φορά ορατό δια γυμνού οφθαλμού καταγράφηκε ως η στιγμή βλάστησης του εκάστοτε σπέρματος. Προηγουμένως, όλα τα σπέρματα έτυχαν επεξεργασίας έτσι ώστε να αρθεί ο

λήθαργός τους (πυρρόφιλα σπέρματα). Συγκεκριμένα, τα σπέρματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 80 °C για 5 min σύμφωνα με τη μεθοδολογία που προτείνουν οι Thanos και Georghiou (1988).

Όπως προαναφέρθηκε, στην επιλογή των ατόμων που μαρκαρίστηκαν καταβλήθηκε προσπάθεια να μην διαφέρουν σημαντικά ως προς το μέγεθός τους. Εντούτοις, μια μικρή διακύμανση ήταν αναπόφευκτη. Για αυτόν το λόγο πραγματοποιήθηκε μέτρηση του μεγέθους των ατόμων και ο αριθμός ανθέων που μετρήθηκε για κάθε άτομο ομαλοποιήθηκε ως προς το μέγεθος των θάμνων. Επειδή τα εφήμερα άνθη στη λαδανιά εμφανίζονται στην επιφάνεια της κόμης, η πιο πάνω ομαλοποίηση έγινε με επίπεδο αναφοράς την επιφάνεια του κάθε θάμνου. Συγκεκριμένα, μετρήθηκαν η καθ' ύψος και η οριζόντια διάμετρος του θάμνου. Προστέθηκαν οι τιμές των δύο αυτών αποστάσεων και το άθροισμα τους διαιρέθηκε διά δύο. Στην ουσία, η μέση τιμή των αποστάσεων θεωρήθηκε ως η ακτίνα της κόμης του θάμνου (r). Η τιμή της ακτίνας κάθε ατόμου χρησιμοποιήθηκε για το μαθηματικό υπολογισμό της επιφάνειας (E) του κάθε ατόμου. Αυτό έγινε με προσομοίωση της επιφάνειας του κάθε ατόμου ως την επιφάνεια μισής σφαίρας ($E = 4\pi r^2/2$, όπου $\pi = 3,14$).

Στατιστική ανάλυση

Ο έλεγχος για τυχόν διαφορές μεταξύ πράσινου και ερυθρού φαινότυπου στη λαδανιά για την κάθε προσδιοριζόμενη αναπαραγωγική παράμετρο πραγματοποιήθηκε με student's t-test με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου SPSS (v.15.0 statistical package).

4. Αποτελέσματα

4.1 Διακομινόμενη ασυμμετρία και φωτοσυνθετική ικανότητα

Στο παρόν υποκεφάλαιο παρουσιάζονται οι συσχετίσεις της τυχαίας ασυμμετρίας των φύλλων (fluctuating asymmetry- ΔΑ) με τον δείκτη φωτοσυνθετικής απόδοσης (PI_{total}) και τη μέγιστη φωτοχημική απόδοση του PSII (F_v/F_m) σε συνολικά 7 φυτικά είδη. Στα είδη *Pistacia lentiscus* και *Olea europaea* σημειώθηκε θετική συσχέτιση (Σχήματα 4.1 & 4.2), στο *Ceratonia siliqua* αρνητική συσχέτιση (Σχήμα 4.7) ενώ στα *Populus alba*, *Arbutus unedo*, *Cercis siliquastrum* και *Platanus orientalis* δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ του δείκτη ΔΑ και των PI_{total} ή F_v/F_m (Σχήματα 4.3, 4.4, 4.5 & 4.6). Το κάθε σημείο στα σχήματα συσχετίσεων αποτελεί τη μέση τιμή του κάθε δείκτη για κάθε άτομο. Οι συσχετίσεις έγιναν και σε επίπεδο αναφοράς το κάθε φύλλο. Επειδή όμως οι συσχετίσεις αυτές επέδειξαν τις ίδιες τάσεις με τις αντίστοιχες όπου το επίπεδο αναφοράς ήταν το άτομο, δεν κρίθηκε αναγκαία η παρουσίασή τους. Όλες οι συσχετίσεις ελέγχθηκαν σε επίπεδο σημαντικότητας $P < 0.05$. Τα αποτελέσματα αυτά, ενδεχομένως υποστηρίζουν ειδοεξάρτηση του τρόπου που συσχετίζεται η ασυμμετρία των φύλλων με τη φωτοσυνθετική απόδοση. Όπως φαίνεται από τα σχήματα, οι παρατηρούμενες διαφορές στον δείκτη PI_{total} είναι πολύ μεγαλύτερες αυτών του δείκτη F_v/F_m . Ωστόσο, όπου υπάρχουν συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών αυτών και της ΔΑ, τα επίπεδα σημαντικότητας είναι παρόμοια. Τα ευρήματα αυτά στο σύνολό τους αντιτίθενται στην αρχική θεωρητική υπόθεση. Σύμφωνα με αυτή αναμενόταν τα ασύμμετρα φύλλα να είναι φωτοσυνθετικώς υποδεέστερα σε σχέση με τα συμμετρικά, η πειραματική όμως εικόνα (με εξαίρεση το *C. siliqua*) διέφερε. Κατά αυτόν τον τρόπο δεν μπορεί να υποστηριχθεί η αξιοπιστία αυτού του δείκτη μορφολογικής ασυμμετρίας των φύλλων ως προς την εκτίμηση της περιβαλλοντικής καταπόνησης, τουλάχιστον σε εργασίες με φυτά πεδίου που εξετάζονται ως προς την φωτοσυνθετική απόδοσή τους ή τον κίνδυνο φωτοαναστολής. Ο αριθμός των ατόμων, των φύλλων καθώς και των

μετρήσεων φθορισμού που έγιναν σε κάθε φυτικό είδος, αναφέρονται αναλυτικά στην αντίστοιχη υποσημείωση του κάθε γραφήματος.

Σχήμα 4.1. Συσχέτιση τυχαίας ασυμμετρίας (ΔA) με τις παραμέτρους PI_{total} (Α) και F_v/F_m (Β) 10 ατόμων του είδους *Pistacia lentiscus* το καλοκαίρι του 2008. Εξέταση 30 φύλλων/άτομο, όπου για τις μετρήσεις φθορισμού λήφθηκαν 2 μετρήσεις/φύλλο. (Α): $P=0.01$ & $R^2=0.56$, (Β): $P=0.01$ & $R^2=0.59$.

Σχήμα 4.2. Συσχέτιση τυχαίας ασυμμετρίας (ΔA) με τις παραμέτρους PI_{total} (Α) και F_v/F_m (Β) 11 ατόμων του είδους *Olea europaea* τον χειμώνα του 2008. Εξέταση 27 φύλλων/άτομο, όπου για τις μετρήσεις φθορισμού λήφθηκαν 2 μετρήσεις/φύλλο. (Α): $P=0.03$ & $R^2=0.36$, (Β): $P=0.04$ & $R^2=0.30$.

Στις συσχετίσεις που παρουσιάστηκαν παραπάνω, με πειραματόφυτα τα *P. lentiscus* και *O. europaea* (Σχήματα 4.1 & 4.2), παρατηρήθηκε ότι τα περισσότερα ασύμμετρα φύλλα υπερέχουν ως προς τη συνολική

φωτοσυνθετική τους απόδοση (εκφραζόμενη ως PI_{total}) και τη μέγιστη απόδοση παγίδευσης φωτονίων του PSII (F_v/F_m). Τα αποτελέσματα αυτά, είναι ακριβώς αντίθετα με την αρχική υπόθεση της εργασίας. Οι πιθανοί λόγοι για την παρατηρούμενη εικόνα σε αυτά τα φυτικά είδη, όπως και για τα άλλα που παρουσιάζονται μετέπειτα αναφέρονται αναλυτικά υποκεφάλαιο 5.1 της Συζήτησης.

Ακολουθούν οι συσχετίσεις των 4 φυτικών ειδών που δεν παρουσίασαν την όποια συσχέτιση του μορφολογικού δείκτη ΔA με τους φωτοσυνθετικούς δείκτες PI_{total} και F_v/F_m (Σχήματα 4.3, 4.4, 4.5 & 4.6).

Σχήμα 4.3. Συσχέτιση τυχαίας ασυμμετρίας (ΔA) με τις παραμέτρους PI_{total} (A) και F_v/F_m (B) 12 ατόμων του είδους *Populus alba* το καλοκαίρι του 2008. Εξέταση 30 φύλλων/άτομο, όπου για τις μετρήσεις φθορισμού λήφθηκαν 2 μετρήσεις/φύλλο. (A): $P=0.98$ & $R^2=0.10$, (B): $P=0.78$ & $R^2=0.09$.

Σχήμα 4.4. Συσχέτιση τυχαίας ασυμμετρίας (ΔA) με τις παραμέτρους PI_{total} (A) και F_v/F_m (B) 16 ατόμων του είδους *Arbutus unedo* τον χειμώνα του 2009. Εξέταση 7 φύλλων/άτομο, όπου για τις μετρήσεις φθορισμού λήφθηκαν 2 μετρήσεις/φύλλο. (A): $P=0.69$ & $R^2=0.06$, (B): $P=0.51$ & $R^2=0.04$.

Σχήμα 4.5. Συσχέτιση τυχαίας ασυμμετρίας (ΔA) με τις παραμέτρους PI_{total} (Α) και F_v/F_m (Β) 24 ατόμων του είδους *Cercis siliquastrum* το καλοκαίρι του 2008 και του 2009. Εξέταση 30 φύλλων/άτομο, όπου για τις μετρήσεις φθορισμού λήφθηκαν 2 μετρήσεις/φύλλο. (Α): $P=0.58$ & $R^2=0.03$, (Β): $P=0.45$ & $R^2=0.02$.

Σχήμα 4.6. Συσχέτιση τυχαίας ασυμμετρίας (ΔA) με τις παραμέτρους PI_{total} (Α) και F_v/F_m (Β) 12 ατόμων του είδους *Platanus orientalis* το καλοκαίρι του 2009. Εξέταση 20 φύλλων/άτομο, όπου για τις μετρήσεις φθορισμού λήφθηκαν 2 μετρήσεις/φύλλο. (Α): $P=0.60$ & $R^2=0.07$, (Β): $P=0.42$ & $R^2=0.03$.

Τέλος, το μόνο φυτικό είδος που παρουσίασε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της ασυμμετρίας των φύλλων και των φωτοσυνθετικών δεικτών ήταν το *C. siliqua* (Σχήμα 4.7). Σε αυτήν την περίπτωση, όσο πιο ασύμμετρο ήταν ένα

φύλλο του τόσο πιο χαμηλή εμφανιζόταν να είναι η φωτοσυνθετική του ικανότητα.

Σχήμα 4.7. Συσχέτιση τυχαίας ασυμμετρίας (ΔA) με τις παραμέτρους PI_{total} (Α) και F_v/F_m (Β) 12 ατόμων του είδους *Ceratonia siliqua* το καλοκαίρι του 2008. Εξέταση 30 φύλλων/άτομο, όπου για τις μετρήσεις φθορισμού λήφθηκαν 2 μετρήσεις/φύλλο. (Α): $P=0.04$ & $R^2=0.27$, (Β): $P=0.02$ & $R^2=0.36$.

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως οι δύο περιπτώσεις φυτικών ειδών που περιέγραψαν θετική συσχέτιση μεταξύ ΔA και PI_{total} ή F_v/F_m , εμφάνισαν τις μεγαλύτερες μέσες τιμές ασυμμετρίας σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές των υπόλοιπων πέντε ειδών που μελετήθηκαν. Οπότε, η απόλυτη τιμή της ασυμμετρίας στα φύλλα μπορεί να επηρεάζει τον τρόπο συσχέτισής της με τους δύο φωτοσυνθετικούς δείκτες που προτάθηκαν. Στον Πίνακα 4.1 παρουσιάζεται το εύρος των τιμών και η μέση τιμή του δείκτη ΔA για τα εξεταζόμενα 7 φυτικά είδη.

Είδος	Εύρος τιμών ΔA	Μέση τιμή ΔA
<i>P. lentiscus</i>	0.06 – 0.125	0.093
<i>O. europea</i>	0.05 – 0.085	0.068
<i>P. alba</i>	0.03 – 0.055	0.029
<i>P. orientalis</i>	0.03 – 0.060	0.045
<i>C. siliquastrum</i>	0.02 – 0.045	0.033
<i>A. unedo</i>	0.01 – 0.050	0.030
<i>C. siliqua</i>	0.02 – 0.045	0.033

Πίνακας 4.1. Εύρος τιμών και μέση τιμή διακομινόμενης ασυμμετρίας (ΔA) 7 φυτικών ειδών

4.2 *Pistacia lentiscus*

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το πειραματόφυτο *P. lentiscus* εξετάστηκε διεξοδικά στην παρούσα διατριβή. Τα υποκεφάλαια που ακολουθούν παρουσιάζουν τα ευρήματα των εργασιών με πειραματόφυτο το σχίνο. Για την όσο δυνατόν καλύτερη παρουσίαση αυτών των αποτελεσμάτων, κρίθηκε σκόπιμο να διαχωριστούν σε 3 ξεχωριστά υποκεφάλαια (4.2.1, 4.2.2 & 4.2.3). Έτσι, τα συνολικά αποτελέσματα στο σχίνο παρουσιάζονται μεν χωρισμένα σε τρεις ενότητες αλλά αναπόφευκτα συνδέονται μεταξύ τους συνθέτοντας μια πιο ολοκληρωμένη λίστα απαντήσεων σε ερωτήματα που τέθηκαν σε αυτήν τη διατριβή. Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τον κύκλο εργασιών με το *P. lentiscus*, αναλύονται διεξοδικά στο κεφάλαιο της Συζήτησης.

4.2.1 Η ένταση της χειμερινής ερυθρότητας των φύλλων ως δείκτης ατόμων με μειονεξία στην φωτοσύνθεση

Ο χαρακτηρισμός των ατόμων ως ερυθρά και πράσινα έγινε δια γυμνού οφθαλμού κατά την πρώτη (έτος 2007) και δεύτερη (έτος 2008) «ερυθρή» περίοδο. Αυτό επιβεβαιώθηκε με μετρήσεις ανακλαστικότητας που έγιναν το 2007, όπου τα πράσινα άτομα έφεραν χαμηλότερες τιμές στον δείκτη ARI σε σχέση με τα ερυθρά. Συγκεκριμένα, το εύρος τιμών του δείκτη ARI ήταν 0.004 – 0.025 στα πράσινα και 0.035 – 0.220 στα ερυθρά φύλλα (Σχήμα 4.8). Οι τιμές του λόγου F_v/F_m στα ίδια φύλλα διακυμάνθηκαν από 0.70 – 0.83 στα πράσινα και 0.60 – 0.79 στα ερυθρά, υποδεικνύοντας τη σχετική φωτοσυνθετική μειονεξία των ερυθρών έναντι των πράσινων φαινοτύπων. Παρακάτω, παρουσιάζεται η συσχέτιση μεταξύ των δεικτών ARI και F_v/F_m στους δύο φαινότυπους που εξετάστηκαν κατά την «ερυθρή» περίοδο (τέλος χειμώνα) του 2007.

Σχήμα 4.8. Μέγιστη φωτοχημική απόδοση του PSII (F_v/F_m) σε σχέση με τις περιεχόμενες στα φύλλα ανθοκυανίνες (ARI) σε 43 πράσινα (•) και σε 19 ερυθρά άτομα (°), με διαφορετικό βαθμό ερυθρότητας. Τα δεδομένα λήφθηκαν την «ερυθρή» περίοδο του 2007 (τέλος χειμώνα). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο μετρήσεων 4 φύλλων/άτομο (2 μετρήσεις ανά φύλλο). $P=2.98 \times 10^{-12}$ και $R^2=0.55$.

Επίσης, με τη βοήθεια του δείκτη ανακλαστικότητας NDI εκτιμήθηκε η περιεχόμενη στα φύλλα χλωροφύλλη. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι τα ερυθρά άτομα περιείχαν μικρότερη συγκέντρωση χλωροφύλλης σε σχέση με τα άτομα του πράσινου φαινότυπου (Σχήμα 4.9). Έτσι, καθίσταται σαφές πως όσο περισσότερο αυξάνεται η ερυθρότητα σε ένα άτομο, τόσο πιο πολύ μειώνονται τα επίπεδα της περιεχόμενης σε αυτό χλωροφύλλης. Ταυτόχρονα συμπεραίνεται ότι, όσο η ερυθρότητα ενός φύλλου αυξάνεται τόσο μεγαλώνει και ο κίνδυνος να υποστεί φωτοαναστολή η φωτοσυνθετική του συσκευή.

Σχήμα 4.9. Συσχέτιση περιεχόμενης στα φύλλα χλωροφύλλης (NDI) με τα επίπεδα ανθοκυανινών σε 43 πράσινα (•) και σε 19 διαφόρων ερυθρών αποχρώσεων (°) άτομα. Οι τιμές αφορούν την «ερυθρή» περίοδο του 2007 (τέλος χειμώνα). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο μετρήσεων 4 φύλλων/άτομο (2 μετρήσεις ανά φύλλο). $P=2.74 \times 10^{-12}$ και $R^2=0.52$.

