

Διατριβή Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΩΝ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΕΩΝ
ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΤΟΥ *Phaseolus vulgaris***

Μαρία Κ. Σφακιανάκη

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
Ηράκλειο, 2001**

Διατριβή Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΩΝ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΕΩΝ
ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΤΟΥ *Phaseolus vulgaris***

Μαρία Κ. Σφακιανάκη

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
Ηράκλειο, 2001**

Ευχαριστίες

Μετά το τέλος του μεταπτυχιακών μου σπουδών στη Μοριακή Βιολογία και Βιοτεχνολογία Φυτών, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όσους με βοήθησαν όλο αυτό το διάστημα.

Ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Κυριάκο Κοτζαμπάση για την επιστημονική βοήθεια και την πολύτιμη ηθική υποστήριξη που μου έδωσε σε όλη την διάρκεια της μεταπτυχιακής έρευνας και τις σημαντικές υποδείξεις του σε όλα τα στάδια της συγγραφής της.

Ευχαριστώ όλους τους καθηγητές του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας φυτών και ιδιαίτερα την Καθηγήτρια Κ. Ρουμπελάκη – Αγγελάκη για την ακούραστη και συνεχή διδασκαλία της σε θέματα Φυσιολογίας Φυτών, όπως επίσης και την ενθάρρυνση που μου έδωσε στις δύσκολες στιγμές. Τον επίκουρο Καθηγητή της Χημείας Γ.Τσιώτη για την άριστη συνεργασία του στην διάρκεια εκπόνησης της 3^{ης} ερευνητικής εργασίας μου.

Την Έλενα Ναβακούδη για τις σημαντικές υποδείξεις και συμβουλές της καθώς και την υπομονή της κατά τη διάρκεια των ερευνών μου στο εργαστήριο της Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας. Τον Νίκο Ασούτη και τον Μιχάλη Αϊβαλιώτη για την τεχνική και επιστημονική τους βοήθεια στην διάρκεια των ερευνητικών μου εργασιών (rotations). Τους συνεργάτες και φίλους μου στο εργαστήριο Liliana Sfichi, Νίκο Ιωαννίδη, Κώστα Λογοθέτη και Κατερίνα Βρέντζου για την συνεργασία τους και την καλή παρέα τους. Τους συμφοιτητές μου Μαρία Ζερβού, Γιάννη Ντελή, Δημήτρη Κότση και Δάκη Σκοπελίτη για τη όμορφη φιλική μας σχέση που έκανε ευχάριστα τα μαθήματα και τις εξετάσεις του μεταπτυχιακού προγράμματος. Τους συναδέλφους μου καθηγητές Καλλιόπη Κατσιρντάκη και Μανόλη Κριτσωτάκη για την εμπύχωση και το κουράγιο που μου έδωσαν στη αρχή των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Τον αδελφό μου Αριστοτέλη και τον ξάδελφο μου Κώστα Κωνσταντάκη για τη βοήθεια τους σε τεχνικά θέματα πληροφορικής. Τέλος ευχαριστώ την οικογένεια μου (τον άνδρα μου Ανέστη, τα παιδιά μου Χρήστο και Γεωργία και τους γονείς μου) για την υλική και ηθική στήριξη που μου έδωσαν σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Στους γονείς μου

Στον Ανέστη

Στο Χρήστο

Στη Γεωργία

Περιεχόμενα

	Σελίδες
Εισαγωγή	1 - 7
Υλικά και μέθοδοι	8 -15
Αποτελέσματα και συζήτηση	16 - 47
Συμπεράσματα	48
Βιβλιογραφία	49 -56

Εισαγωγή

Η θερμοκρασία είναι ένας από τους σημαντικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες που επηρεάζει τα φυτά σε όλα τα φυσιολογικά στάδια της ανάπτυξης τους, από τη βλάστηση των σπόρων ως την πλήρη ωρίμανση των καρπών τους (Went, 1961). Για κάθε φυτικό είδος υπάρχει ελάχιστη, άριστη και μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης. Οι χαμηλές θερμοκρασίες, που στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται ως chilling, είναι το όριο της θερμοκρασίας που οι φυτικοί ιστοί δεν παγώνουν. Εδώ και 70 περίπου χρόνια έχει αναφερθεί ότι αυτές οι θερμοκρασίες επηρεάζουν την φυσιολογία των φυτών (Faris, 1926). Πολλοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με την επίδραση των χαμηλών θερμοκρασιών στην οργάνωση και δομή των φωτοσυνθετικών ιστών στα σιτηρά, το καλαμπόκι, την τομάτα, το φασόλι και τα κολοκυνθοειδή (Taylor et al., 1971). Τα αποτελέσματα των εργασιών δείχνουν ότι οι βλάβες, που προκαλούνται, είναι διαφορετικές ανάμεσα στα διάφορα είδη φυτών και πολλές φορές ανάμεσα στα γένη ή τις ποικιλίες του ίδιου είδους (Haldimann, 1999). Η χαμηλή θερμοκρασία συμβάλλει στη μείωση της ενεργότητας των ενζύμων και στη μείωση της μεταφοράς των ηλεκτρονίων στις φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης (Baker, 1994; Leegood and Edwards, 1996). Μειωμένη ενζυμική ενεργότητα των ενζύμων στους χλωροπλάστες οδηγεί σε απορρύθμιση της αποδοτικότητας της ηλεκτρονιακής μεταφοράς του φωτοσυστήματος II (PSII) (Stamp, 1987).

Υπάρχουν φυτά με μεγάλη ευαισθησία στη χαμηλή θερμοκρασία (extremely chilling-sensitive) όπως τα *Saintpaulia ionantha* και *Vinga radiata*, όπου η επίδραση του κρύου μπορεί να οδηγήσει ακόμα και σε πλασμόλυση του κυττάρου (Yun et al., 1996). Άλλα φυτά είναι λιγότερο ευαίσθητα στο κρύο (less chilling-sensitive) και έχουν καθυστερημένη αντίδραση, όπως τα *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, και *Zea mays* (Gemel et al., 1986, Wise et al., 1983). Στα ευαίσθητα αυτά είδη, οι χαμηλές θερμοκρασίες συνεισφέρουν στην αδυναμία των στομάτων να κλείσουν και στην αύξηση της συστροφής των φύλλων (Guye and Wilson, 1987). Στην τελευταία κατηγορία βρίσκονται τα ανθεκτικά φυτά (chilling resistant), όπως τα *Secale cereale*, *Spinacia oleracea* και *Triticum aestivum*, στα οποία σπάνια παρατηρούνται

συμπτώματα η φθορές στους ιστούς (O'Neil et al., 1981, Huner et al., 1993). Τα φυτά αυτά έχουν μεγαλύτερη φωτοσυνθετική δραστηριότητα, αυξημένη συνολική χλωροφύλλη (Chl) και μεγαλύτερο λόγο Chla/Chlb σε σχέση με τα ευαίσθητα φυτά τις ίδιες χαμηλές θερμοκρασίες (Oquist et al., 1993; Haldimann, 1999).

Φύλλα ορισμένων φυτών, που αναπτύσσονται σε χαμηλή θερμοκρασία, (κάτω από 15⁰C), χαρακτηρίζονται από χαμηλή φωτοσυνθετική ικανότητα (Haldimann et al., 1996), διαφορετική σύσταση χρωστικών (Stamp et al., 1983; Haldimann et al., 1995) και μειωμένη ανάπτυξη του χλωροπλάστη (Kimball and Salisbury, 1973; Robertson et al., 1993). Το φαινόμενο της χλώρωσης παρατηρήθηκε σε συνθήκες συνδυασμού αυξανόμενης έντασης ακτινοβολίας και χαμηλής θερμοκρασίας (Berry and Bjorkman, 1980), πιθανόν λόγω φωτοοξειδωσης της χλωροφύλλης (Taylor and Graig, 1971; Wise, 1995). Άλλες επιπτώσεις της χαμηλής θερμοκρασίας είναι η διόγκωση του χλωροπλάστη, η παραμόρφωση των θυλακοειδών και η διαφοροποίηση της σύστασης τους (Robertson et al., 1993; Brendekamp and Baker, 1994). Ανάλογη διαφοροποίηση παρατηρείται στο μέγεθος και στον αριθμό των αμυλόκοκκων (Gemel et al., 1986). Η ανατομία του φύλλου και γενικά η δομή των χλωροπλαστών δεν έχει αποδειχθεί να είναι σημαντικά διαφορετική από εκείνα φύλλων, που αναπτύσσονται σε κανονικές συνθήκες θερμοκρασίας (Robertson et al., 1993).

Γενετικοί παράγοντες και παράγοντες του περιβάλλοντος, όπως η ένταση του φωτός και η σχετική υγρασία, αλληλεπιδρούν με το κρύο είτε ενισχύοντας την ζημιά, είτε προστατεύοντας το απ' αυτό. Το φως επηρεάζει τη φωτοσύνθεση κατά τη διάρκεια του κρύου, αλλά εξαρτάται παράλληλα από την ένταση της ακτινοβολίας και τη διακύμανση της θερμοκρασίας (Baker, 1994). Η χαμηλή θερμοκρασία μειώνει το ποσοστό αφομοίωσης του CO₂ και το ποσοστό του φωτοσυνθετικά εκλυόμενου O₂ (Nie and Baker, 1991). Έχει αναφερθεί ότι η χαμηλή θερμοκρασία συντελεί στο άνοιγμα των στομάτων τη νύχτα, τα οποία κλείνουν αργότερα την ημέρα (Honour et al., 1995).

Η έκθεση των φυτών σε φωτεινή ένταση μεγαλύτερη από αυτή, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη φωτοσύνθεση ή να διαχυθεί σε άλλη κατεύθυνση, επιβαρύνει το φωτοσυνθετικό μηχανισμό (Powles, 1984;

Krause, 1988). Αυτό το φαινόμενο είναι γνωστό ως φωτοαναστολή και η χαμηλή θερμοκρασία ενισχύει αυτήν την διαδικασία (Long et al., 1983; Somersalo and Krause, 1989; Nie et al., 1992). Όταν η θερμοκρασία μειώνεται, η ενεργότητα των ενζύμων του κύκλου του Calvin μειώνεται έτσι, ώστε να μην συμμετέχουν θετικά στην αξιοποίηση της ενέργειας, συμβάλλοντας έτσι στην αύξηση της φωτοαναστολής (Baker et al., 1988). Όλοι οι παράγοντες, που προκαλούν μείωση της φωτοσυνθετικής διαδικασίας μπορούν να αυξήσουν τη φωτοαναστολή (Oquist et al., 1987). Ο πρωταρχικός στόχος της φωτοαναστολής είναι το PSII (Powles, 1984), όμως τελευταίες έρευνες απόδειξαν ότι στα φύλλα του ευαίσθητου στη χαμηλή θερμοκρασία φυτού *Cucumis sativus* το PSI και όχι το PSII επηρεάζεται πρώτο από την φωτοαναστολή, που προκαλείται (Terishima et al., 1994). Σ' αυτά τα φυτικά είδη, η ποσότητα της ακτινοβολίας που απαιτείται για να γίνει φωτοαναστολή στο PSI είναι χαμηλότερη από αυτή που χρειάζεται για το PSII. Σύμφωνα επίσης και με τους Hodgson et al. (1989), ο μηχανισμός επίδρασης του κρύου στην αναστολή της φωτοσύνθεσης δεν επηρεάζει το φωτοσύστημα II. Η αναστολή παρατηρείται σε ευαίσθητα φυτά και κατά κάποιο τρόπο υπάρχει ανάλογη μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας αυτών των φυτών σε χαμηλές θερμοκρασίες. Όταν η θερμοκρασία δεν είναι πολύ χαμηλή, η βλάβη που προκαλείται απ' αυτήν είναι μικρότερη και η ανάκαμψη της φωτοσύνθεσης, όταν τα φυτά μεταφερθούν σε υψηλότερη θερμοκρασία, είναι γρηγορότερη, ιδιαίτερα όταν τα φυτά έχουν αναπτυχθεί σε κανονικές για αυτά θερμοκρασίες (Haldimann, 1997).

Τα τελευταία χρόνια ο επαγωγικός φθορισμός έχει χρησιμοποιηθεί για την καταγραφή της φωτοσυνθετικής απόδοσης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών σε χαμηλή θερμοκρασία (Janda et al., 1994; Srivastava et al., 1995). Οι μειώσεις της φωτοχημικής ικανότητας του PSII που προέρχονται από τη χαμηλή θερμοκρασία, διαφοροποιούν τα ενεργά κέντρα του PSII (Krause, 1994; Fryer et al., 1995; Ottander et al., 1995). Μετρήσεις της σχέσης F_v/F_m είναι χρήσιμη, γρήγορη και απλή μέθοδος ιδιαίτερα σε περιπτώσεις φωτοαναστολής (Adrews et al., 1995; Frachebound et al., 1999). Από τα αποτελέσματα αυτού του λόγου μπορεί να εκτιμηθεί η ικανότητα των ανοιχτών ενεργών κέντρων του PSII να δεσμεύουν την

ενέργεια και οι αλλαγές της δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Το PSII είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο και η λειτουργία του επηρεάζεται άμεσα ή έμμεσα σε επιδράσεις του περιβάλλοντος και ιδιαίτερα της χαμηλής θερμοκρασίας (Havaux et al., 1984). Σε οριακά χαμηλή θερμοκρασία και χαμηλή ένταση φωτός ($30\text{-}35 \mu\text{mole}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) παρατηρήθηκε μια απότομη μείωση του φθορισμού, στα 685nm και 735nm, ως αποτέλεσμα της τροποποίησης των μεμβρανών των θυλακοειδών από το κρύο που διαφοροποιεί την μεταφορά της ενέργειας από το PSII στο PSI (Agati et al., 2000). Το αποτέλεσμα της θερμοκρασίας στις αλλαγές του φθορισμού οφείλεται σε μηχανισμό εκτόνωσης της ενέργειας στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό, που εξαρτάται από τις συνθήκες του πειράματος, όπως είναι η ένταση του φωτός, οι συνθήκες φωτοπροσαρμογής και το ποσοστό διακύμανσης της θερμοκρασίας (Agati et al., 2000).

Με την εφαρμογή της τεχνικής του φθορισμού σε ευαίσθητα φυτά, η κινόνη (Q_A), ο πρώτος ηλεκτρονικός αποδέκτης του PSII, παραμένει περισσότερο χρόνο σε αναγώμενη κατάσταση σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας (Oquist and Huner, 1993). Έτσι φύλλα φυτών που προέρχονται από ανθεκτικούς γενότυπους και αναπτύχθηκαν σε οριακά χαμηλές θερμοκρασίες, είχαν αυξημένη μεταφορά ηλεκτρονίων σε σχέση με τους αντίστοιχους ευαίσθητους γενότυπους. Αυτές οι διαφορές οφείλονται στην ικανότητα των ανθεκτικών γενότυπων να διατηρούν την επί πλέον ενέργεια (excitation energy) με ανοιχτά τα κέντρα αντίδρασης του PSII (Fracheboud et al., 1999). Φαίνεται ότι υπάρχει μία ενδοκυτταρική διαδικασία που προστατεύει το φωτοσυνθετικό μηχανισμό αυξάνοντας την θερμική του ενέργεια. Ο συνδυασμός φωτός και κρύου συμβάλλει στην αύξηση της διάχυσης της ενέργειας της φωτοσυνθετικής κεραίας του PSII και στην αδυναμία των ενεργών κέντρων του να λειτουργήσουν κανονικά (Baker et al., 1988; 1994; Ortiz-Lopez et al., 1990), με αποτέλεσμα κάποια φωτοσυνθετικά κέντρα να χρησιμοποιηθούν για την εκτόνωση της επιπλέον ενέργειας και να προστατεύσουν με αυτό τον τρόπο τα υπόλοιπα από την καταστροφή (Greer et al., 1991).

Ανάμεσα σε πολλές μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές, που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της προσαρμογής των φυτών σε χαμηλή θερμοκρασία, είναι η σύνθεση πρωτεϊνών (Guy and Hastell, 1987; Mezza-

Basso et al., 1986). Αυτό συμβαίνει στα ανώτερα φυτά, τα φύκη (Kyle, 1987) και τα κυανοβακτήρια (Samuelsson et al., 1987). Αυτές οι πρωτεΐνες προστατεύουν την σταθερότητα των μεμβρανών από τις αλλαγές, που προκαλεί η χαμηλή θερμοκρασία (Cooper and Ort, 1988; Boothe et al., 1997). Τελευταία έχουν απομονωθεί γονίδια από διάφορα είδη φυτών (*Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*), που εμπλέκονται σε αυτήν τη διαδικασία, όπως τα *cas*, *cor*, *kin1* και *kin2* (Cattivelli and Bartels, 1990; Hajela et al., 1990; Kurkela and Borg-Franck, 1990; Monroy et al., 1993). Αποδείχθηκε ότι οι πρωτεΐνες, που κωδικοποιούνται από το χλωροπλάστη, όπως τα σύμπλοκα πρωτεϊνών των ενεργών κέντρων των PSI και PSII, το κυτόχρωμα *f*, οι υπομονάδες α και β του παράγοντα CF_0 της ATPάσης, μειώθηκαν περισσότερο από τις πρωτεΐνες LHCI και LHCII, που κωδικοποιούνται από τον πυρήνα με την επίδραση της χαμηλής θερμοκρασίας (Nie and Baker, 1991). Κατά τον Moon et al. (1995), σημαντικός παράγοντας που σταθεροποιεί και προστατεύει το φωτοσυνθετικό μηχανισμό από το κρύο, του τροποποιημένου γενετικά καπνού με το γονίδιο της γλυκερόλης-3-φωσφορικής ακετυλτρανσφεράσης από το φυτό *Cucurbita moschata* var. *Shiragikuza*, είναι τα ακόρεστα λιπαρά που βρίσκονται στη μεμβράνη των χλωροπλάστων. Τα ευαίσθητα φυτά περιέχουν χαμηλότερα επίπεδα ακόρεστων λιπαρών οξέων στα λιπίδια των μεμβρανών από ότι τα ανθεκτικά φυτά. Στη σίκαλη, η χαμηλή θερμοκρασία μείωσε το τρανς- $\Delta 3$ -εξαδεκαονικό οξύ, που σχετίζεται με την φωσφατιδυγλυκερόλη και επηρεάζει την σταθερότητα των ολιγομερών του LHCII (Huner et al., 1987). Ο υψηλός φωτισμός και η χαμηλή θερμοκρασία αύξησε την αποδόμηση της πρωτεΐνης D1 του PSII και τη γρήγορη επανασύνθεσή της (Ellis, 1981; Covello et al., 1988). Οι Bergantino et al. (1995) στα πειράματα τους διαπίστωσαν την φωσφορυλίωση της CP_{29} ως μηχανισμός ανθεκτικότητας και προστασίας, σε χαμηλή θερμοκρασία, που αποσκοπεί στην αναδιοργάνωση των φωτοσυνθετικών συμπλόκων των χρωστικών έτσι, ώστε χαμηλότερο ποσό ενέργειας να φθάνει στα ενεργά κέντρα του PSII.

Χαμηλή θερμοκρασία για όλη την διάρκεια της νύχτας, προκάλεσε καθυστερημένη αναστολή της φωτοσύνθεσης την επόμενη μέρα στο φυτό μάγκο (Allen et al., 2000). Στο σκοτάδι επηρεάζεται η λειτουργία του στρώματος του χλωροπλάστη και συνεπώς τα ένζυμα που βρίσκονται εκεί

(Jun et al., 1995). Στην τομάτα έχει αναφερθεί ότι η ανάσχεση της φωτοσύνθεσης σε χαμηλή θερμοκρασία και σκοτάδι πιθανόν να είναι το αποτέλεσμα του προσωρινού ελέγχου της μεταγραφής των γονιδίων του συμπλόκου συλλογής φωτός LHCII, και της καρβοξυλάσης-οξυγενάσης της 1,5 διφωσφορικής ριβουλόζης (Rubisco) (Martino-Catt and Ort, 1992).

Πολλές φορές ο συνδυασμός χαμηλής θερμοκρασίας και φωτός οδηγεί στη συγκέντρωση ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Long, 1983; Wise, 1995). Εάν οι ρίζες δεν απομακρυνθούν, προκαλούν ζημιά στις φωτοσυνθετικές μεμβράνες που οδηγεί στην φωτοκαταστροφή (Satoh and Fork, 1982). Η συμμετοχή των καρετονοειδών μέσω του κύκλου της ξανθοφύλλης, έχει αναφερθεί ως προστατευτική διαδικασία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού από την αυξανόμενη ενέργεια που δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μέσω της φωτοσύνθεσης (Walker et al., 1991; Demming and Adams, 1990; Yamamoto and Bassi, 1996). Η υπεροξειδάση δησμουτάση και η ασκορβική υπεροξειδάση κατασβένουν τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου με το σχηματισμό H_2O_2 (Bowler et al., 1992; Foyer et al., 1994).