Ως αποτέλεσμα των πιο πάνω ήταν να καταγραφεί ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ της μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης του PSII (F_v/F_m) και της περιεχόμενης στα φύλλα χλωροφύλλης (NDI) (Σχήμα 4.10).

Σχήμα 4.10. Συσχέτιση μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης του PSII (F_v/F_m) και περιεχόμενης στα φύλλα χλωροφύλλης (NDI) σε 43 πράσινα (•) και σε 19 διαφόρων ερυθρών αποχρώσεων (◦) άτομα. Οι τιμές αφορούν την «ερυθρή» περίοδο του 2007 (τέλος χειμώνα). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο μετρήσεων 4 φύλλων/άτομο (2 μετρήσεις ανά φύλλο). $P=9.6 \times 10^{-9}$ και $R^2=0.42$.

Μία δευτέρα επαναληπτική δειγματοληψία που έγινε την «ερυθρή» περίοδο της επόμενης χρονιάς (2008), επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα της προηγούμενης χρονιάς. Οι μετρήσεις αυτές καθώς και οι αντίστοιχες της «πράσινης» περιόδου του ίδιου έτους παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2.

Παράμετρος	Φλεβάρης		Οκτώβρης	
	Πράσινα	Ερυθρά	Πράσινα	Ερυθρά
F_v/F_m	0.770 ± 0.010^a	0.730 ± 0.019^b	0.820 ± 0.010^y	0.810 ± 0.010^y
NDI	0.391 ± 0.053^a	0.293 ± 0.054^b	0.394 ± 0.030^a	0.366 ± 0.054^a
ARI	0.010 ± 0.002^a	0.074 ± 0.064^b	0.008 ± 0.002^a	0.010 ± 0.002^a

Πίνακας 4.2. Τιμές παραμέτρων (F_v/F_m , NDI & ARI) σε πράσινα και ερυθρά άτομα κατά την «ερυθρή» (Φλεβάρης) και «πράσινη» (Οκτώβρης) περίοδο του 2008. Τα δεδομένα αναφέρονται ως μέσες τιμές $\pm$ SD από 6 άτομα ανά φαινότυπο. Τα διαφορετικά γράμματα στις σειρές υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανά μετρούμενη παράμετρο. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο εποχών μελέτης παρατηρούνται μόνο για την παράμετρο F_v/F_m . Διαφορές ανάμεσα στους δύο φαινότυπους δεν υπάρχουν κατά την «πράσινη» περίοδο για καμία από τις τρεις παραμέτρους που εξετάστηκαν.

Κατά την «ερυθρή» περίοδο των δύο συναπτών ετών τα ερυθρά άτομα επέδειξαν μειωμένες συγκεντρώσεις χλωροφύλλης και αυξημένο βαθμό χρόνιας φωτοαναστολής. Αντίθετα, η εικόνα αλλάζει κατά την «πράσινη»-ευνοϊκή περίοδο του έτους 2008 αφού και οι τρεις παράμετροι που εξετάστηκαν εμφάνισαν παρόμοιες τιμές στους δύο φαινότυπους (Πίνακας 4.2).

4.2.2 Ο ερυθρός φαινότυπος καταπονείται λόγω χαμηλών επιπέδων αζώτου και μειωμένης απόδοσης καρβοξυλίωσης

Στον Πίνακα 4.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μετρήσεων διάφορων φωτοσυνθετικών παραμέτρων που λήφθηκαν με τον αναλυτή αερίων. Αυτές οι μετρήσεις έγιναν σε τρεις ημερομηνίες κατά την «ερυθρή» περίοδο και σε άλλες δύο της «πράσινης» του 2010. Κατά την «ερυθρή» περίοδο (Μάρτιος) οι ερυθροί φαινότυποι επιδεικνύουν μικρότερη ταχύτητα φωτοσυνθετικής αφομοίωσης του CO₂ (A) και μειωμένη αγωγιμότητα των στομάτων (g_s). Συγκεκριμένα, η παράμετρος A είναι κατά 49%, 47% και 37% μειωμένη στα ερυθρά φύλλα στις αρχές, μέσα και τέλη Μαρτίου αντίστοιχα, διαφορές που αποδεικνύονται στατιστικώς σημαντικές (P<0.05). Η παράμετρος g_s εμφανίστηκε μειωμένη κατά 27% και 43% στα ερυθρά άτομα στις αρχές και στα μέσα Μαρτίου αντίστοιχα, διαφορές που είναι στατιστικώς σημαντικές (P<0.05). Όσον αφορά τις δύο προαναφερθείσες παραμέτρους την «πράσινη» περίοδο (Ιούνης, Οκτώβρης), δεν σημείωσαν την όποια διαφορά οι δύο φαινότυποι μεταξύ τους. Η τιμή της παραμέτρου A στον πράσινο φαινότυπο παραμένει σχεδόν σταθερή στις διάφορες εποχές, με εξαίρεση κατά την καλοκαιρινή περίοδο όπου σημειώνει σημαντική πτώση. Αυτό φαίνεται να γίνεται λόγω της μειωμένης βροχόπτωσης και των αυξημένων θερμοκρασιών που χαρακτηρίζουν τη Μεσογειακή καλοκαιρινή περίοδο. Ωστόσο, ο ερυθρός φαινότυπος συμπεριφέρεται με διαφορετικό τρόπο εμφανίζοντας μια σταδιακή μείωση της παραμέτρου A από τις αρχές Μαρτίου μέχρι και το καλοκαίρι όπου φέρει την ελάχιστη τιμή του και μετέπειτα ανακάμπτει τον Οκτώβριο μετά τις πρώτες φθινοπωρινές βροχές. Η αγωγιμότητα των στομάτων (g_s) σημειώνει μια σταδιακή μείωση από την άνοιξη προς το καλοκαίρι και μετά μια ανάκαμψη το φθινόπωρο τόσο στον ερυθρό φαινότυπο όσο και στον πράσινο. Όσον αφορά την συγκέντρωση του CO₂ στον υποστοματικό χώρο των φύλλων (C_i), παρατηρήθηκαν μικρές αλλά στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φαινοτύπων σε όλες τις

εποχές (πλην του φθινοπώρου), με τα ερυθρά φύλλα να υπερτερούν των πράσινων. Τέλος, το περιεχόμενο στα φύλλα άζωτο παραμένει περίπου σταθερό κατά τη διάρκεια όλου του έτους στα πράσινα φύλλα. Τόσο κατά την «ερυθρή» όσο και κατά την καλοκαιρινή περίοδο, τα πράσινα φύλλα εμπεριέχουν περισσότερο άζωτο σε σχέση με τα «ερυθρά». Εν αντιθέσει, τη φθινοπωρινή περίοδο οι διαφορές αυτές δεν υφίστανται πλέον. Ολοκληρώνοντας, αναφέρεται πως τα επίπεδα βροχοπτώσεων κατά την περίοδο από τον Ιανουάριο μέχρι και τον Οκτώβριο του 2010 ήταν 132, 122, 49, 4, 28, 10, 0, 0, 17 και 164 για κάθε μήνα.

Περίοδος δειγματοληψίας	Ρυθμός αφομοίωσης CO ₂ (A)	Θερμοκρασία περιβάλλοντος	Αγωγιμότητα στομάτων (g _s)	Υποστομάτια συγκέντρωση CO ₂ (Ci)	Άζωτο φύλλων
	(μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	(°C)	(molH ₂ Om ⁻² s ⁻¹)	(μmol CO ₂ molair ⁻¹)	(mmolgDW ⁻¹)
<i>Αρχές Μαρτίου</i>					
Πράσινα	10.9 ± 0.6		0.30 ± 0.02	303 ± 5	
	*	22.3 ± 0.9	*	*	
Ερυθρά	5.6 ± 0.7		0.22 ± 0.02	328 ± 5	
<i>Μέσα Μαρτίου</i>					
Πράσινα	11.6 ± 0.7		0.23 ± 0.01	283 ± 3	0.67 ± 0.04
	*	21.1 ± 0.8	*	*	*
Ερυθρά	6.1 ± 0.8		0.13 ± 0.01	294 ± 6	0.45 ± 0.02
<i>Τέλος Μαρτίου</i>					
Πράσινα	10.8 ± 1.6		0.13 ± 0.02	244 ± 7	
	*	23.1 ± 1.7		*	
Ερυθρά	6.8 ± 0.8		0.11 ± 0.02	285 ± 6	
<i>Μέσα Ιούνη</i>					
Πράσινα	6.9 ± 0.5		0.08 ± 0.01	231 ± 8	0.61 ± 0.03
		33.2 ± 1.6		*	*
«Ερυθρά»	6.4 ± 0.6		0.09 ± 0.01	258 ± 8	0.50 ± 0.02
<i>Τέλος Οκτώβρη</i>					
Πράσινα	13.3 ± 0.5		0.23 ± 0.01	289 ± 5	0.72 ± 0.03
		27.8 ± 3.6			
«Ερυθρά»	13.7 ± 0.5		0.22 ± 0.02	274 ± 9	0.68 ± 0.04

Πίνακας 4.3. Παράμετροι ανταλλαγής αερίων μεταξύ φύλλων-ατμόσφαιρας και περιεχόμενο σε άζωτο των ερυθρών και πράσινων φύλλων ανά δειγματοληπτική περίοδο. Οι τιμές αφορούν την «ερυθρή» (Μάρτιος) και την «πράσινη» (Ιούνης, Οκτώβρης) περίοδο του έτους 2010. Οι μετρήσεις λήφθηκαν υπό ένταση φωτεινής ακτινοβολίας κεκορεσμένης για την φωτοσυνθετική συσκευή (PAR 1400-1600 μmol⁻²s⁻¹) και υπό συγκέντρωση CO₂ περιβάλλοντος (400ppm). Οι παράμετροι A, g_s και Ci εμφανίζουν κανονικότητα και ομοιογένεια. Στην περίπτωση του αζώτου των φύλλων, προηγήθηκε λογαριθμικός μετασχηματισμός των τιμών πριν τη στατιστική ανάλυση. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (P<0.05) στις μετρούμενες παραμέτρους ανάμεσα στους δύο φαινότυπους σε κάθε δειγματοληπτική περίοδο.

Η καμπύλη συσχέτισης των παραμέτρων A και C_i (καμπύλη A/C_i) αναφέρεται σε μετρήσεις που έγιναν σε φάση της «ερυθρής» περιόδου του έτους (τέλος Μαρτίου) (Σχήμα 4.11). Η καμπύλη που διαγράφεται από τα ερυθρά φύλλα εμφανίζει μικρότερη αρχική κλίση συγκρινόμενη με την αντίστοιχη που περιγράφεται από τα πράσινα. Εντούτοις, η τελική μέγιστη τιμή A που επιτυγχάνεται υπό μέγιστη τιμή C_i δεν φαίνεται να διαφέρει ανάμεσα στους δύο φαινότυπους.

Σχήμα 4.11. Φωτοσυνθετικός ρυθμός (A) σε σχέση με τη συγκέντρωση του CO_2 στον υποστομάτιο χώρο των φύλλων (C_i) σε ερυθρά (•) και πράσινα (Δ) φύλλα στο τέλος Μαρτίου («ερυθρή» περίοδος). Συνολικά 15 φύλλα (8 ερυθρά και 7 πράσινα) μετρήθηκαν σε 10 διαφορετικά βήματα αυξανόμενης εξωτερικής συγκέντρωσης CO_2 . Κάθε σημείο αφορά μία μέτρηση ανά φύλλο σε κάθε ένα από αυτά τα βήματα. Στο σύνολο των σημείων κάθε φαινότυπου έγινε εφαρμογή του μοντέλου Hill 1, ώστε να προκύψει η βέλτιστη καμπύλη συσχέτισης.

Με μαθηματική ανάλυση της πιο πάνω καμπύλης υπολογίστηκε η απόδοση καρβοξυλίωσης (carboxylation efficiency- CE) και ο περιορισμός που θέτουν τα στόματα στη φωτοσύνθεση (stomatal limitation- I) (Farquhar *et al.*, 1980). Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης παρουσιάζονται στον

Πίνακα 4.4. Σημειώθηκε διαφορά μεταξύ των δύο φαινοτύπων ως προς την παράμετρο CE, η οποία επιβεβαιώθηκε με στατιστικό τρόπο ($P < 0.05$). Συγκεκριμένα, ο πράσινος φαινότυπος εμφάνισε σαφή υπεροχή έναντι του ερυθρού. Αντιθέτως, η παράμετρος I δεν διέφερε ανάμεσα στους δύο φαινότυπους.

Παράμετροι	Πράσινα	Ερυθρά
I	0.59 ± 0.05	0.58 ± 0.04
CE	$0.094 \pm 0.002^*$	$0.075 \pm 0.001^*$

Πίνακας 4.4. Υπολογισθείσες τιμές των παραμέτρων του σχετικού στοματικού περιορισμού (I) και της ικανότητας καρβοξυλίωσης (CE) σε πράσινα και ερυθρά φύλλα του *P. lentiscus* στο τέλος Μαρτίου («ερυθρή» περίοδος). Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι $\pm$ SD από ανεξάρτητες μετρήσεις σε 8 ερυθρά και 7 πράσινα φύλλα. Οι δύο παράμετροι ελέχθησαν ως προς την κανονικότητα και την ομοιογένειά τους. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φαινοτύπων ($P < 0.05$).

4.2.3 Το έλλειμμα αζώτου δρα επιλεκτικά στην ενεργότητα του φωτοσυστήματος I (PSI)

Η παρούσα εργασία εκμεταλλεύτηκε τις φυσιολογικές διακυμάνσεις του αζώτου ώριμων φύλλων του *P. lentiscus*, και σε συνδυασμό με την ανάλυση των αντίστοιχων καμπυλών ταχείας ανόδου του φθορισμού της χλωροφύλλης εξετάστηκε η επίδραση της έλλειψης του στοιχείου αυτού στα διάφορα βήματα των φωτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης. Η μαθηματική ανάλυση των καμπυλών φθορισμού έγινε σύμφωνα με το λεγόμενο «JIP-test» (Strasser *et al.*, 2004; Tsimilli-Michael & Strasser, 2008; Stirbet & Govindjee, 2011) επιτυγχάνοντας έτσι την εκτίμηση της εν δυνάμει δραστηριότητας των δύο φωτοσυστημάτων.

Στον Πίνακα 4.5 παρουσιάζονται οι παράμετροι που υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του JIP-test στις δύο περιόδους δειγματοληψίας (τέλος χειμώνα 25/2 και φθινόπωρο 24/10). Οι παράμετροι Φ_{Po} (μέγιστη ανά φωτόνιο απόδοση της πρωτογενούς φωτοχημείας), Φ_{Eo} (ανά φωτόνιο απόδοση της

μεταφοράς ηλεκτρονίων από το PSII στους ενδιάμεσους φορείς ηλεκτρονίων) και ψ_{E_0} (η πιθανότητα διατήρησης της παγιδευμένης ενέργειας ως ροή ηλεκτρονίων), εμφανίζονται μειωμένοι κατά τη δυσμενή-χειμερινή περίοδο σε σχέση με το φθινόπωρο. Αυτά τα αποτελέσματα είναι αναμενόμενα μιας και έχουν παρουσιαστεί σε σειρά από άλλες εργασίες μέχρι σήμερα, όπου ο συνδυασμός της υψηλής φωτεινής ακτινοβολίας και του ψύχους έδειξε αύξηση του κινδύνου χρόνιας φωτοαναστολής του PSII σε αειθαλή σκληρόφυλλα φυτικά είδη της Μεσογείου (García-Plazaola *et al.*, 1999; Karavatas & Manetas, 1999; Larcher, 2000). Ωστόσο, η παράμετρος ϕ_{R_0} (η ανά φωτόνιο απόδοση της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το PSII στους τελικούς αποδέκτες του PSI) δεν εμφάνισε την όποια διαφορά ανάμεσα στις δυο εποχές που μελετήθηκαν. Το ίδιο ισχύει και για τις παραμέτρους δ_{R_0} (η πιθανότητα της μεταφοράς ηλεκτρονίων από τους ενδιάμεσους φορείς στους τελικούς αποδέκτες διαμέσου του PSI) και $1/V_I$ (σχετικό απόθεμα των τελικών αποδεκτών του PSI), υποδεικνύοντας κατά αυτόν τον τρόπο ότι η ενεργότητα του PSI επηρεάζεται σε μικρότερο βαθμό από τη χειμερινή καταπόνηση σε σχέση με το PSII (Huang *et al.*, 2010). Ως επακόλουθο των πιο πάνω, ο δείκτης PI_{total} που εκφράζει την φωτοσυνθετική απόδοση και των δύο φωτοσυστημάτων, βρέθηκε να μην διαφέρει μεταξύ των δύο εποχών. Αξίζει να αναφερθεί το γεγονός πως η τυπική απόκλιση (ως SD/mean) εμφανίζεται ιδιαίτερα υψηλή στις περισσότερες παραμέτρους που αναλύθηκαν, παρόλο τον μεγάλο αριθμό μετρήσεων που λήφθηκαν ($N = 20$ και $N = 47$ για το χειμώνα και το φθινόπωρο, αντίστοιχα). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί παρατηρώντας τις διακυμάνσεις του αζώτου που περιέχεται στα φύλλα αφού σε κάποιες περιπτώσεις ήταν ιδιαίτερα έντονες. Παρόλο που το περιεχόμενο των φύλλων σε άζωτο δεν διέφερε στατιστικώς ανάμεσα στις δύο εξεταζόμενες εποχές, εντούτοις, το εύρος αυτών των τιμών ήταν σημαντικά διαφορετικό στις δύο δειγματοληψίες που έγιναν. Οι διαφορές μεταξύ φύλλων χαμηλού και υψηλού περιεχομένου αζώτου ήταν αρκετά έντονες και θα μπορούσαν να συγκριθούν με το περιεχόμενο σε άζωτο πειραματοφύτων που

αναπτύσσονταν υπό συνθήκες έλλειψης και περίσσειας αζώτου, αντίστοιχα (Ciompi *et al.*, 1996; Bungard *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2001; Antal *et al.*, 2010). Ο λόγος εμφάνισης αυτής της διακύμανσης δεν εξετάστηκε στην παρούσα διατριβή. Ωστόσο, μπορεί να ειπωθεί πως η επίδραση αυτών των διακυμάνσεων αζώτου είναι ειδοειδική αλλά και συγκεκριμένη για το κάθε ένα από τα φωτοσυστήματα της φωτοσυνθετικής συσκευής.