Αποτελέσματα πολλών ερευνών έχουν αποδείξει πως ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός μπορεί να ανταποκριθεί σε οριακά χαμηλές θερμοκρασίες και να προσαρμοστεί στο κρύο. Οι Somersalo and Krause, (1989) ήταν οι πρώτοι επιστήμονες που ανέφεραν την προσαρμογή στο κρύο με την ανθεκτικότητα στην φωτοαναστολή. Αυτό έχει επιβεβαιωθεί για τα σιτηρά, όπως επίσης για το σπανάκι (Boese and Huner, 1990; Hurry and Huner, 1991) και το ρύζι (Quist and Huner, 1990). Οι Nie et al. (1992) επίσης ανέφεραν ότι καλαμπόκι προσαρμοσμένο στους $17^{\circ}C$ αύξησε την ανθεκτικότητά του στην αυξημένη ακτινοβολία. Αυτά τα φυτά ανακάπτουν γρήγορα από την φωτοαναστολή (Haldimann et al., 1996) και είναι περισσότερο ανθεκτικά στη φωτοοξειδωση, περιέχοντας μεγάλη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών ουσιών όπως ασκορβικό, γλουταθειόνη και τοκοφερόλη (Leipner et al., 1997; Fryer et al., 1998).

Τα τελευταία χρόνια πολλοί ερευνητές αναφέρονται στην συμμετοχή των πολυαμινών στις περιβαλλοντικές επιδράσεις στα φυτά (Flores, 1990; Kumer et al., 1997; Bouchereau et al., 1999). Οι ενδογενείς πολυαμίνες αυξάνονται σε χαμηλή θερμοκρασία σε πολλά είδη φυτών (Kramer and Wang, 1989) και η αύξηση είναι μεγαλύτερη στα ανθεκτικά είδη φυτών σε σύγκριση με τα ευαίσθητα (Guye et al., 1986; Nadeau et al., 1987; Lee, 1997).

Διαφορές στη συγκέντρωση των πολυαμινών σε σχέση με τη χαμηλή θερμοκρασία βρέθηκαν σε διαφορετικούς γενοτύπους φασολιού (Guye et al., 1986). Η *de novo* σύνθεση της πουτρεσίνης (Put) με παράλληλη αύξηση της ενεργότητας των ενζύμων, που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της, δηλαδή στην αποκαρβοξυλάση της αργινίνης (ADC), συντελεί στην αύξηση της ανθεκτικότητας τους στο κρύο (Lee, 1997). Αλληλεπιδράσεις των πολυαμινών με τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών σε διάφορες συνθήκες καταπόνησης, ενισχύουν την σταθερότητα των μεμβρανών και εξουδετερώνουν τις ενεργές ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου (Drolet et al., 1986; Roberts et al., 1986). Ακόμη, οι πολυαμίνες συμμετέχουν στη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Οι τρεις κύριες πολυαμίνες Put, σπερμιδίνη (Spd) και σπερμίνη (Spm) βρέθηκαν σε όλα τα υποσύνπλοκα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Kotzabasis et al., 1993b; Kotzabasis et al., 1994; Kotzabasis et al., 1996). Με εξωγενή ρύθμιση του επιπέδου των πολυαμινών (προσθήκη εξωγενών πολυαμινών και χρήση αναστολέων της βιοσύνθεσής τους) βρέθηκε, ότι η διαφοροποίηση του επιπέδου των πολυαμινών (μείωση Put ή αύξηση Spm) παρεμποδίζει την αποδόμηση πρωτεϊνών και την απώλεια χλωροφύλλης σταθεροποιώντας τις μεμβράνες και εμποδίζοντας την οξειδωση των λιπών (Besford et al., 1993). Επίσης, πρόσφατες μελέτες των Kotzabasis et al. (1999) αποδεικνύουν ότι οι πολυαμίνες έχουν ρυθμιστικό ρόλο στην διαδικασία της φωτοπροσαρμογής του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η μελέτη των αλλαγών της δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού κατά την έκθεση των φυτών σε χαμηλή θερμοκρασία αλλά και κατά την επαναφορά τους στην αρχική θερμοκρασία καθώς και η επίδραση του φωτονιακού περιβάλλοντος στην όλη διαδικασία.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Φυτό – Συνθήκες ανάπτυξης

Το φυτό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το φασόλι (*Phaseolus vulgaris*), η ποικιλία Fagiolo nano, Borlotto L.DI Fuoco. Οι σπόροι τοποθετήθηκαν, καθένας ξεχωριστά, σε πλαστικές κυψελίδες 5cm με υπόστρωμα περλίτη. Για κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 120 φυτά.

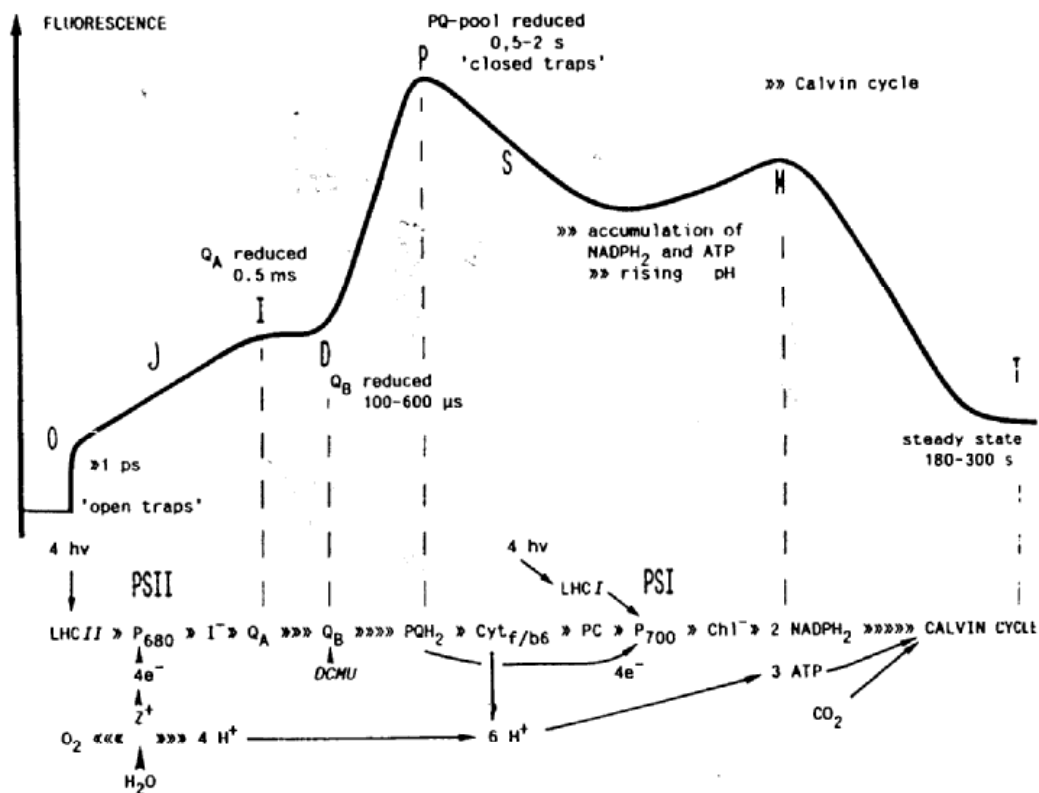
Οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης σταθερών συνθηκών θερμοκρασίας 26⁰C, υγρασίας 70% και φωτισμού (PAR: 70μmol.m⁻².s⁻¹). Οι σπόροι βλάστησαν την 3^η μέρα και χρησιμοποιήθηκαν φυτά 10 ημερών. Την 11^η ημέρα τα φυτά μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με θερμοκρασία 6⁰C και συνθήκες φωτισμού και υγρασίας σταθερές. Μετά από 52 h επώαση σε χαμηλή θερμοκρασία (6⁰C), τα φυτά μεταφέρθηκαν ξανά στην αρχική θερμοκρασία (26⁰C) για άλλες 24 h (L26⁰C→ L6⁰C /L26⁰C). Παράλληλα, αναπτύχθηκαν και φυτά μάρτυρες, που παρέμειναν συνεχώς σε θερμοκρασία 26⁰C (control: L26⁰C→ L26⁰C /L26⁰C). Άλλη πειραματική σειρά, αναπτύχθηκε κατά τον ίδιο τρόπο σε συνεχές φως στους 26⁰C θερμοκρασία για τις πρώτες 10 ημέρες και στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε χαμηλή θερμοκρασία 6⁰C και απόλυτο σκοτάδι, όπου παρέμεινε 52h. Ακολούθησε μεταφορά σε θερμοκρασία 26⁰C και σκοτάδι για άλλες 24 h (L26⁰C→ D6⁰C/D26⁰C). Τα φυτά μάρτυρες, για αυτήν την πειραματική σειρά, αναπτύχθηκαν από την 11^η ημέρα σε απόλυτο σκοτάδι και υψηλή θερμοκρασία (L26⁰C→ D26⁰C/D26⁰C). Επίσης εργασίας χρησιμοποιήθηκαν χλωρωτικά φυτά, που από την αρχή αναπτύχθηκαν σε απόλυτο σκοτάδι σε θερμοκρασία 26⁰C και μετά την 11^η ημέρα μεταφέρθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία 6⁰C και απόλυτο σκοτάδι για περίπου 120 h (D26⁰C→ D6⁰C). Τα φυτά μάρτυρες, για αυτήν την πειραματική σειρά, που αναπτύχθηκαν στους 26⁰C σε απόλυτο σκοτάδι (D26⁰C→ D26⁰C).

Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού

Η ηλιακή ενέργεια απορροφάται από τη φωτοσυλλεκτική κεραία του PSII και χρησιμοποιείται στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης. Ένα τμήμα της μπορεί να εκπέμπεται ως φθορισμός ή να διαχέεται ως θερμότητα. Το μεγαλύτερο ποσοστό του φθορισμού προέρχεται από τα μόρια της χλωροφύλλης *a* του PSII (Furuya et al., 1992). Ο εκπεμπόμενος φθορισμός εξαρτάται από τη μεταφορά της απορροφούμενης ενέργειας κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού καθώς και από την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κέντρων αντίδρασης, αλλά και των δοτών και δεκτών ηλεκτρονίων της ηλεκτρονιακής αλυσίδας μεταφοράς. Στην Εικόνα 1 παρουσιάζεται η αντιστοιχία των σταδίων του επαγωγικού φθορισμού από τα φυτά με τα διάφορα στάδια της μεταφοράς των ηλεκτρονίων κατά μήκος της ηλεκτρονιακής μεταφοράς.

Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού έγιναν με τη συσκευή της Hansatech Instruments (Plant Efficiency Analyser, PEA), βάσει της μεθόδου Strasser and Strasser (1995) και η ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα Biolyser 2. Πριν από κάθε μέτρηση όλα τα δείγματα παρέμειναν στο σκοτάδι για 10 min για να «αδειάσουν» τα φωτοσυνθετικά κέντρα αντίδρασης (PSII & PSI) από ηλεκτρόνια και μετά διεγέρθηκαν αυτόματα για 5 sec με ερυθρά μονοχρωματική ακτινοβολία (650nm). Από τις μετρήσεις υπολογίστηκε ο λόγος F_v/F_m , που εκτιμά με ακρίβεια τη φωτοσυνθετική απόδοση. Με τη εφαρμογή του JIP TEST για τιμές φθορισμού, που αντιστοιχούν σε καθορισμένα στάδια (J, I και P), υπολογίστηκαν τα επιμέρους χαρακτηριστικά του φωτοσυνθετικού μηχανισμού:

- Το σχετικό μέγεθος της φωτοσυνθετικής κεραίας (ABS/RC).
- Η παγίδευση ενέργειας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (TRo/RC), που εκφράζει το ρυθμό με τον οποίο ηλεκτρόνια παγιδεύονται από τα κέντρα αντίδρασης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, προκαλώντας την αναγωγή της Q_A στην αλυσίδα μεταφοράς των ηλεκτρονίων.
- Η αλυσίδα μεταφοράς των ηλεκτρονίων ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (ETo/RC).



Εικόνα 1: Στάδια του επαγωγικού φθορισμού στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά τη φωτοσύνθεση: Ο J I D P S M T : διακριτές φάσεις φθορισμού, hv: φωτόνιο, LHC I και II : σύμπλοκα συλλογής φωτός των φωτοσυστημάτων I και II, P680 και P700: κέντρα αντίδρασης φωτοσυστημάτων I και II, e⁻ : ηλεκτρόνιο, Z⁺: αποβολή ηλεκτρονίου από το σύστημα φωτόλυσης νερού, H⁺: πρωτόνιο, I: ενδιάμεσος δέκτης, φαιοφυτίνη α, QA: πρωτογενής δέκτης του PSII (πλαστοκινόνη), QB: δευτερογενής δέκτης του PSII, PQH₂: ανοιγμένη πλαστοκινόνη, Cytb₆f: κυτόχρωμα b₆/f, PC: πλαστοκυανίνη. Οι κάθετες διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν την αντιστοιχία των επιμέρους σταδίων του επαγωγικού φθορισμού (OIPSM T) με την φωτοσυνθετική μη κυκλική μεταφορά e⁻.

- Η απορροφούμενη ενέργεια (D10/RC), που διαχέεται με μορφή θερμότητας και δεν αξιοποιείται από τη φωτοχημεία της φωτοσύνθεσης.
- Η πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης (RC/CS₀).

Η μέθοδος βασίζεται σε μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού με ανάλυση 10μs σε χρονικό διάστημα ενός δευτερολέπτου. Ο φθορισμός

μετρήθηκε με 12-bit ανάλυση και η διέγερση έγινε από 6 διόδους φωτισμού (LEDs), οι οποίες έχουν ένταση ακτινοβολίας μέχρι 600Wm^{-2} ερυθρού φωτός (650nm). Τα διαφορετικά βήματα σημειώνονται με γράμματα O, J, I, D, P, S, M, και T. Η αύξηση του φθορισμού από το O στο P συμβαίνει στο πρώτο δευτερόλεπτο της ακτινοβολήσης και ονομάζεται γρήγορη φάση. Η αργή φάση ακολουθεί μετά το P και ίσως χρειαστούν μερικά λεπτά μέχρι την τελική φάση T.

HPLC - ανάλυση πολυαμινών

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των κυρίων πολυαμινών (Put, Spd και Spm) στους ιστούς των φύλλων ή στις μεμβράνες των θυλακοειδών ή στα απομονωμένα υποσύμπλοκα, έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Kotzabasis et al. (1993). Οι πολυαμίνες ανιχνεύθηκαν ως βενζυλιωμένα παράγωγα με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Τα δείγματα διαλυτοποιήθηκαν σε 350μl 1N NaOH και ακολούθησε ανάδευση. Στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη 350 μl HCl (36%) και υδρόλυση των δειγμάτων στους $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 18h. Μετά τα υπερκείμενα εξατμίστηκαν στους $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ και τα δείγματα επαναδιαλύθηκαν σε 300μl 5% υπερχλωρικού οξέως (Perchloric Acid, PCA). Αφού έγινε πολύ καλή ανάδευση τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες.

Κατόπιν σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 1 ml 2N NaOH και 10μl βενζοϋλο-χλωριδίου (Benzoyl Chloride), ώστε να σχηματιστούν τα βενζυλιωμένα παράγωγα των πολυαμινών, οι οποίες υπήρχαν σε κάθε δείγμα. Η αντίδραση σχηματισμού έγινε στους 25°C και διάρκεσε περίπου 20 min. Για τον τερματισμό της, προστέθηκαν 2ml κορεσμένου διαλύματος NaCl σε κάθε δείγμα. Στη συνέχεια οι βενζυλιωμένες πολυαμίνες εκχυλίστηκαν σε 2ml διαιθυλαιθέρα, ο οποίος συλλέχτηκε και εξατμίστηκε σε υδατόλουτρο στους 70°C . Τέλος, οι βενζυλιωμένες πολυαμίνες επαναδιαλύθηκαν σε 200μl 63% (v/v) μεθανόλης για υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και η διαδικασία ολοκληρώθηκε με την ανάλυση των δειγμάτων και τον υπολογισμό της ποσότητας από κάθε πολυαμίνη σύμφωνα με τη μέθοδο των

Kotzabasis et al (1993). Η HPLC ανάλυση έγινε με τη χρησιμοποίηση στήλης narrow bore C-18 (2,1X200mm, 5µm Hypersil, Hewlett Packard) και ένα σύστημα δύο διαλυτών (μεθανόλης και νερού) που περιελάμβανε μία διαβάθμιση μεθανόλης (55% -84%). Η καταγραφή των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρησιμοποίηση ενός συστήματος HPLC της Shimadzu {Shimadzu Liquid Chromatography apparatus (LC-10AD)}, το οποίο ήταν εξοπλισμένο με σύστημα ανίχνευσης Diode array (Shimadzu SPD-M10A).

Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός χλωροφυλλών και πρωτοχλωροφυλλιδίου

Η ανάλυση της ποιότητας και ποσότητας των χλωροφυλλών έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Holden (1965). Σε δείγματα από ιστούς των φύλλων ή θυλακοειδών μεμβρανών ή υποσυμπλόκων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, προστέθηκαν 2ml μεθανόλης, ανακινήθηκαν καλά και θερμάνθηκαν στους (70°C) για την εκχύλιση των χρωστικών. Το μεθανολικό εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε για 5min στα 1500g και η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε μέχρι να αποχρωματιστεί το ίζημα. Η ποσότητα των χλωροφυλλών a και b προσδιορίστηκε φωτομετρικά, βάσει των παρακάτω εξισώσεων:

$$\text{Ολική Chl (}\mu\text{gr/ml)} = 25,5 \times A_{650} + 4 \times A_{665}$$

$$\text{Chla(}\mu\text{gr/ml)} = 16,5 \times A_{665} - 8,3 \times A_{650}$$

$$\text{Chlb(}\mu\text{gr/ml)} = 33,8 \times A_{650} - 12,5 \times A_{665}$$

Όπου, A_{650} , A_{665} είναι οι τιμές απορρόφησης στα 650nm και 665nm του μεθανολικού εκχυλίσματος αντίστοιχα.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των χλωροφυλλών των φυτών που αναπτύχθηκαν στο σκοτάδι (χλωρωτικά φυτά), έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Brouers και Wolwertz (1983). Η εκχύλιση των χρωστικών έγινε όπως και παραπάνω με μεθανόλη. Στη συνέχεια, το εκχύλισμα εξατμίστηκε με αέριο άζωτο, για την αποφυγή οξειδωσης των χρωστικών και επαναδιαλύθηκε σε ακετόνη 80% (v/v). Το διάλυμα φωτομετρήθηκε (μετά από μηδενισμό στα 700nm) στα 664, 647 και 626nm αντίστοιχα. Οι τιμές απορρόφησης τοποθετήθηκαν στις παρακάτω εξισώσεις για την τελική εκτίμηση του επιπέδου του πρωτοχλωροφυλλιδίου (Pchl_{ide}), Chl(ide)_a, και Chl(ide)_b σε nmol/ml εκχυλίσματος.

$$Pchl(ide) \text{ (nmol/ml)} = -4,37 \times A_{664} - 7,44 \times A_{647} + 33,67 \times A_{626}$$

$$Chl(ide)a \text{ (nmol/ml)} = 13,16 \times A_{664} - 2,63 \times A_{647} + 0,23 \times A_{626}$$

$$Chl(ide)b \text{ (nmol/ml)} = -4,95 \times A_{664} - 25,59 \times A_{647} + 2,29 \times A_{626}$$

Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών

Οι ολικές πρωτεΐνες προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford (1976), όπως προτείνεται από τους Jones et al. (1989) και με τη βοήθεια μιας πρότυπης καμπύλης, που δημιουργήθηκε με τον ίδιο τρόπο αλλά με γνωστές ποσότητες πρωτεϊνών.

Απομόνωση χλωροπλαστών

Για την απομόνωση των χλωροπλαστών χρησιμοποιήθηκαν 120 φυτά φασολιού, σε κάθε πείραμα, που αναπτύχθηκαν σε τρεις διαφορετικές συνθήκες:

A. Φυτά που αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 26⁰C και συνεχή φωτισμό 70 mol.m⁻².s⁻¹ (**control**).

B. Φυτά που αναπτύχθηκαν για 10 ημέρες σε 26⁰C και συνεχή φωτισμό και μετά σε 6⁰C για 52 h (**chilling**).

Γ. Φυτά που αναπτύχθηκαν για 10 ημέρες σε 26⁰C και συνεχή φωτισμό και μετά σε 6⁰C για 52 h και μεταφέρθηκαν ξανά σε 26⁰C για 24 h (**rewarming**).

Φύλλα από 20 φυτά χωρίς τους μίσχους ομογενοποιήθηκαν σε blender επί 2 min (1 min λειτουργία και 1 διακοπή), με διάλυμα A (30mM Tricine-NaOH και 0,3M sucrose pH 7,6). Το ομογενοποιημένο διάλυμα διηθήθηκε από τρία φύλλα γάζας και φυγοκεντρήθηκε επί 7 min σε 500g. Το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε σε ρότορα τύπου SS34 (Beckmann) σε 1070g για 15min. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και η πελέττα επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα B (10mM Tricine-NaOH και 0,3M sucrose, pH 7,6). Παράλληλα ετοιμάστηκαν διαλύματα (gradients) με διαβάθμιση σουκρόζης 0,75M, 1M και 1,5M. Στην

κορυφή προστέθηκε το δείγμα και φυγοκεντρήθηκε σε ρότορα με κεφαλή εκτρεπόμενων κάδων (swing out rotor, type HB-4, Sorvall), σε 2400g για 1 h. Στο τέλος της φυγοκέντρωσης οι χλωροπλάστες, που βρίσκονταν μεταξύ των φάσεων σουκρόζης 1,5M και 1M, συλλέχτηκαν, προστέθηκε ίδια ποσότητα του διαλύματος B και φυγοκεντρήθηκε στα 5800g για 5 min. Το ίζημα (καθαροί χλωροπλάστες) επαναδιαλύθηκε και αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών

Οι απομονωμένοι χλωροπλάστες διαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,05M tricine, pH 7,3 και φυγοκεντρήθηκαν (swing out rotor, type HB-4, Sorvall) στα 10000g για 45 min. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, το ίζημα ομογενοποιήθηκε και φυγοκεντρήθηκε στον ίδιο ρότορα στα 10000g για 45 min. Μετά, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και η πελέττα παρουσίαζε τις εξής χαρακτηριστικές ζώνες: την ανώτερη, που περιείχε τις μεμβράνες των θυλακοειδών και την κατώτερη, που περιείχε μόρια αμύλου. Τα θυλακοειδή συλλέχθηκαν με ειδικό πινέλο και επαναδιαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,05M tricine pH 7,3.

Απομόνωση του LHCII και διαχωρισμός των μονομερών και ολιγομερών μορφών του

Δείγματα απομονωμένων θυλακοειδών συγκεκριμένης συγκέντρωσης χλωροφυλλών και πρωτεϊνών τοποθετήθηκαν σε συνεχή διαβάθμιση σακχαρόζης (από 5% έως και 22%) και φυγοκεντρήθηκαν στα 17000g (17h) για τον διαχωρισμό και την απομόνωση των ολιγομερών και μονομερών μορφών του LHCII, σύμφωνα με τη μέθοδο των Argyroudi-Akoynoglou et al. (1981). Μετά το πέρας της υπερφυγοκέντρωσης, οι ζώνες με τα μονομερή και τα ολιγομερή του LHCII απομονώθηκαν με τη χρήση περισταλτικής αντλίας (econo pump, Bio-rad). Από κάθε ζώνη ελήφθησαν δείγματα και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις πρωτεϊνών και χλωροφυλλών, με σκοπό την εκτίμηση της συνολικής ποσότητας των επιμέρους μορφών του LHCII. Η περιεκτικότητα των συστατικών των διαλυμάτων αναλύεται παρακάτω:

Διάλυμα περιεκτικότητας 5% κατ' όγκο σε σακχαρόζη

Διοξυχολικό οξύ	0,2 gr
Triton x 100	0,2 ml
Σακχαρόζη	5 gr
Διάλυμα διαβαθμίσεων (pH 9,5)	100 ml

Διάλυμα περιεκτικότητας 22% κατ' όγκο σε σακχαρόζη

Διοξυχολικό οξύ	0,2 gr
Triton x 100	0,2 ml
Σακχαρόζη	22 gr
Διάλυμα διαβαθμίσεων (pH 9,5)	100 ml

Διάλυμα διαβαθμίσεων (pH 9,5*)

Tris	0,05 M
Βορικό οξύ	0,06 M
SDS	0,01%

*Η ρύθμιση του pH στην τιμή 9,5 έγινε με κορεσμένο διάλυμα βορικού οξέος.

Ηλεκτροφόρηση και ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών (Western Blot)

Μετά τον διαχωρισμό των υποσυμπλόκων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού έγινε ανοσοανίχνευση των πρωτεϊνών για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη των μονομερών και ολιγομερών μορφών του LHCII. Η SDS-ηλεκτροφόρηση έγινε με τη μέθοδο Laemmli (1970) με ελάχιστες αλλαγές. Οι πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των μοριακών βαρών των πρωτεϊνών ήταν: pyruvate kinase (58kD), fumarase (48,5kD), lactic dehydrogenase (36,5kD) και triosephosphate (26,6kD). Τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό ακολούθησε ηλεκτροφορητική μεταφορά σε νιτροκυτταρίνη (2.45 μ m Biotrace NT 66485 Gelman Sciences) σύμφωνα με τη μέθοδο των Schmid και Schaefer (1976). Η ανοσοανίχνευση έγινε με δευτερογενές αντίσωμα συνδεδεμένο με αλκαλική φωσφατάση.

Αποτελέσματα και Συζήτηση

Η επίδραση της χαμηλής θερμοκρασίας στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό των φυτών εξαρτάται από την ευαισθησία του κάθε φυτού και είναι διαφορετική για κάθε είδος ή και για κάθε ποικιλία του ίδιου είδους (Haldimann, 1999). Το φασόλι, που μελετήθηκε στην παρούσα ερευνητική εργασία, ανήκει στα μέτριας ευαισθησίας φυτά στο κρύο (less chilling-sensitive). Στα πλαίσια της εργασίας αυτής έγινε μία προσπάθεια κατανόησης της επίδρασης της χαμηλής θερμοκρασίας στη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, καθώς επίσης και του ρόλου του φωτός σε αυτή την διαδικασία προσαρμογής του σε διακυμάνσεις θερμοκρασίας. Για την αποφυγή φωτοανασταλτικών διαδικασιών της φωτοσύνθεσης, που θα οδηγούσαν στην φωτοκαταστροφή, χρησιμοποιήθηκε χαμηλής έντασης φωτισμός.



Εικόνα 2: Φυτά φασολιού στο θάλαμο ανάπτυξης σταθερού φωτισμού $70\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ και διακύμανσης της θερμοκρασίας από 26°C σε 6° .

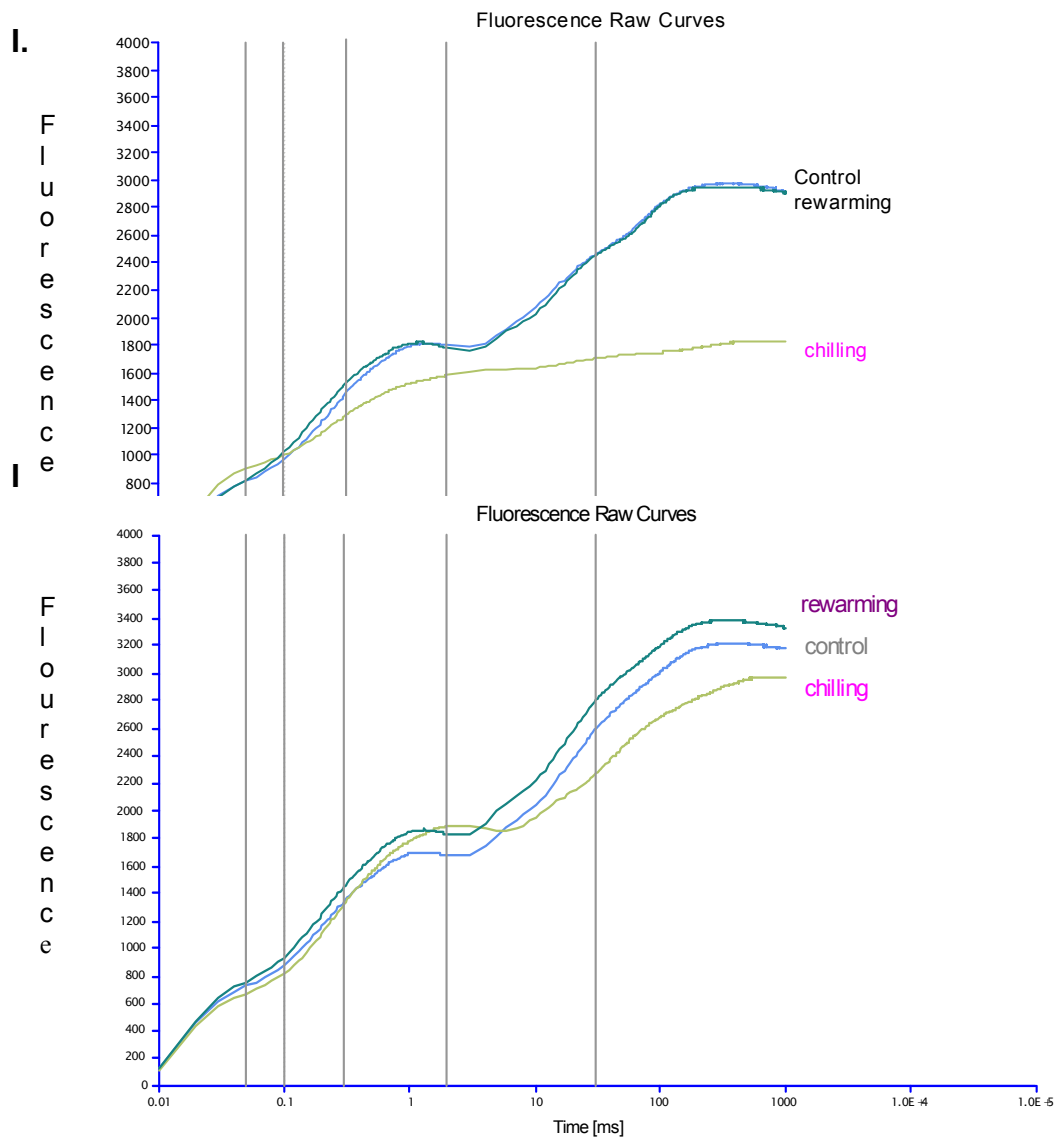
Φυτά φασολιού αναπτύχθηκαν σε σταθερό φωτισμό $70\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ και θερμοκρασία 26°C , σε ηλικία 10 ημερών μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ίδιας έντασης φωτισμού και θερμοκρασίας 6°C , όπου παρέμειναν 52 h μέχρι να μεταφερθούν ξανά στους 26°C όπου παρέμειναν για 24 h ($\text{L}26^{\circ}\text{C}\rightarrow\text{L}6^{\circ}\text{C}/\text{L}26^{\circ}\text{C}$). Τα φυτά-μάρτυρες ήταν $\text{L}26^{\circ}\text{C}\rightarrow\text{L}26^{\circ}\text{C}/\text{L}26^{\circ}\text{C}$, (Εικ.2). Παράλληλα, φυτά αναπτύχθηκαν κατά τον ίδιο τρόπο σε συνεχές φως στους 26°C θερμοκρασία για τις πρώτες 10 ημέρες και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία 6°C και απόλυτο σκοτάδι όπου παρέμειναν 52 h και μετά μεταφέρθηκαν σε θερμοκρασία 26°C και σκοτάδι για άλλες 24 h ($\text{L}26^{\circ}\text{C}\rightarrow\text{D}6^{\circ}\text{C}/\text{D}26^{\circ}\text{C}$), με φυτά-μάρτυρες $\text{L}26^{\circ}\text{C}\rightarrow\text{D}26^{\circ}\text{C}/\text{D}26^{\circ}\text{C}$. Τα χλωρωτικά φυτά αναπτύχθηκαν σε απόλυτο σκοτάδι σε θερμοκρασία 26°C και μετά μεταφέρθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία 6°C και απόλυτο σκοτάδι για περίπου 120 h ($\text{D}26^{\circ}\text{C}\rightarrow\text{D}6^{\circ}\text{C}$), με φυτά-μάρτυρες $\text{D}26^{\circ}\text{C}\rightarrow\text{D}26^{\circ}\text{C}$.

Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού έγιναν σε φύλλα ίδιου μεγέθους και ίδιου γενετικού σταδίου. Παράλληλα ελήφθησαν δείγματα από ολόκληρα, ανέπαφα φύλλα κάθε φορά που γινόταν οι μετρήσεις, για τις αναλύσεις πρωτεϊνών, χλωροφυλλών και πολυαμινών. Χρησιμοποιήθηκε ολόκληρο το φύλλο γιατί έχει διαπιστωθεί διαφορά στη σύσταση των θυλακοειδών μεμβρανών σε χλωροπλάστες που βρίσκονται επιφανειακά του φύλλου και σε αυτούς που βρίσκονται στα βαθύτερα στρώματα του μεσοφύλλου (Lapointe et al., 1991). Η φωτοσυνθετική απόδοση αποδόθηκε ως F_v/F_m και χρησιμοποιήθηκε στην αρχή για να διαπιστωθεί η αντίδραση και η ανθεκτικότητα των φυτών στη χαμηλή θερμοκρασία στην διάρκεια του χρόνου.

Εξετάστηκαν τα καθορισμένα στάδια της καμπύλης του επαγωγικού φθορισμού (J, I και P), από το F_0 στο F_m (Strasser et al., 1995) της πρώτης πειραματικής σειράς (Φυτά $\text{L}26^{\circ}\text{C}\rightarrow\text{L}6^{\circ}\text{C}/\text{L}26^{\circ}\text{C}$) σε τρία χρονικά σημεία: σε φυτά που παρέμειναν για 52 h σε 6°C (chilling), σε φυτά που παρέμειναν συνεχώς τους 26°C (control) και τέλος σε φυτά που μετά από επώαση στους 6°C για 52 h μεταφέρθηκαν στους 26°C για 24 h (rewarming). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3, το επίπεδο F_0 αυξήθηκε, στα φυτά που εκτέθηκαν στο κρύο για 52 h και αντίστοιχα το σημείο P και ως εκ τούτου το F_m μειώθηκε σημαντικά με αποτέλεσμα η σχέση F_v/F_m να μειωθεί σημαντικά. Στα φυτά

που παράμειναν σε 26⁰C (φυτά μάρτυρες) και σε αυτά που παράμειναν σε χαμηλή θερμοκρασία 52 h και μετά πάλι σε 26⁰C, οι καμπύλες επαγωγικού φθορισμού ήταν ίδιες με πολύ μικρές αποκλίσεις στο στάδιο O-J. Τα στάδια J-I και I-P στις δύο αυτές καμπύλες ήταν όμοια υποδηλώνοντας ότι, ενώ στην αρχή επηρεάστηκαν από τη χαμηλή θερμοκρασία, μετά έγινε πλήρης αποκατάσταση της λειτουργίας της φωτοσύνθεσης. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η μείωση του λόγου Fv/Fm κατά την έκθεση των φυτών στο κρύο, οφείλεται κυρίως στη μείωση του Fm και την αύξηση του Fo και αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα των Somersalo και Krause, (1989). Η φάση O έως J οφείλεται στην καθαρή φωτοχημική αναγωγή της Q_A σε Q_A⁻. Αυτή η φάση επηρεάζεται από την S κατάσταση της ηλεκτρονιοδοτικής κατάσταση του PSII (Strasser, 1998) και από την αντίδραση στην ηλεκτρονιοδεκτική κατάσταση του PSII από Q_A⁻Q_B σε Q_AQ_B⁻. Το ενδιάμεσο στάδιο I και το τελικό P οφείλονται στην ύπαρξη γρήγορων και αργών κέντρων αναγωγής της πλαστοκινόνης (PQ pool), καθώς επίσης και στο διαφορετικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό των ενεργών κέντρων του PSII, που ανάγει την δεξαμενή πλαστοκινόνης (Strasser et al., 1995).

Σύμφωνα με τα δεδομένα των παραμέτρων, η φάση J-P θεωρείται ως ο φθορισμός που δημιουργείται με πλήρη λειτουργία του PSII, ενώ η φάση O-J είναι η ενέργεια, που μεταφέρει τα ηλεκτρόνια από την Q_A στην Q_B (Melis, 1991). Έτσι, φαίνεται ότι η χαμηλή θερμοκρασία επηρεάζει την ενέργεια που διαπερνά το PSII. Όμως, όταν τα φυτά μεταφερθούν σε ψηλότερη θερμοκρασία η λειτουργία του PSII αποκαθίσταται ξανά. Η κινητική του επαγωγικού φθορισμού με τα φυτά L26⁰C → D26⁰C/D26⁰C έδειξε ότι η ίδια μείωση της θερμοκρασίας (από 26⁰C σε 6⁰C) απουσία φωτός έχει μικρή επίδραση στον επαγωγικό φθορισμό όπως φαίνεται από τις καμπύλες της Εικόνας 3,II. Τα τρία χρονικά σημεία που επιλέχτηκαν για την ανάλυση της κινητικής του επαγωγικού φθορισμού ήταν: (chilling) φυτά που αναπτύχθηκαν σε φως στους 26⁰ και εκτέθηκαν στο σκοτάδι στους 6⁰ για 52 h, (control) φυτά που αναπτύχθηκαν σε φως στους 26⁰ για 10 ημέρες και εκτέθηκαν στο σκοτάδι στους 26⁰ και (rewarming) φυτά που αναπτύχθηκαν σε φως στους 26⁰, εκτέθηκαν στο σκοτάδι στους 6⁰ για 52 h και μεταφέρθηκαν στο σκοτάδι στους 26⁰ για 24 ώρες. Οσον αφορά τα φυτά D26⁰C → D6⁰C, δεν έγινε



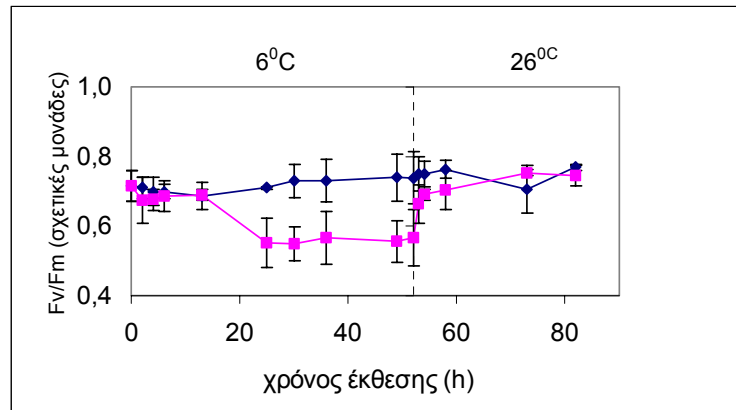
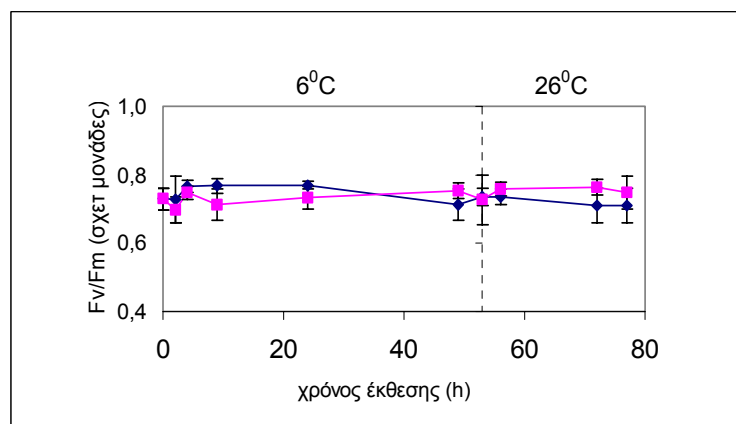
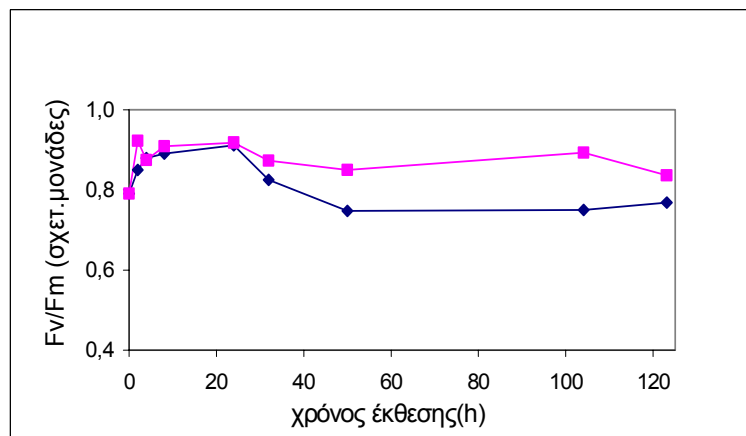
Εικόνα 3: I. Καμπύλες επαγωγικού φθορισμού φύλλων φασολιού από: **(Chilling)**, φυτά που είχαν αναπτυχθεί 10 ημέρες σε φως στους 26°C και εκτέθηκαν σε 6°C για 52 h. **(Rewarming)**, φυτά που είχαν αναπτυχθεί 10 ημέρες σε φως στους 26°C και εκτέθηκαν σε 6°C για 52 h και μετά σε 26°C για επιπλέον 24 h. **(Control)**, φυτά που είχαν αναπτυχθεί 10 ημέρες σε φως στους 26°C και παρέμειναν να αναπτύσσονται εκεί.