Παράμετροι	Τέλος χειμώνα	Φθινόπωρο
φ_{Po}	$0.72 \pm 0.06^*$	$0.79 \pm 0.04^*$
φ_{Eo}	$0.35 \pm 0.08^*$	$0.41 \pm 0.04^*$
φ_{Ro}	0.18 ± 0.04	0.19 ± 0.04
ψ_{Eo}	$0.49 \pm 0.09^*$	$0.52 \pm 0.04^*$
δ_{Ro}	0.50 ± 0.06	0.47 ± 0.09
$1/V_I$	1.33 ± 0.09	1.36 ± 0.11
PI_{total}	1.74 ± 1.09	2.16 ± 1.29

Πίνακας 4.5. Τιμές παραμέτρων φ_{Po} (η μέγιστη ανά φωτόνιο απόδοση της πρωτογενούς φωτοχημείας), φ_{Eo} (η ανά φωτόνιο απόδοση της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το PSII στους ενδιάμεσους φορείς ηλεκτρονίων), φ_{Ro} (η ανά φωτόνιο απόδοση της αναγωγής των τελικών αποδεκτών ηλεκτρονίων του PSI), ψ_{Eo} (η πιθανότητα διατήρησης της παγιδευμένης ενέργειας ως ροή ηλεκτρονίων), δ_{Ro} (η πιθανότητα της μεταφοράς ηλεκτρονίων από τους ενδιάμεσους φορείς στους τελικούς αποδέκτες διαμέσου του PSI), $1/V_I$ (το σχετικό απόθεμα των τελικών αποδεκτών του PSI) και PI_{total} (ο δείκτης φωτοσυνθετικής απόδοσης) σε φύλλα του φυτού *P. lentiscus* που ελήφθησαν σε δύο εποχές, το φθινόπωρο και στο τέλος του χειμώνα του 2010. Μέσες τιμές $\pm$ SD από 20 (τέλος χειμώνα) και 47 (φθινόπωρο) ανεξάρτητων μετρήσεων. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ίδιων παραμέτρων που λήφθηκαν σε διαφορετικές εποχές ($P < 0.05$).

Η μέση τιμή αζώτου των φύλλων το φθινόπωρο ήταν ελαφρώς μεγαλύτερη από την αντίστοιχη τιμή του χειμώνα ($0.62 \pm 0.12 \text{ mmol g DW}^{-1}$

έναντι $0.56 \pm 0.15 \text{ mmol g DW}^{-1}$), με τη διαφορά να είναι οριακά στατιστικώς σημαντική ($P=0.09$) κυρίως λόγω των μεγάλων διακυμάνσεων που παρουσίαζαν οι τιμές. Το εύρος τιμών ήταν $0.40 - 0.85 \text{ mmol g DW}^{-1}$ το φθινόπωρο και $0.32 - 0.82 \text{ mmol g DW}^{-1}$ το χειμώνα. Αυτές οι φυσικές διακυμάνσεις του αζώτου εξετάστηκαν μετέπειτα ως προς τη συσχέτισή τους με διάφορες παραμέτρους της φωτοσύνθεσης.

Στο Σχήμα 4.12 εμφανίζονται οι καμπύλες ταχείας ανόδου του φθορισμού της χλωροφύλλης *a* (OJIP curves) (V_t , διπλή κανονικοποίηση στα σημεία F_0 και F_P) επιλεγμένων φύλλων με χαμηλό και υψηλό περιεχόμενο σε άζωτο, σε λογαριθμισμένη κλίμακα χρόνου. Όπως παρουσιάζονται, διαφαίνεται ότι φέρουν την κανονική χαρακτηριστική O-J-I-P μορφή. Η καμπύλη φθορισμού των φύλλων χαμηλού περιεχομένου σε άζωτο γενικώς εμφανίζει υψηλότερους φθορισμούς από την αντίστοιχη φύλλων υψηλού περιεχομένου σε άζωτο.

Σχήμα 4.12. Καμπύλες ταχείας ανόδου του φθορισμού της χλωροφύλλης *a* (OJIP) (V_t , διπλή κανονικοποίηση στα σημεία F_0 και F_P) σε λογαριθμισμένη κλίμακα χρόνου. Παρουσιάζονται φύλλα με υψηλό (■) και χαμηλό (□) περιεχόμενο σε άζωτο κατά τις περιόδους, μέσα φθινοπώρου-ενοϊκή (Α) και τέλος χειμώνα-δυσμενής (Β). Η κάθε καμπύλη αποτελεί τον μέσο όρο μετρήσεων 3 φύλλων που επέδειξαν τη χαμηλότερη και άλλων τόσων με την υψηλότερη τιμή περιεχόμενου αζώτου στις δύο εποχές που εξετάστηκαν.

Στο Σχήμα 4.13 εμφανίζονται οι διαφορές ΔV_t μεταξύ φύλλων με υψηλό και χαμηλό περιεχόμενο σε άζωτο. Το συγκεκριμένο γράφημα προέκυψε από το Σχήμα 4.12 μετά την αφαίρεση του φθορισμού των φύλλων υψηλού περιεχομένου σε άζωτο από την τιμή φθορισμού που εμφάνισαν τα φύλλα με χαμηλή συγκέντρωση αζώτου κατά τις αντίστοιχες χρονικές στιγμές. Οι διαφορές εμφανίστηκαν εντονότερες στο βήμα καμπυλών I-P το φθινόπωρο (Α) και O-J το χειμώνα (Β). Διαφαίνεται από τα Σχήματα 4.12 και 4.13 ότι η έλλειψη αζώτου προκαλεί ποιοτικά διαφορετικές αλλαγές στα πρότυπα των καμπυλών O-J-I-P κατά τις δύο περιόδους δειγματοληψίας. Κατά την ενοϊκή για την ανάπτυξη φθινοπωρινή περίοδο η έλλειψη αζώτου επηρεάζει κυρίως την περιοχή I-P της καμπύλης, ενώ κατά τη χειμερινή (δυσμενή) περίοδο επηρεάζει κυρίως την περιοχή O-J.

Σχήμα 4.13. Διαφορές των καμπυλών κινητικής επαγωγής φθορισμού του Σχήματος 4.12.

Τα δύο προαναφερθέντα γραφήματα αναφέρονται στις μέσες τιμές 3 φύλλων με χαμηλό και άλλων τόσων με υψηλό περιεχόμενο σε άζωτο. Τα φύλλα αυτά εντάσσονταν εντός των κατώτερων και ανώτερων ορίων όσον αφορά το περιεχόμενό τους σε άζωτο αντίστοιχα, κατά τις δυο εποχές που μελετήθηκαν. Στα Σχήματα 4.14 και 4.15 συσχετίζονται οι διάφοροι

παράμετροι του JIP-test με το άζωτο. Σε αυτά λαμβάνονται υπόψη όλα τα φύλλα που μετρήθηκαν στην κάθε εποχή και όχι μόνο όσα έφεραν ακραίες τιμές περιεχομένου αζώτου.

Κατά το φθινόπωρο, τόσο η μέγιστη ανά φωτόνιο απόδοση της πρωτογενούς φωτοχημείας (ϕ_{Po}) όσο και η ανά φωτόνιο απόδοση της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το PSII προς τους ενδιάμεσους φορείς ηλεκτρονίων (ϕ_{Eo}) ήταν ανεξάρτητες του περιεχομένου αζώτου (Σχήματα 4.14A & B). Εν αντιθέσει, η ανά φωτόνιο απόδοση της αναγωγής των τελικών αποδεκτών ηλεκτρονίων (ϕ_{Ro}) συσχετίστηκε θετικά με το περιεχόμενο άζωτο υποδεικνύοντας πως τα φύλλα με χαμηλό άζωτο πιθανόν υστερούν στη φάση ροής ηλεκτρονίων προς το PSI (Σχήμα 4.14Γ). Οι παράμετροι, της πιθανότητας κινητοποίησης ροής ηλεκτρονίων από το PSII μέχρι τους ενδιάμεσους φορείς (ψ_{Eo} , Σχήμα 4.14Δ), και της μεταφοράς ηλεκτρονίων από τους ενδιάμεσους φορείς στους τελικούς αποδέκτες διαμέσου του PSI (δ_{Ro} , Σχήμα 4.14Ε), του μεγέθους της δεξαμενής των τελικών αποδεκτών του PSI ($1/V_I$, Σχήμα 4.14ΣΤ) και του δείκτη φωτοσυνθετικής απόδοσης (PI_{total} , Σχήμα 4.14Ζ) συσχετίστηκαν θετικά με το περιεχόμενο στα φύλλα άζωτο.

Σχήμα 4.14. Συσχετίσεις παραμέτρων του JIP-test με το περιεχόμενο στα φύλλα άζωτο στα μέσα φθινοπώρου. Όπου ϕ_{Po} , ϕ_{Eo} , ϕ_{Ro} , η μέγιστη ανά φωτόνιο απόδοση της πρωτογενούς φωτοχημείας, η ανά φωτόνιο απόδοση της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το PSII στους ενδιάμεσους φορείς και από τους ενδιάμεσους φορείς προς τους τελικούς αποδέκτες ηλεκτρονίων. Αντίστοιχα, ψ_{Eo} , η πιθανότητα ροής ηλεκτρονίων από το PSII προς τους ενδιάμεσους φορείς, δ_{Ro} , η πιθανότητα ροής ηλεκτρονίων από τους ενδιάμεσους φορείς προς τους τελικούς αποδέκτες (NADPH) δια μέσου του PSI, $1/V_L$, μέγεθος δεξαμενής τελικών αποδεκτών του PSI και PI_{total} , δείκτης φωτοσυνθετικής απόδοσης.

Τη χειμερινή περίοδο η εικόνα ήταν διαφορετική. Οι παράμετροι ϕ_{Po} , ϕ_{Eo} και ψ_{Eo} , οι οποίοι κατά το φθινόπωρο δεν εμφάνισαν κάποια συσχέτιση με το άζωτο, εμφάνισαν μειωτική τάση για συγκεντρώσεις αζώτου μικρότερες των $0.5 \text{ mmol.gDW}^{-1}$ (Σχήματα 4.15A, B & Δ). Οι υπόλοιπες παράμετροι (ϕ_{Ro} , δ_{Ro} , $1/V_L$ και PI_{total}) εμφάνισαν την ίδια τάση με αυτή του φθινοπώρου και συσχετίστηκαν θετικά με το περιεχόμενο των φύλλων σε άζωτο (Σχήματα 4.15Γ, Ε, ΣΤ & Ζ).

Σχήμα 4.15. Συσχετίσεις παραμέτρων του JIP-test με το περιεχόμενο στα φύλλα άζωτο τη χειμερινή περίοδο. Τα σύμβολα ίδια με αυτά του Γραφήματος 4.14.

4.3 *Cistus creticus*

Αρμοστικότητα ερυθρών ατόμων έναντι της περιβαλλοντικής καταπόνησης

Η συσσώρευση ανθοκυανινών στο *C. creticus* ξεκινά περί τα τέλη του Δεκεμβρη και μέχρι τα μέσα του Φλεβάρη εμφανίζει το μέγιστό της. Ακολούθως, η ερυθρότητα εξασθενεί και σταματά να είναι ορατή δια γυμνού οφθαλμού στο τέλος του Απριλή. Το συγκεκριμένο πειραματόφυτο εξετάζεται από την εργαστηριακή μας ομάδα αρκετά χρόνια. Η παρουσία των ανθοκυανινών όπως και η εποχιακή φωτοσυνθετική του συμπεριφορά είναι καλά τεκμηριωμένη. Η παρούσα διατριβή μελέτησε μια σειρά από αναπαραγωγικές παραμέτρους σε αυτό το πειραματόφυτο.

Οι αναπαραγωγικές παράμετροι που εξετάστηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.6. Οι μετρήσεις έγιναν το 2008 και έγινε προσπάθεια σύγκρισης της αναπαραγωγικής προσπάθειας και επιτυχίας που εμφανίζουν οι δύο φαινότυποι. Η περίοδος ανθοφορίας της λαδανιάς ξεκινά στο τέλος Απριλίου και διαρκεί μέχρι τις αρχές Ιουνίου. Η αναπαραγωγική προσπάθεια, αφού

προηγέθηκε κανονικοποίηση των τιμών ως προς το μέγεθος του εκάστοτε θάμνου, εκφράστηκε ως αριθμός ανθέων ανά άτομο. Εμφανίστηκε να είναι ίδια, τόσο για τον πράσινο όσο και για τον ερυθρό φαινότυπο. Ακόμη, δεν σημειώθηκαν διαφορές ούτε ως προς την επικονιαστική επιτυχία των δύο φαινοτύπων όπως αυτή εκφράστηκε μέσω του αριθμού των καρπών διά του αριθμού των ανθέων και του αριθμού των σπερμάτων ανά καρπό. Τέλος η αναπαραγωγική επιτυχία, ως αριθμός σπερμάτων ανά άτομο, αφού πρώτα σταθμίστηκε ως προς το μέγεθος των ατόμων, παρουσιάστηκε ίση στους δύο προς μελέτη φαινότυπους. Επιπλέον, το βάρος των σπερμάτων αλλά και το % ποσοστό σπερμάτων που βλάστησαν εμφανίζονται όμοια στους δύο φαινότυπους.

	Πράσινος φαινότυπος	Ερυθρός φαινότυπος
<i>Αναπαραγωγική προσπάθεια</i>		
(Αριθμός ανθέων/άτομο)	320 ± 4	350 ± 4
<i>Επικονιαστική επιτυχία</i>		
(Αριθμός καρπών/αριθμός ανθέων)	0.48 ± 0.04	0.55 ± 0.06
(Αριθμός σπερμάτων/καρπό)	56 ± 4	53 ± 3
<i>Αναπαραγωγική επιτυχία</i>		
(Αριθμός σπερμάτων/άτομο)	8602 ± 1320	10203 ± 1300
Βάρος σπερμάτων, mg	0.57 ± 0.02	0.56 ± 0.02
Βλαστικότητα, %	55 ± 3.8	55 ± 4

Πίνακας 4.6. Αναπαραγωγική παράμετροι των πράσινων και ερυθρών φαινοτύπων κατά το έτος 2008. Οι τιμές είναι μέση τιμή ± SE από 15 πράσινα και 14 ερυθρά άτομα. Δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο φαινοτύπων για καμία από τις υπό εξέταση παραμέτρους (student's t-test). Ο αριθμός των ανθέων και σπερμάτων ανά άτομο κανονικοποιήθηκε ως προς το μέγεθος του εκάστοτε θάμνου.

5. Συζήτηση

5.1 Διακυμαινόμενη ασυμμετρία φύλλων

Η τυχαία ασυμμετρία έχει προταθεί ως ένας εύκολος και γρήγορος δείκτης της αρμοστικότητας των οργανισμών. Εκτενής μπορεί να χαρακτηριστεί η χρήση του σε εργασίες με ζωικούς οργανισμούς. Αντίθετα, στη διεθνή βιβλιογραφία παρατηρείται έλλειμμα όσον αφορά την εφαρμογή του δείκτη σε φυτά. Κομμάτι αυτού του κενού πληροφόρησης, γύρω από τη σχέση τυχαίας ασυμμετρίας και αρμοστικότητας στα φυτά, προσπάθησε η παρούσα διατριβή να καλύψει. Στόχος της ήταν να απαντήσει στο ερώτημα κατά πόσο η νεανική καταπόνηση αφήνει το αποτύπωμά της στις φωτοσυνθετικές ιδιότητες των ώριμων φύλλων. Επίσης, καταβλήθηκε προσπάθεια να διευκρινιστεί η ενδεχόμενη σχέση μεταξύ της διακυμαινόμενης ασυμμετρίας και της φωτοσυνθετικής ικανότητας.

Η εξέταση των διαφόρων φυτικών ειδών ως προς τον τύπο ασυμμετρίας των φύλλων τους κατέδειξε 7 φυτικά είδη με τυχαία ασυμμετρία (Πίνακας 4.3). Η συσχέτιση της διακυμαινόμενης ασυμμετρίας με τη φωτοσυνθετική ικανότητα (PI_{total} & F_v/F_m) που ακολούθησε, για τα είδη *P. lentiscus* και *O. europeae* ήταν θετική, για το είδος *C. siliqua* αρνητική, ενώ για τα άλλα 4 είδη (*P. alba*, *A. unedo*, *C. siliquastrum* και *P. orientalis*) δεν υπήρχε συσχέτιση.

Τα είδη *P. lentiscus* και *O. europeae* επέδειξαν θετική συσχέτιση μεταξύ διακυμαινόμενης ασυμμετρίας και φωτοσυνθετικής ικανότητας (Σχήματα 4.1 & 4.2). Τα αποτελέσματα αυτά αντιτίθενται στην αρχική υπόθεση εργασίας. Σύμφωνα με αυτήν, η τυχαία ασυμμετρία υποδηλώνει αναπτυξιακή αστάθεια και συσχετίζεται αρνητικά με την αρμοστικότητα.

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήσαμε δύο φωτοσυνθετικούς δείκτες που ενδεχομένως συνδέονται με την αρμοστικότητα. Ο δείκτης F_v/F_m είναι ανάλογος της κβαντικής απόδοσης της παγίδευσης φωτονίων και αποτελεί

μέτρο της μέγιστης φωτοχημικής ικανότητας του PSII, ενώ ο PI_{total} εκφράζει τη συνολική φωτοσυνθετική ικανότητα περιλαμβάνοντας στην ουσία την ενεργότητα και των δύο φωτοσυστημάτων. Τόσο η μέγιστη φωτοχημική ικανότητα του PSII όσο και η φωτοσυνθετική ικανότητα στο σύνολό της (δράση και των δύο φωτοσυστημάτων) εμφανίζεται αυξημένη στα πιο ασύμμετρα φύλλα του σχίνου και της ελιάς κατά τη δυσμενή χειμερινή περίοδο. Τα αποτελέσματα σε αυτά τα δύο φυτικά είδη υποδεικνύουν το φωτοσυνθετικό πλεονέκτημα που έχουν τα πιο ασύμμετρα φύλλα κατά την καταπονητική χειμερινή περίοδο του έτους. Η λειτουργία της φωτοσύνθεσης είναι κυρίως υπεύθυνη για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του κάθε φυτικού οργανισμού, τη δέσμευση του άνθρακα και την αύξηση της βιομάζας του φυτού. Έτσι θεωρητικά, όταν αυτή λειτουργεί απρόσκοπτα και αποδοτικά αναμένεται να εξασφαλίζει στο εκάστοτε φυτό τα απαραίτητα εφόδια για να είναι σε θέση αυτό να αντιμετωπίζει τις προκλήσεις του περιβάλλοντος για την επιβίωση και διαίωσή του. Άρα ενδεχομένως, η φωτοσύνθεση σχετίζεται εμμέσως με την αρμοστικότητα του κάθε φυτού. Εάν θεωρήσουμε τους φωτοσυνθετικούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν αξιόπιστους για να προσεγγίσουμε με έμμεσο τρόπο την έστω αφηρημένη έννοια της αρμοστικότητας, τότε θεωρητικώς αναμένεται αρνητική συσχέτιση μεταξύ ασυμμετρίας και φωτοσύνθεσης. Κατά αυτόν τον τρόπο, ένα φύλλο μειωμένης αρμοστικότητας θα πρέπει να εμφανίζεται και φωτοσυνθετικά υποδεέστερο. Ωστόσο, στην περίπτωση των δύο προαναφερθέντων φυτικών ειδών σημειώθηκε ακριβώς το αντίθετο. Συμπεραίνεται ότι στο σχίνο και την ελιά η καταπόνηση κατά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης ενεργοποιεί ενδεχομένως μηχανισμούς προσαρμογής με μακροπρόθεσμη επίδραση. Ως αποτέλεσμα, τα φύλλα που κατά τη νεότητά τους καταπονήθηκαν περισσότερο, επιδεικνύουν αποδοτικότερη φωτοσύνθεση κατά την ωριμότητα. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί ως μια προσαρμογή των ασύμμετρων φύλλων, όπου μέσω αύξησης της φωτοσυνθετικής τους απόδοσης, αντισταθμίζουν το ενδεχόμενο μειονέκτημα μίας ενδογενούς αναπτυξιακής αστάθειας, που οδήγησε στην ασυμμετρία

τους. Επίσης, τα παρατηρούμενα αποτελέσματα σε αυτά τα δύο φυτικά είδη μπορούν να εξηγηθούν και σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα των Walter *et al.*, 2012, όπου αναφέρουν πως η καταπόνηση που δέχονται τα φύλλα φαίνεται να αποθηκεύεται ως μια μορφή οικολογικής μνήμης. Αυτή η μνήμη, ενδεχομένως στο μέλλον να τα καθιστά ανθεκτικότερα όταν δεχθούν αντίστοιχου τύπου καταπόνηση.

Το μόνο φυτικό είδος που επιβεβαίωσε την αρχική υπόθεση εργασίας ήταν το *C. siliqua* (Σχήμα 4.7). Σε αυτό το είδος, όσο πιο ασύμμετρα ήταν τα φύλλα τόσο πιο μειονεκτικά εμφανίζονταν φωτοσυνθετικά. Ωστόσο, η πλειονότητα των ειδών που εξετάστηκαν δεν παρουσίασε συσχέτιση μεταξύ ασυμμετρίας και φωτοσύνθεσης, καταδεικνύοντας την αδυναμία της διακυμαινόμενης ασυμμετρίας να αποτελέσει ένα γενικευμένο δείκτη της αρμοστικότητας των φυτών.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δεν είναι σε θέση να υποστηρίξουν με ξεκάθαρο τρόπο τη σχέση μεταξύ της ασυμμετρίας των φύλλων και της αρμοστικότητας των φυτών, τουλάχιστον όταν η τελευταία εκτιμάται με βάση τη φωτοσύνθεση. Αντίθετα, περιπλέκουν ακόμη περισσότερο την ήδη υπάρχουσα ασαφή εικόνα που επικρατεί στη σχετική με την ασυμμετρία βιβλιογραφία (Parsons, 1992; Freeman *et al.*, 1993; Palmer, 1994). Οι Roy και Stanton (1999) με το πειραματόφυτο *Sinapis arvensis* παρουσίασαν αποτελέσματα παρόμοια με της παρούσας διατριβής. Συγκεκριμένα, η ασυμμετρία του κάθε χαρακτήρα που εξετάστηκε (πέταλα και φύλλα) επηρεαζόταν με διαφορετικό τρόπο από τον εκάστοτε περιβαλλοντικό παράγοντα ή συνδυασμό παραγόντων. Έτσι, το φαινοτυπικό αποτέλεσμα της εκάστοτε επίδρασης εξαρτάται από το φυτικό είδος, από το άτομο καθώς και από τον χαρακτήρα που εξετάζεται κάθε φορά. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τα άτομα του κάθε πληθυσμού να εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια ως προς την ασυμμετρία των χαρακτήρων που εξετάστηκαν. Έτσι, εξέφρασαν τη θέση πως η ασυμμετρία έχει ειδοειδικό χαρακτήρα και όχι γενικό. Ένα συγκεκριμένο μοντέλο ασυμμετρίας μπορεί να προκύπτει λόγω της επίδρασης σειράς

καταπονητικών παραγόντων και να εμφανίζεται σε ένα συγκεκριμένο όργανο ή ομάδα οργάνων, αλλά όχι απαραίτητα σε όλο το φυτό. Εκτός των πιο πάνω, εάν ληφθεί υπόψη και το πλήθος των καταπονητικών παραγόντων που μπορούν να επιδράσουν σε ένα χαρακτήρα, καθίσταται αντιληπτό πόσο πολύπλοκη και κατ'επέκταση δύσκολη μπορεί να αποβεί η μελέτη της ασυμμετρίας σε ένα χαρακτήρα. Έτσι, η διαφορετική εικόνα που παρατηρήθηκε στα 7 φυτικά είδη που εξετάστηκαν μπορεί ενδεχομένως να εξηγηθεί από τα πιο πάνω αφού η επίδραση των διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων στα φύλλα είχαν διαφορετική ένταση και αποτέλεσμα στον τελικό τους φαινότυπο.

Πολλές εργασίες αποτυγχάνουν να συσχετίσουν τη διακυμαινόμενη ασυμμετρία ενός χαρακτήρα με την αντίστοιχη ασυμμετρία που παρουσιάζει ένας άλλος χαρακτήρας στο ίδιο είδος. Κάποιες φορές, αυτό μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική αναπτυξιακή φάση στην οποία βρίσκεται κάθε φορά ο εκάστοτε εξεταζόμενος χαρακτήρας. Στην παρούσα διατριβή εξετάστηκαν ώριμα φύλλα παρόμοιας ηλικίας προς αποφυγήν του κινδύνου που προαναφέρθηκε. Επίσης, δεν πρέπει να λησμονείται ότι ένας οργανισμός που καταπονείται μπορεί να παρουσιάσει την τυχαία ασυμμετρία σε κάποιους χαρακτήρες του μόνο. Έτσι, η επιλογή του προς εξέταση χαρακτήρα κάθε φορά είναι καθοριστικής σημασίας.

Οι περισσότερες εργασίες που εξετάζουν τη διακυμαινόμενη ασυμμετρία επιχειρούν να αποκαλύψουν τις διαφορές που πιθανόν παρουσιάζονται εκατέρωθεν ενός άξονα ασυμμετρίας ενός χαρακτήρα. Ωστόσο, οι διαφορές αυτές είναι συνήθως πολύ μικρές (γενικά $<5\%$ και πολύ συχνά $<1\%$). Για το λόγο αυτό χρειάζεται να επιδεικνύεται ιδιαίτερη προσοχή, τόσο κατά τη λήψη των μετρήσεων, όσο και κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν (Palmer, 1994; Roy & Stanton, 1999). Στην παρούσα διατριβή όλες οι περιπτώσεις φυτών εξετάστηκαν με αυστηρή τήρηση συγκεκριμένου δειγματοληπτικού και πειραματικού πρωτοκόλλου εργασίας. Βέβαια, όταν

πρόκειται για πειράματα πεδίου, υπάρχουν αρκετές μη ελεγχόμενες από τον ερευνητή μεταβλητές και αναπόφευκτα ενισχύουν το σφάλμα μετρήσεων.

Επιπλέον, το μέγεθος του δείγματος μελέτης καθώς και η ορθή στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μιας μελέτης με αντικείμενο τη διακυμαινόμενη ασυμμετρία θεωρείται αναγκαία προϋπόθεση. Επίσης, επειδή οι τιμές της διακυμαινόμενης ασυμμετρίας που προκύπτουν είναι μικρές, το σφάλμα μετρήσεων μπορεί να αποβεί ιδιαίτερα σημαντικό. Έτσι, προς ελαχιστοποίηση του κινδύνου σφάλματος που προκύπτει συνήθως λόγω του μειωμένου αριθμού δείγματος, η παρούσα διατριβή εξέτασε εκατοντάδες φύλλα προερχόμενα από 10 τουλάχιστον ξεχωριστά άτομα την κάθε φορά. Οι τιμές ασυμμετρίας που προέκυψαν εξετάστηκαν μετέπειτα στατιστικά τόσο ως προς την ομοιογένεια όσο και ως προς την κανονικότητά τους. Τέλος, ελέγχθηκαν ως προς τον τύπο της ασυμμετρίας και συσχετίστηκαν με τους δύο δείκτες φωτοσυνθετικής απόδοσης.

Η γενετική ενδοειδική ποικιλομορφία που μπορεί να παρουσιάζεται ανάμεσα στα διαφορετικά άτομα που εξετάστηκαν, ενδεχομένως να αυξάνει το σφάλμα μετρήσεων. Στην παρούσα διατριβή δεν έγινε γενετικός έλεγχος των ατόμων που εξετάστηκαν. Στην περίπτωση όπου χρησιμοποιούνται κλώνοι ενός φυτικού ατόμου για την εξέταση της σχέσης της διακυμαινόμενης ασυμμετρίας με κάποιο ή κάποιους καταπονητικούς παράγοντες επιτυγχάνεται η μείωση του σφάλματος. Εντούτοις, η όποια εκτίμηση γίνει στην προκείμενη περίπτωση θα αφορά μόνο το συγκεκριμένο στέλεχος που εξετάστηκε. Δηλαδή, τα αποτελέσματα που θα προκύψουν δεν θα απεικονίζουν την πραγματικότητα που απαντάται στους φυσικούς πληθυσμούς παρά μόνον στον κλώνο που εξετάστηκε. Άρα, οι παρατηρήσεις που γίνονται σε ένα κλώνο μπορούν να αποβούν ριψοκίνδυνες και μη ρεαλιστικές αφού δύσκολα μπορούν να γενικευτούν (Rettig *et al.*, 1997).

Σήμερα, η αυξανόμενη γνώση για τους εξελικτικούς μηχανισμούς που διέπουν τα διάφορα βιοχημικά μονοπάτια της ανάπτυξης των οργανισμών, αφενός βοηθά σημαντικά στην κατανόηση της αναπτυξιακής λειτουργίας,

αφετέρου παρουσιάζει την τεράστια πολυπλοκότητα των εμπλεκόμενων σε αυτήν διεργασιών. Έτσι και στην περίπτωση όπου προσεγγίζεται η αναπτυξιακή λειτουργία μέσω της τυχαίας ασυμμετρίας των φύλλων, φαίνεται το εγχείρημα να είναι ενδιαφέρον, αλλά ταυτόχρονα ριψοκίνδυνο. Τελικά, μπορεί να υποστηριχθεί ότι ο δείκτης διακυμαινόμενης ασυμμετρίας των φύλλων δεν αποδεικνύεται ως ένας αξιόπιστος δείκτης της αρμοστικότητας των φυτών, τουλάχιστον όταν η τελευταία προσεγγίζεται μέσω της φωτοσυνθετικής λειτουργίας. Στις περισσότερες περιπτώσεις φυτικών ειδών που εξετάστηκαν, η τυχαία ασυμμετρία δεν συσχετίστηκε με κάποιον από τους φωτοσυνθετικούς δείκτες.

5.2 *Pistacia lentiscus*

Έχει προταθεί πως η ερυθρότητα των φύλλων μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο φωτοαναστολής του PSII λειτουργώντας ως αντιηλιακό ή/και ως αντιοξειδωτικό μέσο που εξουδετερώνει τις επιβλαβείς ενεργές ρίζες οξυγόνου, που δημιουργούνται όταν άλλοι εγγενείς αμυντικοί μηχανισμοί ξεπεραστούν. Αυτή η ανάγκη για προστασία είναι έντονη κατά τη χειμερινή περίοδο του έτους στα φυτά του μεσογειακού χώρου. Ο χειμώνας αποτελεί μια από τις δυσμενείς περιόδους του έτους με επακόλουθο να σημειώνεται αυξημένη ανάγκη για φωτοπροστασία. Στην ουσία, αυτή η ανάγκη δημιουργείται κυρίως λόγω της διαταραχής του ισοζυγίου μεταξύ εισερχόμενης ενέργειας και ενέργειας που αφομοιώνεται φωτοσυνθετικά. Κατά αυτόν τον τρόπο, ο συνδυασμός των υψηλών εντάσεων φωτός με το ψύχος που χαρακτηρίζει τη χειμερινή εποχή στο μεσογειακό χώρο, καθιστά πολλές φορές επιτακτική την ανάγκη για μέτρα που θα εξασφαλίσουν τη μείωση του κινδύνου φωτοαναστολής του PSII.