II. Καμπύλες επαγωγικού φθορισμού φύλλων φασολιού από: **(Chilling)**, φυτά που είχαν αναπτυχθεί 10 ημέρες σε φως στους 26°C και εκτέθηκαν σε σκοτάδι στους 6°C για 52 ώρες. **(Rewarming)**, φυτά που είχαν αναπτυχθεί 10 ημέρες σε φως στους 26°C και εκτέθηκαν σε σκοτάδι στους 6°C για 52 ώρες και μετά σε σκοτάδι στους 26°C για 24 ώρες. **(Control)**, φυτά που είχαν αναπτυχθεί 10 ημέρες σε φως στους 26°C και εκτέθηκαν στο σκοτάδι στους 26°C.

καταγραφή της κινητικής του επαγωγικού φθορισμού διότι τα φυτά αναπτύχθηκαν από τη βλάστηση τους σε απόλυτο σκοτάδι και ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός τους δεν είχε οργανωθεί.

Προκειμένου να αναδειχθεί η διαφοροποίηση της δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, καταγράφηκαν στην διάρκεια του χρόνου μέσω του επαγωγικού φθορισμού οι παράμετροι F_v/F_m , TR_o/RC , ET_o/RC , ABS/RC , DIO/RC και RC/CS_o (Βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Οι μετρήσεις αυτές του επαγωγικού φθορισμού έδωσαν πολύτιμες ενδείξεις για τη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις και ανάδειξαν το ρόλο του φωτός σε αυτή τη διαδικασία. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4, στην αρχή της επίδρασης της χαμηλής θερμοκρασίας ($6^{\circ}C$) και μέχρι 10 h ο λόγος F_v/F_m , δηλαδή, η φωτοσυνθετική απόδοση, ήταν όμοιος με τον αντίστοιχο λόγο των φυτών μαρτύρων και μετά άρχισε μια σταδιακή μείωση της τιμής του F_v/F_m , η οποία παρέμεινε σταθερή στα 0,55 μέχρι τις 52 h. Όταν τα φυτά μεταφέρθηκαν σε ψηλότερη θερμοκρασία, ο λόγος F_v/F_m , αυξήθηκε σταδιακά και επανήλθε στα 0,75 μέσα σε 24 h. Οι μεγάλες διακυμανσεις, που φαίνονται στο λόγο F_v/F_m οφείλονται στη διαφορετικότητα των φύλλων των φυτών του φασολιού. Όπως φάνηκε και από την καμπύλη του φθορισμού, στη χαμηλή θερμοκρασία μειώθηκε το F_m και αυξήθηκε το F_o . Η αύξηση του F_o πιθανόν είναι αποτέλεσμα της μειωμένης ενέργειας, που μεταφέρεται από την φωτοσυλλεκτική κεραία (LHCII) στο ενεργά κέντρα του PSII (Somersalo and Krause, 1989) και της φυσιολογικής διάσπασης του LHCII από τον πυρήνα του PSII (Barenyí and Krause, 1985).

Στα φυτά $L26^{\circ}C \rightarrow D6^{\circ}C/D26^{\circ}C$ που αναπτύχθηκαν στο φως και μετά στο σκοτάδι σε χαμηλή θερμοκρασία, η τιμή F_v/F_m διατηρήθηκε σταθερή σε όλη τη διάρκεια της μεταχείρισης. Οι τιμές διακυμάνθηκαν περίπου στο 0,75, ακόμη και όταν τα φυτά μεταφέρθηκαν από θερμοκρασία $6^{\circ}C$ και σκοτάδι σε $26^{\circ}C$ και σκοτάδι (Εικ.4B). Στα φυτά αυτά, οι χλωροπλάστες και ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός είχαν πλήρως αναπτυχθεί γιατί κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (10 ημέρες) τα φυτά βρίσκονταν σε φως και θερμοκρασία $26^{\circ}C$. Αυτό δείχνει ότι η απόδοση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού επηρεάζεται από τη χαμηλή θερμοκρασία παρουσία φωτός, ενώ κατά τη

A**B****Γ**

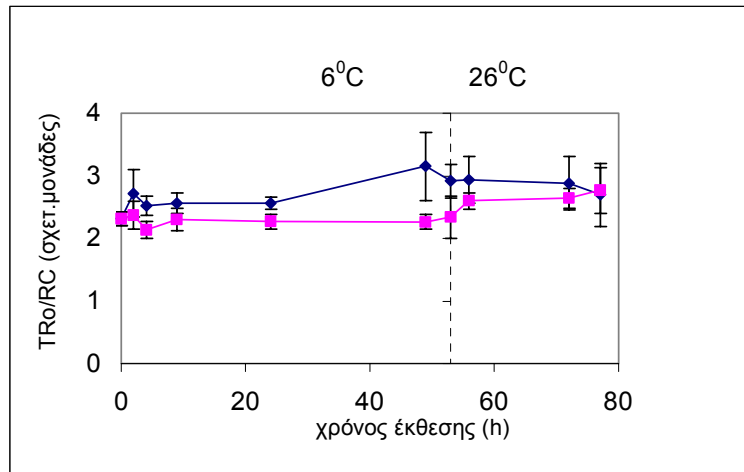
Εικόνα 4: Τιμές φωτοσυνθετικής απόδοσης Fv/Fm. **A.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε φως στους 26°C για 10 ημέρες, εκτέθηκαν στους 6°C με φως για 52 h και μεταφέρθηκαν στις αρχικές συνθήκες (26°C και φως) για 24 h (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παρέμειναν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος σε φωτισμό (70μmol.m⁻².s⁻¹) και 26°C (◆). **B.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε φως στους 26°C για 10 ημέρες, εκτέθηκαν στους 6°C στο σκοτάδι για 52 h και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στους 26°C σε σκοτάδι για επιπλέον 24 h (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παρέμειναν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (52h+24h) σε απόλυτο σκοτάδι και 26°C (◆). **Γ.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε απόλυτο σκοτάδι και 26°C για 10 ημέρες (χλωρωτικά φυτά), εκτέθηκαν στους 6°C στο σκοτάδι (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παρέμειναν για όλη τη διάρκεια του πειράματος στους 26°C και απόλυτο σκοτάδι (◆).

διάρκεια συνθηκών σκοταδιού παραμένει σχεδόν ανεπηρέαστη. Στα φυτά που αναπτύχθηκαν συνεχώς στο σκοτάδι και ως εκ τούτου ήταν χλωρωτικά και μεταφέρθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία 6⁰C, ο λόγος Fv/Fm διατηρήθηκε σε τιμές πάνω από 0,8 σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, ενώ τα φυτά που παρέμειναν συνεχώς στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία 26⁰C, οι τιμές του λόγου Fv/Fm ήταν χαμηλότερες και μειώθηκαν ακόμα περισσότερο μετά από 25 h σε σχέση με τα φυτά που ήταν σε 6⁰C και σκοτάδι. Όπως φαίνεται παρακάτω στη Εικόνα 4Γ, πιθανόν οι λίγες χλωροφύλλες, που σχηματίστηκαν στο σκοτάδι, να οργάνωσαν ενεργά φωτοσυνθετικά κέντρα αντίδρασης τα οποία λόγω έλλειψης LHCII και ως εκ τούτου λόγω περιορισμού διάχυσης της δεσμευμένης φωτονιακής ενέργειας, να εκμεταλεύονται με άριστο τρόπο την δεσμευμένη από αυτά φωτονιακή ενέργεια, δίνοντας τιμές Fv/Fm υψηλότερες από τις αντίστοιχες των άλλων πειραματικών σειρών.

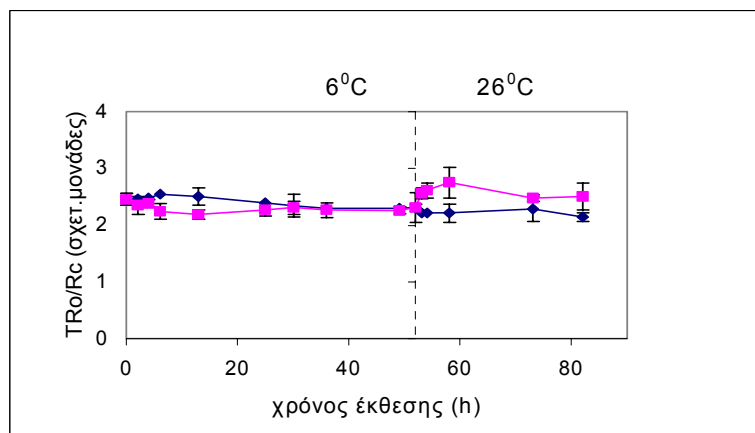
Όπως διαπιστώνεται από όλα τα αποτελέσματα, το φως σε συνδυασμό με τη χαμηλή θερμοκρασία επηρεάζει την απόδοση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του φασολιού, ενός φυτού μέτριας ευαισθησίας στο κρύο. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με τις αναφορές άλλων ερευνητών (Yakir et al., 1986) παρά το ότι αυτοί χρησιμοποίησαν μεγάλη ένταση φωτισμού σε αντίστοιχα πειράματα προκαλώντας πιθανόν φωτοαναστολή. Αντίθετα, μελέτες στη σίκαλη και το σιτάρι (μεγάλης ανθετικότητας στο κρύο), έδειξαν αύξηση της φωτοσυνθετικής ικανότητας στη διάρκεια του κρύου (Oquist and Huner, 1993). Όλες αυτές οι παρατηρήσεις δηλώνουν μία διαφορετική φωτοσυνθετική απόδοση στα διάφορα είδη φυτών, που πιθανόν οφείλεται στην ικανότητα τους (γενετικά και φυσιολογικά) να αποκτούν ανθεκτικότητα στην επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων όπως η χαμηλή θερμοκρασία.