Εάν ο ρόλος των ανθοκυανινών είναι φωτοπροστατευτικός, αναμένεται η ερυθρότητα των φύλλων να συσχετίζεται θετικά με τη μέγιστη φωτοχημική

απόδοση του PSII. Οι ανθοκυανίνες απορροφούν μέρος του προσπίπτοντος φωτός, μειώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο την ενέργεια που δέχεται η φωτοσυνθετική συσκευή. Ωστόσο, στην περίπτωση του σχίνου τα φύλλα που έφεραν ανθοκυανίνες εμφάνισαν χαμηλότερη φωτοχημική απόδοση του PSII σε σχέση με τα πράσινα. Μάλιστα, όσο περισσότερο αυξανόταν η ερυθρότητα, τόσο μειωνόταν ο δείκτης φωτοχημικής απόδοσης το PSII (F_v/F_m) (Σχήμα 4.8). Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι τα ερυθρά φύλλα αντιμετωπίζουν μεγαλύτερο βαθμό χρόνιας φωτοαναστολής της φωτοσύνθεσής τους σε σχέση με τα πράσινα κατά τη χειμερινή περίοδο του έτους, δηλαδή παρουσιάζονται ως πιο ευαίσθητα στη χειμερινή καταπόνηση. Άρα, ακόμη και στην περίπτωση που οι ανθοκυανίνες διαδραματίζουν φωτοπροστατευτικό ρόλο, αυτή η προστασία φαίνεται να είναι πολύ μικρή και σε καμία περίπτωση δεν φαίνεται ικανή για να ανατρέψει τη διαγραφόμενη μειονεκτικότητα του ερυθρού έναντι του πράσινου φαινότυπου.

Σειρά εργασιών σε αειθαλή σκληρόφυλλα φυτικά είδη της Μεσογείου έδειξαν ότι, ο συνδυασμός της υψηλής φωτεινής ακτινοβολίας με το ψύχος αυξάνει τον κίνδυνο για χρόνια φωτοαναστολή της φωτοσύνθεσης (García-Plazaola *et al.*, 1999; Karavatas & Manetas, 1999; Larcher, 2000). Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία με την περίπτωση του *P. lentiscus* που εξετάστηκε, αφού διαπιστώθηκε εποχικότητα στην απόδοση της φωτοσυνθετικής συσκευής των δύο φαινοτύπων (Πίνακας 4.2). Ωστόσο, τα άτομα που έφεραν τον ανθοκυανικό χαρακτήρα στα φύλλα τους παρουσιάστηκαν πιο ευαίσθητα στη χειμερινή καταπόνηση σε σχέση με τα πράσινα. Συμπερασματικά, η ερυθρότητα των φύλλων στο *P. lentiscus* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας δείκτης μειωμένης φωτοσυνθετικής ικανότητας ατόμων που φύονται υπό ρεαλιστικές συνθήκες πεδίου, κατά τη χειμερινή-δυσμενή περίοδο του έτους.

Η μεγαλύτερη ευαισθησία που επιδεικνύουν οι ερυθροί φαινότυποι στην καταπόνηση, υποστηρίχθηκε, επίσης, από τη συσχέτιση των επιπέδων χλωροφυλλών με τα αντίστοιχα των ανθοκυανινών. Παρατηρήθηκε ότι, όσο

οι περιεχόμενες στα φύλλα ανθοκυανίνες αυξάνονταν, τόσο οι περιεχόμενες σε αυτά χλωροφύλλες μειώνονταν (Σχήμα 4.9). Σημειώθηκε εποχιακή διακύμανση του περιεχομένου των φύλλων σε χλωροφύλλες, μια κατάσταση που έχει παρατηρηθεί και σε άλλα αιθαλή είδη. Αυτό φαίνεται να εξηγείται ως μια απόκριση των φυτών στην προσπάθεια που καταβάλλουν ώστε να μειώσουν την πιθανότητα υπερδιέγερσης της φωτοσυνθετικής συσκευής όταν δέχεται περίσσεια φωτεινής ενέργειας (Kyparissis *et al.*, 1995; Varone & Gratani, 2007). Συμπληρωματικά με το πιο πάνω, θα μπορούσε να σημειωθεί άνοδος της συγκέντρωσης μη φωτοσυνθετικών χρωστικών όπως είναι οι ανθοκυανίνες, που θα αποσπούσαν μέρος της επιβλαβούς περίσσειας ενέργειας που εισέρχεται στο φωτοσυνθετικό σύστημα. Ωστόσο, ακόμη και στην περίπτωση που ισχύει αυτή η συνδυασμένη δράση δεν φαίνεται να είναι αρκετά αποτελεσματική. Η αναποτελεσματικότητα της δράσης των ανθοκυανινών αποδεικνύεται από το ότι ο ερυθρός φαινότυπος, παρ'όλον ότι συνθέτει ανθοκυανίνες, εμφανίζεται να υποφέρει από μεγαλύτερο βαθμό φωτοαναστολής της φωτοσύνθεσης σε σχέση με τον πράσινο σε συνθήκες χειμερινής καταπόνησης.

Σε αυτό το μέρος της διατριβής με πειραματόφυτο το *P. lentiscus* δεν επιβεβαιώθηκε ο φωτοπροστατευτικός ρόλος των ανθοκυανινών. Ωστόσο, η παρουσία τους στα ώριμα φύλλα κατά τη χειμερινή περίοδο μπορεί να εξηγηθεί μέσα από μια σειρά οικολογικών υποθέσεων που προτείνονται στη βιβλιογραφία. Η ερυθρότητα θα μπορούσε να αποτελεί ένα σήμα αποθάρρυνσης για τα φυτοφάγα έντομα (Archetti *et al.*, 2009; Archetti & Leather, 2005; Manetas, 2006). Εντούτοις, αυτό το «έντιμο» ή παραπλανητικό ερυθρό σήμα (Karageorgou *et al.*, 2008) δεν φαίνεται να μπορεί να εξηγήσει τη συσσώρευση των ανθοκυανινών στο σχίνο για το λόγο ότι, κατά την «ερυθρή» περίοδο η πίεση φυτοφαγίας που ασκείται στα φυτά από έντομα είναι ελάχιστη.

Ανεξάρτητα από τον πιθανό ρόλο ή ρόλους που διαδραματίζουν οι ανθοκυανίνες στα φύλλα του σχίνου, τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι ο

ανθοκυανικός χαρακτήρας αποτελεί έναν ευαίσθητο και αξιόπιστο δείκτη εντοπισμού ατόμων που αντιμετωπίζουν υψηλό κίνδυνο φωτοαναστολής και φωτοσυνθετική και φυσιολογική μειονεξία. Τα ευρήματα που προέκυψαν από αυτήν την εργασία αποκτούν ιδιαίτερη σημασία για το λόγο ότι αναφέρονται σε άτομα φυσικών πληθυσμών. Επίσης, αντίστοιχα αποτελέσματα εργασιών των Kytridis *et al.*, 2008, καθώς και των Zeliou *et al.*, 2009 με το πειραματόφυτο *C. creticus* το οποίο επίσης κοκκινίζει τα ώριμα φύλλα του κατά τον χειμώνα βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά της παρούσας διατριβής, επιτρέποντας κατά αυτόν τον τρόπο κάποια γενίκευση των συμπερασμάτων. Ωστόσο, η εξέταση και άλλων φυτικών ειδών όπως ο σχίνος και η λαδανιά που παρουσιάζουν το σύνδρομο ερυθρότητας των φύλλων υπό συνθήκες πεδίου, θα μπορούσε να δώσει μια ακόμη πιο ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με την χρήση της ερυθρότητας ως δείκτη «αδύναμων» ατόμων. Η ερυθρότητα των ώριμων φύλλων που εξετάστηκε στην παρούσα εργασία, δύσκολα μπορεί να παραλληλιστεί με τις περιπτώσεις ερυθρότητας σε νεαρά ή γηράσκοντα φύλλα. Αξίζει να σημειωθεί η εργασία του Sinkkonen (2008) στην οποία αναφέρει ότι η πιθανότητα απόκτησης ερυθρού χαρακτήρα στα φύλλα του φυλλοβόλου είδους *Acer platanoides* αυξάνεται όσο γηραιότερος είναι ο κλάδος που τα φέρει. Κατά αυτόν τον τρόπο, η ερυθρότητα μπορεί να αποτελέσει ένα δείκτη των γερασμένων-«αδύναμων» κλάδων.

Εν κατακλείδι, αυτό το τμήμα εργασιών απέδειξε το πόσο εύχρηστες, χρήσιμες και μη επεμβατικές μπορεί να είναι οι μετρήσεις ανακλαστικότητας στους φυτικούς ιστούς. Η πληροφορία που λαμβάνεται από τέτοιου είδους μετρήσεις, ενδεχομένως να μπορεί να αποβεί ιδιαίτερος χρήσιμη στην περίπτωση όπου το επίπεδο αναφοράς είναι το φύλλο ή ακόμη όταν εξετάζεται ένας πληθυσμός ή οικοσύστημα. Έτσι, με τη βοήθεια επίγειων ή/και δορυφορικών συστημάτων φασματοσκόπησης πιθανόν να μπορεί να εκτιμηθεί η φυσιολογική και οικολογική κατάσταση των φυτών (Hatfield *et al.*, 2008). Δηλαδή, με αυτήν την πληροφορία θα μπορούσε ίσως να καταστεί δυνατός ο εντοπισμός «αδύναμων» ατόμων σε φυσικούς πληθυσμούς και

ταυτόχρονα, όπου είναι δυνατόν, να επιτευχθεί η παρακολούθησή τους στο πέρασμα του χρόνου (environmental monitoring).

Όσον αφορά τη δεύτερη σειρά πειραμάτων με πειραματόφυτο το *P. lentiscus*, οι *in situ* μετρήσεις των διαφόρων φωτοσυνθετικών παραμέτρων έδειξαν πως ο ρυθμός αφομοίωσης του CO₂ (A) στα φυτικά άτομα που εξετάστηκαν, ανεξαρτήτως φαινοτύπου, παρουσίασε σταδιακή αύξηση από το καλοκαίρι προς το φθινόπωρο. Το ελάχιστο στη φωτοσύνθεση παρατηρήθηκε στις αρχές καλοκαιριού. Αντίθετα, οι μέγιστες τιμές σημειώθηκαν κατά το φθινόπωρο, ενώ ενδιάμεσες τιμές φωτοσύνθεσης καταγράφηκαν την άνοιξη (Πίνακας 4.3). Η αγωγιμότητα των στομάτων (g_s) ακολουθεί ένα πρότυπο που σημειώνει σταδιακή μείωση από τον Μάρτιο προς το καλοκαίρι και ακολούθως το φθινόπωρο ανακάμπτει με τις πρώτες βροχές που σημειώνονται και έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της επάρκειας σε νερό στους θάμνους. Οι προαναφερθείσες παράμετροι της φωτοσύνθεσης εμφάνισαν εποχιακό πρότυπο διακυμάνσεων που βρίσκεται σε πλήρη συμφωνία με το αντίστοιχο που παρουσιάστηκε και σε μια σειρά φυτών του Μεσογειακού χώρου (Galmés *et al.*, 2007). Στη Μεσόγειο, οι εποχές της άνοιξης και του φθινοπώρου, χαρακτηρίζονται πιο ήπιες καταπονητικά για τα φυτά σε σχέση με το χειμώνα και το καλοκαίρι. Αντίθετα, στα Μεσογειακά οικοσυστήματα χαρακτηρίζονται ως δυσμενείς περίοδοι η χειμερινή, όπου ο συνδυασμός υψηλών εντάσεων φωτός και ψύχους επηρεάζει σημαντικά τη φωτοσυνθετική απόδοση, καθώς και η θερινή περίοδος για το λόγο της ανεπάρκειας σε νερό.

Σε αυτό το στάδιο, εάν λάβουμε υπόψη το διαχωρισμό των ατόμων σε πράσινα και ερυθρά κατά τη λεγόμενη «ερυθρή» περίοδο, εμφανίζουν μειονεξία τα ερυθρά άτομα ως προς το ρυθμό αφομοίωσης του CO₂ (Πίνακας 4.4). Ο μειωμένος αυτός ρυθμός αφομοίωσης του CO₂ συνδέθηκε με χαμηλή ικανότητα καρβοξυλίωσης (CE), ενώ την ίδια στιγμή η στοματική αγωγιμότητα δεν φάνηκε να είναι περιοριστική (Σχήμα 4.11 & Πίνακας 4.3). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν χαμηλό περιεχόμενο ή/και ενεργότητα του ενζύμου Rubisco (Farquhar *et al.*, 1980). Στις μετρήσεις του περιεχομένου

αζώτου των φύλλων που ακολούθησαν τα ερυθρά φύλλα έφεραν σαφώς χαμηλότερες τιμές από τα πράσινα κατά την «ερυθρή» περίοδο (βλέπε επίσης Kytridis *et al.*, 2008). Κατά συνέπεια, σε αυτήν την περίπτωση φαίνεται πιο πιθανόν η παρατηρούμενη χαμηλή φωτοσύνθεση των ερυθρών φύλλων να οφείλεται στην ποσότητα παρά στην ενεργότητα του Rubisco. Συγκεκριμένα, υπό συνθήκες μειωμένων επιπέδων του ενζύμου Rubisco, ο κύκλος του Calvin πιθανόν δυσκολεύεται να συγχρονιστεί με τις φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης. Ο κύκλος του Calvin δεν προλαβαίνει να χρησιμοποιήσει την περίσσεια ενέργειας που συσσωρεύεται στους ενδιάμεσους φορείς και αυτό έχει ως επακόλουθο την υπερδιέγερση αυτών των φορέων, γεγονός που συμβάλλει στην αύξηση του κινδύνου για βλάβη στο PSII (Smirnoff, 1993). Αυτήν τη θέση ενισχύουν τα παρατηρούμενα αποτελέσματα από το πρώτο τμήμα εργασιών με το *P. lentiscus* όπου η μέγιστη φωτοχημική απόδοση του PSII (εκφραζόμενη ως F_v/F_m) εμφανίζεται χαμηλότερη στα ερυθρά φύλλα κατά τη χειμερινή περίοδο, αλλά όχι κατά τη φθινοπωρινή. Όλα τα πιο πάνω, συνηγορούν στο ότι η συσσώρευση των ανθοκυανινών δεν επιτυγχάνει να παρέχει πλήρη προστασία στο PSII, με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο κίνδυνος φωτοαναστολής της φωτοσύνθεσης.

Το σύνδρομο της χειμερινής ερυθρότητας των ώριμων φύλλων στο *P. lentiscus*, θα μπορούσε επίσης να εξηγηθεί και σύμφωνα με το μοντέλο ισορροπίας άνθρακα/αζώτου που προτείνουν οι Jones και Hartley (1999). Το μοντέλο αυτό βασίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ των βιοσυνθετικών μονοπατιών του σικιμικού/φαινυλοπροπανοϊκού και των πρωτεϊνών, όσον αφορά την πρόδρομη για αυτά ουσία, τη φαινυλαλανίνη. Ως εκ τούτου, στην περίπτωση της χειμερινής συσσώρευσης ανθοκυανινών στο σχίνο φαίνεται ότι, υπό συνθήκες έλλειψης αζώτου ο διαθέσιμος άνθρακας διοχετεύεται περισσότερο προς την παραγωγή φαινολικών ουσιών, άρα και ανθοκυανινών (Meyer *et al.*, 2006) παρά προς τη σύνθεση πρωτεϊνών. Κάτι τέτοιο φαίνεται να ισχύει στην περίπτωση του ερυθρού φαινότυπου το χειμώνα (Πίνακας 4.3). Επίσης, λόγω έλλειψης αζώτου, η ενεργότητα ή/και η ποσότητα της

πρωτεΐνης Rubisco παρουσιάζονται μειωμένες και παρατηρείται έτσι μειωμένος ρυθμός αφομοίωσης του CO₂ στα ερυθρά χειμερινά φύλλα (Πίνακες 4.3 & 4.4). Δηλαδή, η υψηλή δραστηριότητα του βιοσυνθετικού μονοπατιού σικιμικού/φαινυλοπροπανοϊκού μπορεί να παρέχει το πλεονέκτημα της σύνθεσης ανθοκυανινών, οι οποίες ενδεχομένως λειτουργούν ως ομπρέλα συλλογής της περίσσειας ακτινοβολίας που εισέρχεται στη φωτοσυνθετική συσκευή. Κατά αυτόν τον τρόπο μειώνεται η ενεργειακή πίεση που ασκείται στους ενδιάμεσους φορείς ενέργειας (Grace & Logan, 2000).

Συμπερασματικά, όσον αφορά αυτό το τμήμα εργασιών μπορεί να αναφερθεί πως, το σύνδρομο χειμερινής ερυθρότητας που παρουσιάζεται στο είδος *P. lentiscus*, περιλαμβάνει μειωμένα επίπεδα περιεχομένου στα φύλλα αζώτου και χαμηλά επίπεδα του ενζύμου Rubisco. Κατά συνέπεια, παρουσιάζεται περιορισμένη ικανότητα των αντιδράσεων καρβοξυλίωσης στην προσέλκυση αναγωγικής δύναμης και ηλεκτρονίων, με επακόλουθο οι ερυθροί φαινότυποι να αντιμετωπίζουν υψηλό κίνδυνο φωτοαναστολής της φωτοσύνθεσης. Εν τέλει, μπορεί να ειπωθεί πως η ανάπτυξη της ανθοκυανικής ομπρέλας δεν αποσοβεί τον κίνδυνο φωτοαναστολής της φωτοσυνθετικής συσκευής στα ερυθρά φύλλα του σχίνου. Εδώ συνηγορούν και τα αποτελέσματα των Kytridis *et al.* 2008, με το *Cistus*. Μπορεί το θέμα να γενικευτεί διότι και τα δύο φυτά κοκκινίζουν τα ώριμα φύλλα κατά το χειμώνα.

Το τελευταίο κομμάτι εργασιών με πειραματόφυτο το *P. lentiscus* της παρούσας διατριβής είναι ανεξάρτητο του ανθοκυανικού χαρακτήρα των φύλλων. Σε αυτό γίνεται μια προσπάθεια να εξεταστεί η πιθανή επίδραση του αζώτου στις λεγόμενες φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης. Σήμερα, έχει πλήρως αποδειχθεί ότι η ταχύτητα αφομοίωσης του CO₂ συσχετίζεται θετικά με το περιεχόμενο των φύλλων σε άζωτο. Παρόλα αυτά, η σχετική βιβλιογραφία στερείται εργασιών που να συσχετίζουν το περιεχόμενο σε

άζωτο με τις φωτεινές αντιδράσεις, ιδιαίτερα υπό φυσιολογικές ρεαλιστικές συνθήκες πεδίου.

Οι παράμετροι φθορισμού που υπολογίστηκαν με τη μαθηματική ανάλυση των αντίστοιχων καμπυλών ταχείας ανόδου του φθορισμού της χλωροφύλλης σύμφωνα με το JIP-test, εξετάστηκαν σε πρώτη φάση στο σύνολό τους κατά εποχή (φθινόπωρο και τέλος χειμώνα) και ανεξάρτητα από το περιεχόμενο των φύλλων σε άζωτο. Αυτή η εξέταση αποκάλυψε πως οι τιμές μερικών παραμέτρων επηρεάζονταν από την εποχή. Αυτή ήταν ορατή ιδιαίτερα για τις παραμέτρους Φ_{P_0} (η μέγιστη ανά φωτόνιο απόδοση της πρωτογενούς φωτοχημείας), Φ_{E_0} (η ανά φωτόνιο απόδοση της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το PSII στους ενδιάμεσους φορείς ηλεκτρονίων) και Ψ_{E_0} (η πιθανότητα διατήρησης της παγιδευμένης ενέργειας ως ροή ηλεκτρονίων) (Πίνακας 4.5), οι οποίες παρουσίασαν διαφορά στις τιμές που είχαν στο τέλος του χειμώνα και στις αντίστοιχες του φθινοπώρου. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές όπου παρουσιάζεται η αρνητική επίδραση του συνδυασμού υψηλής έντασης φωτός και ψύχους της χειμερινής περιόδου στη λειτουργία του PSII (García-Plazaola *et al.*, 1999; Karavatas & Manetas 1999; Larcher, 2000). Επίσης, οι παράμετροι δ_{R_0} (η πιθανότητα της μεταφοράς ηλεκτρονίων από τους ενδιάμεσους φορείς στους τελικούς αποδέκτες διαμέσου του PSI) και $1/V_I$ (το σχετικό απόθεμα των τελικών αποδεκτών του PSI) δεν εμφάνισαν την όποια διαφορά ανάμεσα στις δύο εποχές που μελετήθηκαν, υποδεικνύοντας κατά αυτόν τον τρόπο ότι η ενεργότητα του PSI επηρεάζεται σε μικρότερο βαθμό από τη χειμερινή καταπόνηση σε σχέση με το PSII (Huang *et al.*, 2010).

Παρόλο που δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ως προς τις μέσες τιμές του περιεχομένου των φύλλων σε άζωτο μεταξύ των δύο εποχών που εξετάστηκαν, το εύρος των τιμών αζώτου που μετρήθηκαν υπήρξε σημαντικό. Τα φύλλα που έφεραν τις ακραίες τιμές περιεχομένου αζώτου, θα μπορούσαν κάλλιστα να συγκριθούν με πειραματικά εργαστηριακά δεδομένα φύλλων προερχόμενων από άτομα που φύονται σε διαφορετικό μέσο ανάπτυξης.

Αφενός, τα φύλλα που περιείχαν υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου μπορούν να αντιπαραβληθούν με φύλλα που αναπτύσσονται σε συνθήκες επάρκειας αζώτου και αφετέρου, τα φύλλα που περιείχαν χαμηλές συγκεντρώσεις δύνανται να συγκριθούν με φύλλα που φύονται υπό συνθήκες ανεπάρκειας σε άζωτο (Ciompi *et al.*, 1996; Bungard *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2001; Antal *et al.*, 2010). Οι λόγοι της παρουσίας αυτών των μεγάλων φυσικών διακυμάνσεων του αζώτου στα φύλλα του σχίνου που αναπτύσσονται στο ίδιο ενδιαίτημα δεν εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή. Η μελέτη της σχέσης των παραμέτρων του φθορισμού με το περιεχόμενο στα φύλλα άζωτο, αποκάλυψε σημαντική πληροφορία για τον τρόπο επίδρασης του στοιχείου αυτού επί της λειτουργίας των φωτοσυστημάτων. Η επίδραση αυτή διαγράφεται ως εποχικά εξαρτώμενη. Συγκεκριμένα, το έλλειμμα αζώτου δεν φαίνεται να επηρεάζει την απόδοση της ροής ενέργειας και ηλεκτρονίων διαμέσου του PSII ούτε κατά την ευνοϊκή-φθινοπωρινή περίοδο (Σχήματα 4.14 A, B & Δ), αλλά ούτε και κατά την δυσμενή-χειμερινή περίοδο, όταν το εύρος συγκεντρώσεων αζώτου στα φύλλα είναι από 0.85 μέχρι 0.5 - 0.6 mmol.gDW⁻¹. Ωστόσο, στα φύλλα που οι συγκεντρώσεις του αζώτου ήταν χαμηλότερες, όλες οι σχετικές με το PSII παράμετροι (Σχήμα 4.15 A, B, Γ & Δ) εμφανίζονται μειωμένες μόνο το χειμώνα. Έτσι, υποδεικνύεται η σημασία που διαδραματίζει το άζωτο στην αποκατάσταση βλαβών των ενεργών κέντρων του PSII σε συνθήκες φωτοαναστολής (Ohad *et al.*, 1990; Aro *et al.*, 1993). Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και από άλλες εργασίες. Σε αυτές, η παράμετρος F_v/F_m δεν επηρεαζόταν αρνητικά σε συνθήκες έλλειψης αζώτου μέχρι τη στιγμή όπου το έλλειμμα αζώτου έφτανε σε μια κατώφλια τιμή (Nunes *et al.*, 1993).

Αντίθετα με τα όσα παρατηρήθηκαν στη σχέση του αζώτου και της λειτουργικότητας του PSII, η αντίστοιχη σχέση με το PSI ήταν διαφορετική. Τόσο το μέγεθος της δεξαμενής τελικών αποδεκτών του PSI ($1/V_i$), όσο και η απόδοση της μεταφοράς ηλεκτρονίων από τους ενδιάμεσους φορείς προς τους τελικούς αποδέκτες διαμέσου του PSI (δR_0), περιορίζονται από την έλλειψη αζώτου ανεξαρτητως εποχής (Σχήματα 4.14 E, ΣΤ & 4.15 E, ΣΤ). Εκτός από το

παραπάνω, η παρούσα εργασία απέδειξε τη διαφορετική επίδραση που έχει το έλλειμμα αζώτου επί των δύο φωτοσυστημάτων, με την επίδραση στο PSII να είναι εποχιακά εξαρτώμενη.

Οι Antal *et al.* (2010), παρατήρησαν ότι ταυτόχρονα με την ποσοτική μείωση του ενζύμου ρεδουκτάση της NADP⁺-φερρεδοξίνης σημειωνόταν και αύξηση της κυκλικής ροής ηλεκτρονίων στα άτομα του *Phaseolous vulgaris* που υπέφεραν από έλλειψη αζώτου. Επίσης, οι Yiotis και Manetas (2010) εξέφρασαν τη θέση πως η αυξημένη δραστηριότητα της κυκλικής ροής ηλεκτρονίων γύρω από το PSI συνδέεται θετικά και με μειωμένη γραμμική ροή ηλεκτρονίων καθώς και με χαμηλά επίπεδα τελικών αποδεκτών ηλεκτρονίων της δεξαμενής αυτού του φωτοσυστήματος. Τα ευρήματα αυτών των εργασιών, εάν συνδυαστούν με τα ευρήματα της παρούσας διατριβής είναι σε θέση να δομήσουν το εξής σενάριο: η μειωμένη ποσότητα τελικών αποδεκτών ηλεκτρονίων στο PSI προκαλεί εντονότερη λειτουργία της κυκλικής ροής ηλεκτρονίων, η οποία με τη σειρά της δρα ανταγωνιστικά σε σχέση με τη δημιουργία επιβλαβών ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται ο βαθμός της χρόνιας φωτοαναστολής της φωτοσύνθεσης σε φυτά που υποφέρουν από έλλειψη αζώτου και τα οποία εμφανίζουν χαμηλό ρυθμό αφομοίωσης του CO₂.

Συμπερασματικά, ολοκληρώνοντας αυτό το κομμάτι εργασιών μπορεί να ειπωθεί ότι, η έλλειψη αζώτου επηρεάζει επιλεκτικά και αρνητικά το PSI, ενώ η αρνητική του επίδραση επί του PSII περιορίζεται μόνο κατά τη δυσμενή περίοδο του έτους. Εάν τα προτεινόμενα αποτελέσματα συνδυαστούν, με τα αντίστοιχα εργασιών που αναφέρθηκαν πιο πάνω, είναι σε θέση να περιγράψουν μια συμπεριφορά προσαρμογής των φυτών. Αυτή καθίσταται δυνατή μέσω της εξισορροπημένης σχέσης της γραμμικής με την κυκλική ροή ηλεκτρονίων. Αυτή η σχέση ισορροπίας συμβάλλει καθοριστικά στην προσπάθεια που καταβάλλει ο φυτικός οργανισμός για να αντεπεξέλθει στα χαμηλά επίπεδα της δεξαμενής τελικών αποδεκτών του PSI που δημιουργούνται σε συνθήκες έλλειψης αζώτου.

5.3 *Cistus creticus*

Κοιτώντας από εξελικτική σκοπιά τη συσσώρευση των ανθοκυανινών σε άτομα της λαδανιάς, αναμένεται η παρουσία τους να παρέχει κάποιο πλεονέκτημα σε αυτά έτσι ώστε να δικαιολογείται η ενεργειακή «σπατάλη» που έγινε από το φυτό για την κατασκευή αυτών των χρωστικών. Η παρούσα διατριβή ασχολήθηκε εκτός των άλλων, με τη σχέση της ερυθρότητας των ώριμων φύλλων του *C. creticus* με μια σειρά αναπαραγωγικών παραμέτρων. Η αναπαραγωγή είναι η κατ' εξοχήν βιολογική λειτουργία που επηρεάζεται από τις διάφορες εξελικτικές πιέσεις και αποτελεί δε το βασικό διαβατήριο μέσω του οποίου το εκάστοτε είδος εξασφαλίζει τη διαίωσή του.

Οι δύο φαινότυποι του *C. creticus* δεν παρουσίασαν διαφορές σε συνιστώσες της αναπαραγωγής τους, αφού τόσο η αναπαραγωγική προσπάθεια όσο και η αναπαραγωγική επιτυχία τους, καθώς και το βάρος και η βλαστικότητα των σπερμάτων τους εμφανίστηκε παρόμοια (Πίνακας 4.6). Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, δεν μπορεί να υποστηριχθεί η υπεροχή κάποιου εκ των δύο φαινοτύπων όσον αφορά την αναπαραγωγική λειτουργία.

Εργασίες του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Φυτών του Πανεπιστημίου Πατρών που προηγήθηκαν στο ίδιο πειραματόφυτο, κατέδειξαν καθαρά τη φωτοσυνθετική υπεροχή του πράσινου φαινότυπου έναντι του ερυθρού μόνο κατά την «ερυθρή» περίοδο του έτους. Επίσης, βρέθηκε μικρότερο μέγεθος της δεξαμενής συστατικών του κύκλου των ξανθοφυλλών στα ερυθρά άτομα σε σχέση με τα πράσινα, τόσο κατά την περίοδο της άνοιξης όσο και κατά τη χειμερινή εποχή του έτους. Επίσης, οι μετρήσεις του περιεχομένου αζώτου στα φύλλα έδειξαν ότι ο ερυθρός φαινότυπος διαθέτει λιγότερο άζωτο έναντι του πράσινου αποτελώντας κατά αυτόν τον τρόπο ένδειξη της χαμηλότερης φωτοσυνθετικής ικανότητας των ερυθρών φύλλων το χειμώνα (Kytridis *et al.*, 2008).

Η χαμηλότερη ενεργότητα της γραμμικής ροής ηλεκτρονίων στη φωτοσύνθεση των ερυθρών ατόμων του *C. creticus*, βρίσκεται σε συμφωνία με τις μετρήσεις που έδειξαν χαμηλές συγκεντρώσεις περιεχομένου αζώτου σε αυτά τα άτομα. Εάν, ακολούθως, η πληροφορία αυτή συνδυαστεί με το ότι ο ερυθρός φαινότυπος παρουσιάζει μικρότερο μεγέθους δεξαμενής με συστατικά του κύκλου των ξανθοφυλλών, καθώς και το ότι αδυνατεί να αυξήσει αυτά τα επίπεδα την καταπονητική περίοδο, υποδηλώνεται έτσι η ευαισθησία του ερυθρού φαινότυπου έναντι της φωτοαναστολής και της οξειδωτικής καταπόνησης. Αυτό παρατηρείται για το λόγο ότι η μειωμένη παρουσία συστατικών του κύκλου των ξανθοφυλλών δημιουργεί αδυναμία μη φωτοχημικής απόσβεσης της περίσσειας της απορροφώμενης ενέργειας. Οι ανθοκυανίνες σε αυτήν την περίπτωση, όπως και στο *P. lentiscus*, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ένας οπτικός δείκτης ατόμων με χαμηλό περιεχόμενο σε άζωτο.

Επίσης, μετρήσεις φθορισμού της χλωροφύλλης που έγιναν στη λαδανιά από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας, απέδειξαν τη μειονεκτικότητα του ερυθρού έναντι του πράσινου φαινότυπου σε μια σειρά παραμέτρων που αναλύθηκαν σύμφωνα με το JIP-test και συνδέονται με τη φωτοχημική απόδοση της απορροφώμενης φωτεινής από τη φωτοσυνθετική συσκευή ενέργειας. Συγκεκριμένα, βρέθηκε πως το μέγεθος της δεξαμενής των τελικών αποδεκτών ηλεκτρονίων στο PSII ήταν μειωμένο στα ερυθρά άτομα σε σχέση με τα πράσινα τη χειμερινή περίοδο. Εν τέλει, μπορεί να λεχθεί πως η φωτοσυνθετική μηχανή του κόκκινου φαινότυπου εμφανίζεται πιο ευαίσθητη στη χειμερινή καταπόνηση σε σχέση με την αντίστοιχη ευαισθησία του πράσινου φαινότυπου. Άρα, η σύνθεση των ανθοκυανινών δεν φαίνεται ικανή να μπορεί να εξαλείψει τη μειονεκτικότητα που εμφανίζει ο ερυθρός φαινότυπος κατά τη δυσμενή περίοδο του έτους (Zelieu *et al.*, 2009). Ωστόσο, η συγκέντρωση των ανθοκυανινών δύναται να αποφέρει κάποια προστασία, μέσω της απορρόφησης μέρους της περίσσειας ενέργειας και της αύξησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Σε καμία όμως περίπτωση δεν επιτυγχάνεται η

φωτοσυνθετική εξίσωση του ερυθρού με τον πράσινο φαινότυπο (Zeliou *et al.*, 2009).

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα των εργασιών των Kytridis *et al.* (2008) και Zeliou *et al.* (2009), σε σχέση με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, αποκαλύπτουν φωτοσυνθετική κατωτερότητα του ερυθρού φαινότυπου κατά τη χειμερινή εποχή. Επίσης, εντοπίζεται η αδυναμία του ερυθρού φαινότυπου σε επίπεδο της φυσιολογίας του, που ενδεχομένως συνδέεται με τα μειωμένα επίπεδα περιεχόμενου αζώτου. Αυτή η φυσιολογική και φωτοσυνθετική κατωτερότητα δεν φαίνεται να μεταφράζεται σε αναπαραγωγική μειονεξία των ερυθρών ατόμων. Αυτό ενδεχομένως να υποδεικνύει ότι ο παρατηρούμενος βαθμός έλλειψης αζώτου και η αντίστοιχη μείωση της φωτοσυνθετικής ικανότητας δεν οδηγούν τον περιεχόμενο άνθρακα σε τόσο περιοριστικά επίπεδα ώστε να επηρεάζεται η αναπαραγωγική προσπάθεια και η αναπαραγωγική επιτυχία.

6. Επιγραμματικά συμπεράσματα

6.1 Διακομινόμενη ασυμμετρία και φωτοσυνθετική ικανότητα

- ♦ Αδυναμία της ΔA να αποτελέσει ένα γενικευμένο δείκτη της αρμοστικότητας των φυτών, τουλάχιστον όταν η τελευταία εκτιμάται με βάση τη φωτοσύνθεση.
- ♦ Η σχέση της ΔA με τη φωτοσύνθεση μπορεί να χαρακτηριστεί ως ειδοεξαρτώμενη.
- ♦ Η απόλυτη τιμή της ασυμμετρίας στα φύλλα μπορεί να επηρεάζει τον τρόπο συσχέτισής της με τους φωτοσυνθετικούς δείκτες PI_{total} και F_v/F_m που προτάθηκαν στην παρούσα διατριβή.
- ♦ Η καταπόνηση που δέχονται τα φύλλα φαίνεται να αποθηκεύεται ως μια μορφή οικολογικής μνήμης. Αυτή η μνήμη, ενδεχομένως στο μέλλον να τα καθιστά ανθεκτικότερα όταν δεχθούν αντίστοιχου τύπου καταπόνηση.

6.2 *Pistacia lentiscus*

- ♦ Τα ερυθρά φύλλα αντιμετωπίζουν μεγαλύτερο βαθμό χρόνιας φωτοαναστολής της φωτοσύνθεσής τους σε σχέση με τα πράσινα, κατά τη δυσμενή περίοδο του έτους.
- ♦ Η ερυθρότητα των ώριμων φύλλων φαίνεται να μην είναι ικανή να ανατρέψει τη διαγραφόμενη μειονεκτικότητα του ερυθρού έναντι του πράσινου φαινότυπου.
- ♦ Η ερυθρότητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης μειωμένης φωτοσυνθετικής ικανότητας ατόμων στο πεδίο.

- ♦ Ο φωτοπροστατευτικός ρόλος των ανθοκυανινών στο σχίνο δεν επιβεβαιώθηκε από τα ευρήματα της παρούσας διατριβής.
- ♦ Οι ανθοκυανίνες στο *P. lentisus* μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ένας οπτικός δείκτης ατόμων με χαμηλό περιεχόμενο σε άζωτο.
- ♦ Ο ρυθμός αφομοίωσης του CO₂ (A) και η αγωγιμότητα των στομάτων (g_s) εμφανίζουν εποχικό πρότυπο διακυμάνσεων των τιμών τους.
- ♦ Τα ερυθρά άτομα μειονεκτούν φωτοσυνθετικά των πράσινων ατόμων κατά την ερυθρή περίοδο του έτους αφού εμφανίζουν μειωμένες τιμές της παράμετρου του ρυθμού αφομοίωσης του CO₂ (A). Επίσης, την ίδια περίοδο παρουσιάζουν χαμηλό περιεχόμενο στα φύλλα τους σε άζωτο, μειωμένη ικανότητα καρβοξυλίωσης και παρόμοιους στοματικούς περιορισμούς στη φωτοσύνθεση, συγκρινόμενα πάντοτε με τα πράσινα άτομα.
- ♦ Το έλλειμμα αζώτου επηρεάζει επιλεκτικά και αρνητικά το PSI, ενώ η αρνητική του επίδραση επί του PSII περιορίζεται μόνο κατά τη δυσμενή περίοδο του έτους.

6.3 *Cistus creticus*

- ♦ Η φυσιολογική και φωτοσυνθετική κατωτερότητα των ερυθρών ατόμων δεν μεταφράζεται σε αναπαραγωγική μειονεξία τους έναντι των πράσινων.
- ♦ Οι ανθοκυανίνες στο *C. creticus* μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ένας οπτικός δείκτης ατόμων με χαμηλό περιεχόμενο σε άζωτο.

7. Βιβλιογραφία

- Allen, SE. **1989**. Chemical analysis of ecological materials. Blackwell-Oxford.
- Ambo-Rappe R, Lajus DL, & Schreider, MJ. **2008**. Increased heavy metal and nutrient contamination does not increase fluctuating asymmetry in the seagrass *Halophila ovalis*. *Ecological indicators* 8:100-103.
- Antal T, Mattila H, Hakala-Yatkin M, Tyystjärvi T, & Tyystjärvi, E. **2010**. Acclimation of photosynthesis to nitrogen deficiency in *Phaseolus vulgaris*. *Planta* 232:887-898.
- Archetti M, & Leather, SR. **2005**. A test of the coevolution theory of autumn colours: Colour preference of *Rhopalosiphum padi* on *Prunus padus*. *Oikos* 110:339-343.
- Archetti M, Döring TF, Hagen SB, Hughes NM, Leather SR, Lee DW, Lev-Yadun S, Manetas Y, Ougham HJ, Schaberg PG, & Thomas, H. **2009**. Unravelling the evolution of autumn colours: an interdisciplinary approach. *Trends in Ecology & Evolution* 24:166-173.
- Aro EM, Virgin I, & Andersson, B. **1993**. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1143:113-134.
- Bañuelos MJ, Sierra M, & Obeso, JR. **2004**. Sex, secondary compounds and asymmetry. Effects on plant-herbivore interaction in a dioecious shrub. *Acta Oecologica* 25:151-157.
- Baraza E, Gómez JM, Hódar JA, & Zamora, R. **2004**. Herbivory has a greater impact in shade than in sun: response of *Quercus pyrenaica* seedlings to multifactorial environmental variation. *Canadian Journal of Botany* 82:357-364.

- Barker DH, Seaton GGR, & Robinson, SA. **1997**. Internal and external photoprotection in developing leaves of the CAM plant *Cotyledon orbiculata*. *Plant, Cell & Environment* 20:617-624.
- Bennett RN, & Wallsgrave, RM. **1994**. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* 127:617-633.
- Black-Samuelsson S, & Andersson, S. **2003**. The effect of nutrient stress on developmental instability in leaves of *Acer platanoides* (Aceraceae) and *Betula pendula* (Betulaceae). *American Journal of Botany* 90:1107-1112.
- Bopp, M. **1959**. Über die Bildung von Anthocyan und Leucoanthocyan an Wundrändern. *Zeitschrift für Botanik* 47:197-217.
- Bowler C, Neuhaus G, Yamagata H, & Chua, NH. **1994**. Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* 77:73-81.
- Bungard RA, McNeil D, & Morton, JD. **1997**. Effects of nitrogen on the photosynthetic apparatus of *Clematis vitalba* grown at several irradiances. *Australian Journal of Plant Physiology* 24:205-214.
- Burger J, & Edwards, GE. **1996**. Photosynthetic efficiency, and photodamage by UV and visible radiation, in red versus green leaf coleus varieties. *Plant & Cell Physiology* 37:395-399.
- Chalker-Scott, L. **1999**. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry & Photobiology* 70:1-9.
- Ciampi S, Gentili E, Guidi L, & Soldatini, GF. **1996**. The effect of nitrogen deficiency on leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in sunflower. *Plant Science* 118:177-184.
- Close DC, Beadle CL, Brown PH, & Holz, GK. **2000**. Cold-induced photoinhibition affects establishment of *Eucalyptus nitens* (Deane and

- Maiden) and *Eucalyptus globulus* Labill. *Trees-Structure & Function* 15:32-41.
- Cornelissen TG, & Stiling, P. **2005**. Perfect is best: low leaf fluctuating asymmetry reduces herbivory by leaf miners. *Oecologia* 142:46-56.
- Cornelissen TG, & Stiling, P. **2011**. Similar responses of insect herbivores to leaf fluctuating asymmetry. *Arthropod-Plant Interactions* 5:59-69.
- Cornelissen TG, Stiling P, & Drake, B. **2003**. Elevated CO₂ decrease leaf fluctuating asymmetry and herbivory by leaf miners on two oak species. *Global Change Biology* 10:27-36.
- Dimitriou I, Aronsson P, & Weih, M. **2006**. Stress tolerance of five willow clones after irrigation with different amounts of landfill leachate. *Bioresource Technology* 97:150-157.
- Dodd IC, Critchley C, Woodall GS, & Stewart, GR. **1998**. Photoinhibition in differently coloured juvenile leaves of *Syzygium* species. *Journal of Experimental Botany* 49:1437-1445.
- Fair JM, & Breshears, DD. **2005**. Drought stress and fluctuating asymmetry in *Quercus undulata* leaves: confounding effects of absolute and relative amounts of stress? *Journal of Arid Environments* 62:235-249.
- Fang Y, Smith MAL, & Pepin, MF. **1999**. Effects of exogenous methyl jasmonate in elicited anthocyanin-producing cell cultures of ohelo (*Vaccinium pahalae*). In *Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 35:106-113.
- Farquhar GD, von Caemmerer S, & Berry, JA. **1980**. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* 149:78-90.

- Feild TS, Lee DW, & Holbrook, NM. **2001**. Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. *Plant Physiology* 127:566-574.
- Fenster CB, & Galloway, L. **1997**. Developmental homeostasis and floral form: evolutionary consequences and genetic basis. *International Journal of Plant Sciences* 158:121-130.
- Freeman DC, Brown ML, Duda JJ, Emlen JM, Graham JH, Krzysik A, Balbach H, Kovacic DA, & Zak, JC. **2004**. Developmental instability in *Rhus copallinum* L.: multiple stressors, years, and responses. *International Journal of Plant Sciences* 165:53-63.
- Freeman DC, Graham JH, & Emlen, JM. **1993**. Developmental stability in plants: symmetries, stress and epigenesis. *Genetica* 89:97-119.
- Galmés J, Medrano H, & Flexas, J. **2007**. Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. *New Phytologist* 175:81-93.
- Gamon JA, & Surfus, JS. **1999**. Assessing leaf pigment content and activity with a reflectometer. *New Phytologist* 143:105-117.
- García-Plazaola JL, Artetxe U, & Becerril, JM. **1999**. Diurnal changes in antioxidant and carotenoid composition in the Mediterranean sclerophyll tree *Quercus ilex* L. during winter. *Plant Science* 143:125-133.
- Gitelson AA, & Merzlyak, MN. **1994**. Quantitative estimation of chlorophyll-*a* using reflectance spectra: Experiments with autumn chestnut and maple leaves. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 22:247-252.
- Gitelson AA, Merzlyak MN, & Chivkunova, OB. **2001**. Optical properties and nondestructive estimation of anthocyanin content in plant leaves. *Photochemistry & Photobiology* 74:38-45.

- Gould KS, Kuhn DN, Lee DW, & Oberbauer, SF. **1995**. Why leaves are sometimes red. *Nature* 378:241-242.
- Gould KS, Markham KR, Smith RH, & Goris, JJ. **2000**: Functional role of anthocyanins in the leaves of *Quintinia serrata* A. Cunn. *Journal of Experimental Botany* 51:1107- 1115.
- Gould KS, Neil S, & Vogelmann, TC. **2002**: A unified explanation for anthocyanins in leaves? *Advances in Botanical Research* 37:167-192.
- Grace SC, & Logan, BA. **2000**. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 355:1499-1510.
- Grace SC, Logan BA, & Adams, WW. **1998**. Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. *Plant Cell & Environment* 21:513-521.
- Hagen SB, Folstad I, & Jakobsen, SW. **2003**. Autumn colouration and herbivore resistance in mountain birch (*Betula pubescens*). *Ecological Letters* 6:807-811.
- Hagen SB, Ims RA, Yoccoz NG, & Sørlibråten, O. **2008**. Fluctuating asymmetry as an indicator of elevation stress and distribution limits in mountain birch (*Betula pubescens*). *Plant Ecology* 195:157-163.
- Hamilton WD, & Brown, SP. **2001**. Autumn tree colours as a handicap signal. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 268:1489-1493.
- Harborne, JB. **1976**. The anthocyanin pigments. *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*, (Harborne JB., ed), pp. 1-36. Academic Press-London.
- Hatfield JL, Gitelson AA, Schepers JS, & Walthall, CL. **2008**. Application of spectral remote sensing for agronomic decisions. *Agronomy Journal* 100:117-131.

- Hermans C, Smeyers M, Rodriguez RM, Eyletters M, Strasser RJ, & Delhay, JP. **2003**. Quality assessment of urban trees: A comparative study of physiological characterisation, airborne imaging and on site fluorescence monitoring by the OJIP-test. *Journal of Plant Physiology* 160:81–90.
- Hipskind J, Wood K, & Nicholson, RL. **1996**. Localized stimulation of anthocyanin accumulation and delineation of pathogen ingress in maize genetically resistant to *Bipolaris maydis* O. *Physiological & Molecular Plant Pathology* 49:247-256.
- Hoch WA, Zeldin EL, & McCowan, BH. **2001**. Physiological significance of anthocyanins during autumnal leaf senescence. *Tree Physiology* 21:1-8.
- Hochwender CG, & Fritz, RS. **1999**. Fluctuating asymmetry in a *Salix* hybrid system: the importance of genetic versus environmental causes. *Evolution* 53:408–416.
- Hódar, JA. **2002**. Leaf fluctuating asymmetry of Holm oak in response to drought under contrasting climatic conditions. *Journal of Arid Environment* 52:233–243.
- Hodges DM, & Nozzolillo, C. **1996**. Anthocyanin and anthocyanoplast content of cruciferous seedlings subjected to mineral nutrient deficiencies. *Journal of Plant Physiology* 147:749-754.
- Horneck DA, & Miller, RO. **1998**. Determination of total nitrogen in plant tissue. Handbook and reference methods for plant analysis, (Kalra, YP., ed), pp. 75–84. CRC Press-New York.
- Hrazdina G, Wagner GJ, & Siegelman, HW. **1978**. Sub-cellular-localization of enzymes of anthocyanin biosynthesis in protoplasts. *Phytochemistry* 17:53-56.
- Huang W, Zhang SB, & Cao, KF. **2010**. The different effects of chilling stress under moderate light intensity on photosystem II compared with

photosystem I and subsequent recovery in tropical tree species. *Photosynthesis Research* 103:175-182.

Hughes NM, & Smith, WK. **2007**. Attenuation of incident light in *Galax urceolata* (Diapensiaceae): Concerted influence of adaxial and abaxial anthocyanic layers on photoprotection. *American Journal of Botany* 94:784-790.

Jaakola L, Maatta-Riihinen K, Karenlampi S, & Hohtola, A. **2004**. Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta* 218:721-728.

Jones CG, & Hartley, SE. **1999**. A protein competition model of phenolic allocation. *Oikos* 86:27-44.

Karageorgou P, & Manetas, Y. **2006**. The importance of being red when young: Anthocyanins and the protection of young leaves of *Quercus coccifera* from insect herbivory and excess light. *Tree Physiology* 26:613-621.

Karageorgou P, Buschmann C, & Manetas, Y. **2008**. Red leaf color as a warning signal against insect herbivory: honest or mimetic? *Flora* 203:648-652.

Karavatas S, & Manetas, Y. **1999**. Seasonal patterns of photosystem 2 photochemical efficiency in evergreen sclerophylls and drought semi-deciduous shrubs under Mediterranean field conditions. *Photosynthetica* 36:41-49.

Kautsky H, & Hirsch, A. **1931**. Neue versuche zur kohlenstoffassimilation.

Kelber A, Vorobyev M, & Osorio, D. **2003**. Animal colour vision-behavioural tests and physiological concepts. *Biological Reviews* 78:81-118.

- Kozlov M, Zvereva E, & Zverev, V. **2009**. Impact of point polluters on terrestrial biota: Comparative analysis of 18 contaminated areas. (Alloway BJ, & Trevors, JT, eds), pp. 466. Springer- Finland.
- Kozlov MV, & Niemelä, P. **1999**. Difference in needle length - a new and objective indicator of pollution impact on scots pine (*Pinus sylvestris*). *Water, Air, and Soil Pollution* 116:365-370.
- Kozlov MV, Niemelä P, & Junttila, J. **2002**. Needle fluctuating asymmetry is a sensitive indicator of pollution impact on Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Ecological Indicators* 1:271-277.
- Kozlov MV, Wilsey BJ, Koricheva J, & Haukioja, E. **1996**. Fluctuating asymmetry of birch leaves increases under pollution impact. *Journal of Applied Ecology* 33:1489-1495.
- Krol M, Gray GR, Hurry VM, Oquist G, Malek L, & Huner, NPA. **1995**. Low-temperature stress and photoperiod affect an increased tolerance to photoinhibition in *Pinus banksiana* seedlings. *Canadian Journal of Botany* 73:1119-1127.
- Krüger GHJ, Tsimilli-Michael M, & Strasser, RJ. **1997**. Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in camellia leaves. *Physiologia Plantarum* 101:265-277.
- Kumar V, & Sharma, SS. **1999**. Nutrient deficiency-dependent anthocyanin development in *Spirodela polyrhiza* L. Schleid. *Biologia Plantarum* 42:621-624.
- Kyparissis A, Grammatikopoulos G, & Manetas, Y. **2007**. Leaf morphological and physiological adjustments to the spectrally selective shade imposed by anthocyanins in *Prunus cerasifera*. *Tree Physiology* 27:849-857.
- Kyparissis A, Petropoulou Y, & Manetas, Y. **1995**. Summer survival of leaves in a soft-leaved shrub (*Phlomis fruticosa* L., Labiatae) under

Mediterranean field conditions: Avoidance of photoinhibitory damage through decreased chlorophyll contents. *Journal of Experimental Botany* 46:1825-1831.

Kytridis VP, & Manetas, Y. **2006**. Mesophyll versus epidermal anthocyanins as potential in vivo antioxidants: Evidence linking the putative antioxidant role to the proximity of oxy-radical source. *Journal of Experimental Botany* 57: 2203-2210.

Kytridis VP, Karageorgou P, Levizou E, & Manetas, Y. **2008**. Intra-species variation in transient accumulation of leaf anthocyanins in *Cistus creticus* during winter: Evidence that anthocyanins may compensate for an inherent photosynthetic and photoprotective inferiority of the red-leaf phenotype. *Journal of Plant Physiology* 165:952-959.

Lancaster JE, Grant JE, Lister CE, & Taylor, MC. **1994**. Skin colour in apples—Influence of copigmentation and plastid pigments on shade and darkness of red colour in five genotypes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 119: 63–69.

Larcher, W. **2000**. Temperature stress and survival ability of Mediterranean sclerophyllous plants. *Plant Biosystems* 134:279-295.

Lee DW, & Gould, KS. **2002**. Anthocyanins in leaves and other vegetative organs: An introduction. *Advances in Botanical Research* 37:1-16.

Lee DW, & Lowry, JB. **1980**. Young-leaf anthocyanin and solar ultraviolet. *Biotropica* 12:75-76.

Lee DW, Brammeier S, & Smith, AP. **1987**. The selective advantages of anthocyanins in developing leaves of mango and cacao. *Biotropica* 19:40–49.

- Lee DW, O'Keefe J, Holbrook NM, & Feild, TS. **2003**. Pigment dynamics and autumn leaf senescence in a New England deciduous forest, eastern USA. *Ecological Research* 18:677-694.
- Lee, DW. **2002**. Anthocyanins in leaves: distribution, phylogeny and development. *Advances in Botanical Research* 37:37-53.
- Lempa K, Martel J, Koricheva J, Haukioja E, Ossipov V, Ossipova S, & Pihlaja, K. **2000**. Covariation of fluctuating asymmetry, herbivory and chemistry during birch leaf expansion. *Oecologia* 122:354-360.
- Leung B, Forbes MR, & Houle, D. **2000**. Fluctuating asymmetry as a bio-indicator of stress: comparing efficacy of analyses involving multiple traits. *The American Naturalist* 155:101-115.
- Lev-Yadun S, Dafni A, Flaishman MA, Inbar M, Izhaki I, Katzir G, Neeman, G. **2004**. Plant coloration undermines herbivorous insect camouflage. *BioEssays* 26:1126-1130.
- Lev-Yadun, S. **2001**. Aposematic (warning) coloration associated with thorns in higher plants. *Journal of Theoretical Biology* 210:385-388.
- Llorens L, Peñuelas J, & Emmett, B. **2002**. Developmental instability and gas exchange responses of a heathland shrub to experimental drought and warming. *International Journal of Plant Sciences* 163:959-967.
- Lu C, Zhang J, Zhang Q, Li L, & Kuang, T. **2001**. Modification of photosystem II photochemistry in nitrogen deficient maize and wheat plants. *Journal of Plant Physiology* 158:1423-1430.
- Mancinelli, AL. **1983**. The photoregulation of anthocyanin synthesis (Shropshire Jr W, & Mohr, H., eds). Photomorphogenesis, pp. 640-661. Springer-Berlin.

- Manetas Y, & Petropoulou, Y. **2000**. Nectar amount, pollinator visit duration and pollination success in the Mediterranean shrub *Cistus creticus*. *Annals of Botany* 86:815-820.
- Manetas, Y. **2006**. Why some leaves are anthocyanic and why most anthocyanic leaves are red. *Flora* 20:163–77.
- Markow, TA. **1995**. Evolutionary ecology and developmental instability. *Annual Review of Entomology* 40:105–20.
- Martel J, Lempa K, & Haukioja, E. **1999**. Effects of stress and rapid growth on fluctuating asymmetry and insect damage in birch leaves. *Oikos* 86:208–216.
- Maxwell K, & Johnson, GN. **2000**. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659–668.
- McClure, JW. **1975**. Physiology and functions of flavonoids (Harborne JB, Mabry TJ, & Mabry, H., eds). The Flavonoids, pp. 970–1055. Chapman & Hall Ltd-London.
- Mendez M, Jones DG, & Manetas, Y. **1999**. Enhanced UV-B radiation under field conditions increases anthocyanin and reduces the risk of photoinhibition but does not affect growth in the carnivorous plant *Pinguicula vulgaris*. *New Phytologist* 144:275-282.
- Merzlyak MN, & Chivkunova, OB. **2000**. Light-stress-induced pigment changes and evidence for anthocyanin photoprotection in apples. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 55:155-163.
- Meyer S, Cerovic ZG, Goulas Y, Montpied P, Demotes-Mainard S, Bidet LPR, Moya I, & Dreyer, E. **2006**. Relationships between optically assessed polyphenols and chlorophyll contents, and leaf mass per area ratio in woody plants: A signature of the carbon-nitrogen balance within leaves? *Plant, Cell & Environment* 29:1338-1348.

- Mittler, R. **2002**. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7:405–410.
- Mol J, Jenkins G, Schäfer E, & Weiss, D. **1996**. Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis. *Critical Reviews in Plant Sciences* 15:525–557.
- Møller, AP. **1995**. Leaf-mining insects and fluctuating asymmetry in elm *Ulmus glabra* leaves. *Journal of Animal Ecology* 64:697–707.
- Møller, AP. **1998**. Developmental instability of plants and radiation from Chernobyl. *Oikos* 81:444–448.
- Morales F, Abadía A, Abadía J, Montserrat G, & Gil-Pelegrin, E. **2002**. Trichomes and photosynthetic pigment composition changes: responses of *Quercus ilex* subsp. *Ballota* (Desf.) Samp. and *Quercus coccifera* L. to Mediterranean stress conditions. *Trees* 16:504–10.
- Müller P, Li XP, & Niyogi, K. **2001**. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology* 125:1558–66.
- Munday Jr JC, & Govindjee. **1969**. Light-induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll *a* *in vivo* III. The dip and the peak in the fluorescence transient of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biophysical Journal* 9:1-21.
- Naturwissenschaften* 19:964.
- Nick P, Ehmann B, Furuya M, & Schäfer, E. **1993**. Cell communication, stochastic cell responses, and anthocyanin pattern in mustard cotyledons. *Plant Cell* 5:541–552.
- Ntefidou M, & Manetas, Y. **1996**. Optical properties of hairs during the early stages of leaf development in *Platanus orientalis*. *Australian Journal of Plant Physiology* 23:535- 538.

- Nunes MA, Ramalho JDC, & Dias, MA. **1993**. Effect of nitrogen supply on the photosynthetic performance of leaves from coffee plants exposed to bright light. *Journal of Experimental Botany* 44:893-899.
- Ohad I, Adir N, Koike H, Kyle DJ, & Inoue, Y. **1990**. Mechanism of photoinhibition *in vivo*. A reversible light-induced conformational change of reaction center II is related to an irreversible modification of the D1 protein. *Journal of Biological Chemistry* 265:1972-1979.
- Orshan, G. **1989**. Plant pheno-morphological studies in Mediterranean type ecosystems. Kluwer-Dordrecht.
- Ort, D. **2001**. When there is too much light. *Plant Physiology* 125:29-32.
- Palmer AR, & Strobeck, C. **1986**. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, and patterns. *Annual Review of Ecology, Evolution & Systematics* 17:391-421.
- Palmer AR, & Strobeck, C. **1992**. Fluctuating asymmetry as a measure of developmental stability: Implications of non-normal distributions and power of statistical tests. *Acta Zoologica Fennica* 191:55-70.
- Palmer, AR. **1994**. Fluctuating asymmetry analyses: a primer (Markow, TA., ed). Developmental instability: its origins and evolutionary implications, pp. 355-363. Kluwer-Dordrecht.
- Papageorgiou GC, Tsimilli-Michael M, & Stamatakis, K. **2007**. The fast and slow kinetics of chlorophyll *a* fluorescence induction in plants, algae and cyanobacteria: A viewpoint. *Photosynthesis Research* 94:275-290.
- Parsons, PA. **1990**. Fluctuating asymmetry: an epigenetic measure of stress. *Biological Reviews* 65:131-145.
- Parsons, PA. **1992**. Fluctuating asymmetry: a biological monitor of environmental and genomic stress. *Heredity* 68:361-364.

- Pérez-Contreras T, Soler JJ, & Soler, M. **2008**. Needle asymmetry, pine vigour and pine selection by the processionary moth *Thaumetopoea pityocampa*. *Acta Oecologica* 33:213–221.
- Pietrini F, Ianelli MA, & Massacci, A. **2002**. Anthocyanin accumulation in the illuminated surface of maize leaves enhances protection from photo-inhibitory risks at low temperature, without further limitation to photosynthesis. *Plant Cell & Environment* 25:1251-1259.
- Prokopy RJ, & Owens, ED. **1983**. Visual detection of plants by herbivorous insects. *Annual Review of Entomology* 28:337-364.
- Puerta-Piñero C, Gómez JM, & Hódar, JA. **2008**. Shade and herbivory influence fluctuating asymmetry in a Mediterranean oak. *International Journal of Plant Sciences* 169:631–635.
- Raghvendra, Sharma V, Shakya A, Hedaytullah MD, Arya GS, Mishra A, Gupta AD, Pachpute AP, & Patel, D. **2011**. Chemical and potential aspects of anthocyanins—a water-soluble vacuolar flavonoid pigments: a review. *International Journal of Pharmaceutical Science Review & Research* 6:28-33.
- Raz S, Graham JH, Hel-Or H, Pavlicek T, & Nevo, E. **2011**. Developmental instability of vascular plants in contrasting microclimates at "Evolution Canyon". *Biological Journal of the Linnean Society* 4:786–797.
- Rettig JE, Fuller RC, Corbett AL, & Getty, T. **1997**. Fluctuating asymmetry indicates levels of competition in an even-aged poplar clone. *Oikos* 80:123-127.
- Roy BA, & Stanton, ML. **1999**. Asymmetry in wild mustard, *Sinapis arvensis* (Brassicaceae) in response to severe physiological stresses. *Journal of Evolutionary Biology* 12:440–449.

- Saito K, & Yamasaki, M. **2002**. Biochemistry and molecular biology of the late-stage of biosynthesis of anthocyanin: lessons from *Perilla frutescens* as a model plant. *New Phytologist* 155:9-23.
- Sakai KI, & Shimamoto, Y. **1965**. Developmental instability in leaves and flowers of *Nicotinia tabacum*. *Genetics* 51:801-813.
- Saunders JA, & McClure, JW. **1976**. Distribution of flavonoids in chloroplasts of 25 species of vascular plants. *Phytochemistry* 15:809-810.
- Schansker G, Tóth SZ, & Strasser, RJ. **2005**: Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl *a* fluorescence rise OJIP. *Biochimica et Biophysica Acta* 1706:250-261.
- Schroeder, M. **1991**. Fractals, chaos, power laws: Minutes from an infinite paradise (Freeman WH., *ed*). Freeman WH, & Company-New York.
- Shepherd T, & Griffiths, DW. **2006**. The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist* 171:469-499.
- Sherry RA, & Lord, EM. **1996**. Developmental stability in leaves of *Clarkia tembloriensis* (Onagraceae) as related to population outcrossing rates and heterozygosity. *Evolution* 50:80-91.
- Sinclair C, & Hoffmann, AA. **2003**. Developmental stability as a potential tool in the early detection of salinity stress in wheat. *International Journal of Plant Sciences* 164:325-331.
- Sinkkonen, A. **2008**. Red reveals branch die-back in Norway maple *Acer platanoides*. *Annals of Botany* 102:361-366.
- Smirnoff, N. **1993**. The role of active oxygen in the response of plants to water-deficit and desiccation. *New Phytologist* 125:27-58.

- Steyn WJ, Wand SJE, Holcroft DM, & Jacobs, G. **2002**. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist* 155:349–361.
- Stintzing FC, & Carle, R. **2004**. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology* 15:19-38.
- Stirbet A, & Govindjee. **2011**. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology* 104:236-257.
- Stone C, Chisholm L, & Coops, N. **2001**. Spectral reflectance characteristics of eucalypt foliage damage by insects. *Australian Journal of Botany* 49:687-698.
- Stone, BC. **1979**. Protective coloration of young leaves in certain Malaysian palms. *Biotropica* 11:126.
- Strasser RJ, Srivastava A, & Govindjee. **1995**. Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry & Photobiology* 61:32-42.
- Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, & Srivastava, A. **2004**. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. (Papageorgiou GC, & Govindjee., eds) In: Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis: Advances in photosynthesis and respiration series, pp. 321-362. Kluwer-Rotterdam.
- Sturgeon KB, & Mitten, JB. **1980**. Cone color polymorphism associated with elevation in white fir, *Abies concolor*, in southern Colorado. *American Journal of Botany* 67:1040-1045.

- Takahashi A, Takeda K, & Ohnishi, T. **1991**. Light-induced anthocyanin reduces the extent of damage to DNA in UV-irradiated *Centaurea cyanus* cells in culture. *Plant & Cell Physiology* 32:541–547.
- Tan-Kristanto A, Hoffmann A, Woods R, Batterham P, Cobbett C, & Sinclair, C. **2003**. Translational asymmetry as a sensitive indicator of cadmium stress in plants: a laboratory test with wild-type and mutant *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 159: 471–477.
- Thanos CA, & Georghiou, K. **1988**. Ecophysiology of fire stimulated seed germination in *Cistus incanus* spp *creticus* (L.) Heywood and *C. salvifolius* L. *Plant Cell & Environment* 11:841–849.
- Tóth SZ, Schansker G, & Strasser, RJ. **2007**: A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP-transient. *Photosynthesis Research* 93:193-203.
- Tracy M, Freeman DC, Emlen JM, Graham JH, & Hough, RA. **1995**. Developmental instability as a biomonitor of environmental stress. (Butterworth FM, Corkum LD, & Guzman-Rincon, J., eds). *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, pp. 314–337. Plenum Press-New York.
- Tsimilli-Michael M, & Strasser, RJ. **2008**. In vivo assessment of stress impact on plant's vitality: applications in detecting and evaluating the beneficial role of mycorrhization on host plants (Varma, A., ed). In: *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics*, pp. 679-703. Springer-Berlin.
- Valkama J, & Kozlov, MV. **2001**. Impact of climatic factors on the developmental stability of mountain birch growing in a contaminated area. *Journal of Applied Ecology* 38:665–673.

- van Heerden PDR, Tsimilli-Michael M, Krüger GHJ, & Strasser, RJ. **2003**. Dark chilling effects on soybean genotypes during vegetative development: Parallel studies of CO₂ assimilation, chlorophyll a fluorescence kinetics O-J-I-P and nitrogen fixation. *Physiologia Plantarum* 117:476-491.
- Varone L, & Gratani, L. **2007**. Physiological response of eight Mediterranean maquis species to low air temperatures during winter. *Photosynthetica* 45:385-391.
- Velickovic M, & Perisic, S. **2006**. Leaf fluctuating asymmetry of common plantain as an indicator of habitat quality. *Plant Biosystems* 140:138-145.
- Walter J, Jentsch A, Beirerkuhnlein C, & Kreyling, J. **2012**. Ecological stress memory and cross stress tolerance in plants in the face of climate extremes. *Environmental and Experimental Botany* article in press.
- Watson PJ, & Trornhill, R. **1994**. Fluctuating asymmetry and sexual selection. *Tree* 9:21-25.
- Wilsey BJ, Haukioja E, Koricheva J, & Sulkinoja, M. **1998**. Leaf fluctuating asymmetry increases with hybridization and elevation in tree-line birches. *Ecology* 79:2092-2099.
- Winkel-Shirley, B. **2002**. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5:218-223.
- Woodall GS, & Stewart, GR. **1998**. Do anthocyanins play a role in UV protection of red juvenile leaves of *Syzygium*? *Journal of Experimental Botany* 49:1447-1450.
- Wuytack T, Wuyts K, Van Dongen S, Baeten L, Kardel F, Verheyen K, & Samson, R. **2011**. The effect of air pollution and other environmental stressors on leaf fluctuating asymmetry and specific leaf area of *Salix alba* L. *Environmental Pollution* 159:2405-2411.

- Yiotis C, & Manetas, Y. **2010**. Sinks for photosynthetic electron flow in green petioles and pedicels of *Zantedeschia aethiopica*: evidence for innately high photorespiration and cyclic electron flow rates. *Planta* 232:523–531.
- 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.
- Zvereva EL, Kozlov MV, Niemelä P, & Haukioja, E. **1997**. Delayed induced resistance and increase in leaf fluctuating asymmetry as responses of *Salix borealis* to insect herbivory. *Oecologia* **109**:368–373.