Ο παράγοντας TRo/RC, η ενέργεια που παγιδεύεται από τα κέντρα αντίδρασης και προκαλεί την αναγωγή της Q_A στην αλυσίδα μεταφοράς των ηλεκτρονίων, μειώθηκε με τη μείωση της θερμοκρασίας από 26⁰C σε 6⁰C μέχρι τις 52 h. Όταν τα φυτά μεταφέρθηκαν ξανά στους 26⁰C, οι τιμές αυξήθηκαν, αλλά δεν έφτασαν τις τιμές των φυτών μάρτυρων, που ήταν συνεχώς στους 26⁰C (Εικ.5Α). Η μείωση της ενέργειας, που δεσμεύεται, από τα φωτοσυνθετικά κέντρα αντίδρασης στα φυτά που επέδρασε η χαμηλή θερμοκρασία, μπορεί να οφείλεται σε μείωση του αριθμού των ενεργών

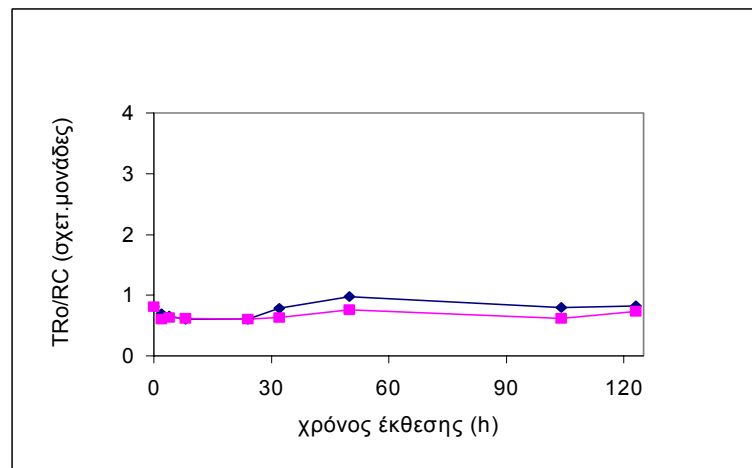
A



B



Γ



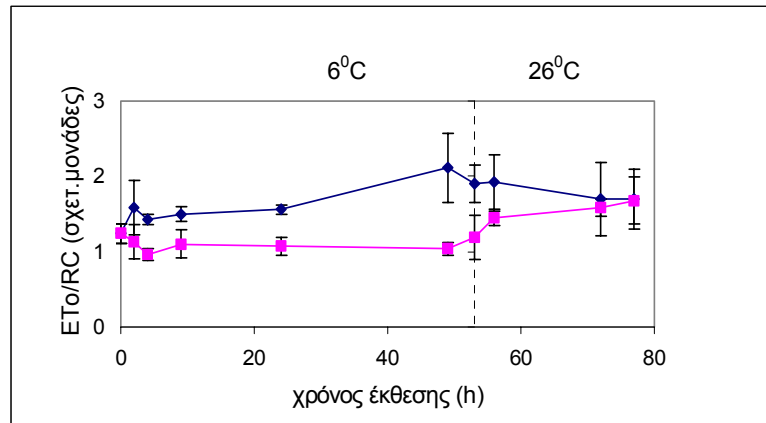
Εικόνα 5: Ενέργεια που δεσμεύεται από τα ενεργά κέντρα αντίδρασης (TRo/RC). **A.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε φως στους 26°C για 10 ημέρες, εκτέθηκαν στους 6°C με φως για 52 h και μεταφέρθηκαν στις αρχικές συνθήκες (26°C και φως) για 24 h (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παρέμειναν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος σε φωτισμό (70μmol.m⁻².s⁻¹) και 26°C (◆). **B.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε φως στους 26°C για 10 ημέρες, εκτέθηκαν στους 6°C στο σκοτάδι για 52 h και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στους 26°C σε σκοτάδι για επιπλέον 24 h (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παρέμειναν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (52h+24h) σε απόλυτο σκοτάδι και 26°C (◆). **Γ.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε απόλυτο σκοτάδι και 26°C για 10 ημέρες (χλωρωτικά φυτά), εκτέθηκαν στους 6°C στο σκοτάδι (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παρέμειναν για όλη τη διάρκεια του πειράματος στους 26°C και απόλυτο σκοτάδι (◆).

κέντρων. Η ενέργεια δεσμεύεται από τα ενεργά κέντρα και παραμένει εκεί μέχρις ότου η Q_A αναχθεί σε Q_A^- (Strasser and Strasser, 1995).

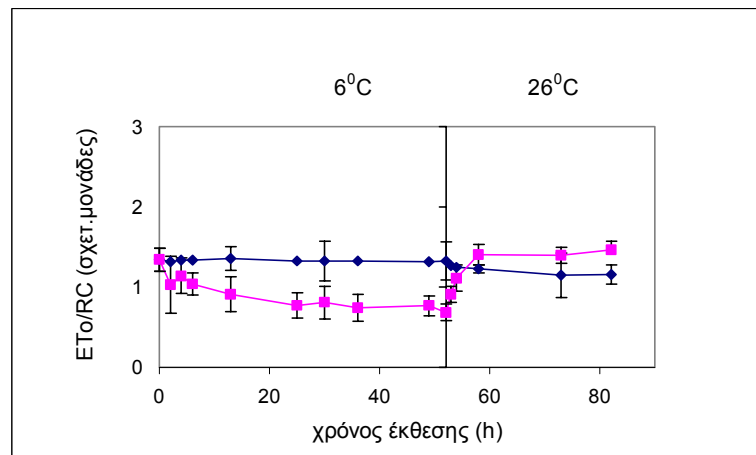
Όταν τα φυτά, που αναπτύχθηκαν στους 26°C και στο φως, μεταφέρθηκαν στο σκοτάδι σε 6°C , η ενέργεια που παγιδεύτηκε στα ενεργά κέντρα αντίδρασης μειώθηκε ελάχιστα και διατηρήθηκε περίπου στα επίπεδα των τιμών του μάρτυρα (Εικ. 5B). Όταν τα φυτά επαναμεταφέρθηκαν στο σκοτάδι και 26°C , η ενέργεια δέσμευσης αυξήθηκε περισσότερο και από την αντίστοιχη των φυτών που βρίσκονταν συνεχώς σε σκοτάδι και 26°C . Τα φυτά αυτά έχουν αναπτύξει πλήρως φωτοσυνθετικό μηχανισμό, αφού αναπτύχθηκαν για 10 ημέρες στο φως. Η έλλειψη όμως του φωτισμού, σε συνδυασμό με τη χαμηλή θερμοκρασία, μείωσε λίγο την ενέργεια που δεσμεύεται από τα ενεργά κέντρα ενώ αυξήθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας. Στα φυτά, που αναπτύχθηκαν στο απόλυτο σκοτάδι σε 26°C και σε 6°C ο παράγοντας TRo/RC , δεν μεταβλήθηκε σημαντικά. Παρατηρήθηκε μικρή μείωση της ενέργειας, που δεσμεύεται από τα ενεργά κέντρα μετά από 25 h παραμονής στο κρύο. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, η ενέργεια αυτή των χλωρωτικών φυτών ήταν μικρότερη από αυτήν των φυτών, που είχαν δεχθεί την επίδραση του φωτός. Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός δεν έχει ουσιαστικά σχηματιστεί κανονικά και η φωτοσυλλεκτική κεραία είναι μάλλον πολύ μικρή με αποτέλεσμα τα ελάχιστα ενεργά κέντρα να μην είναι ικανά να δεσμεύουν την ενέργεια και να τη χρησιμοποιούν για την αναγωγή της Q_A .

Τα λειτουργικά στοιχεία του σχήματος Z είναι διατεταγμένα έτσι ώστε, όταν η ενέργεια διοχετευθεί στα κέντρα αντίδρασης, να σχηματίζουν μία αλυσίδα μεταφοράς των ηλεκτρονίων κατά μήκος της οποίας το ηλεκτρονιακό φορτίο κινείται από τον αρχικό δότη ηλεκτρονίων, το νερό, προς τον τελικό δέκτη, το NADP^+ , με την ταυτόχρονη παραγωγή ενέργειας με τη μορφή του ATP. Η αλυσίδα μεταφοράς των ηλεκτρονίων αναγώμενη ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης, όπως δίνεται από την παράμετρο ETo/RC , μειώθηκε αμέσως μόλις τα φυτά μεταφέρθηκαν στο κρύο (6°C) και αυξήθηκε με την επαναφορά των φυτών σε θερμοκρασία 26°C (Εικ.6A). Στα φυτά, που είχαν αναπτυχθεί στο φως και μετά εκτέθηκαν σε σκοτάδι και 6°C , η λειτουργία μεταφοράς ηλεκτρονίων μειώθηκε αλλά με την μεταφορά των φυτών σε 26°C αυξήθηκε

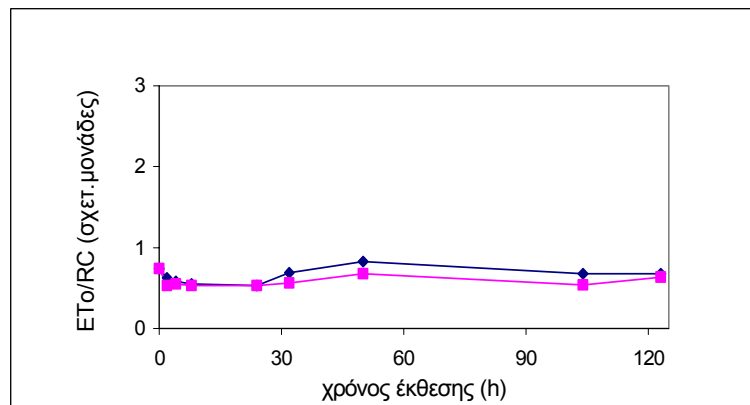
A



B



Γ



Εικόνα 6: Η λειτουργική κατάσταση της φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ET₀/RC). **A.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε φως στους 26°C για 10 ημέρες, εκτέθηκαν στους 6°C με φως για 52 h και μεταφέρθηκαν στις αρχικές συνθήκες (26°C και φως) για 24 h (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παράμειναν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος σε φωτισμό (70μmol.m⁻².s⁻¹) και 26°C (♦). **B.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε φως στους 26°C για 10 ημέρες, εκτέθηκαν στους 6°C στο σκοτάδι για 52 h και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στους 26°C σε σκοτάδι για επιπλέον 24 h (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παράμειναν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (52h+24h) σε απόλυτο σκοτάδι και 26°C (♦). **Γ.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε απόλυτο σκοτάδι και 26°C για 10 ημέρες (χλωρωτικά φυτά), εκτέθηκαν στους 6°C στο σκοτάδι (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παράμειναν για όλη τη διάρκεια του πειράματος στους 26°C και απόλυτο σκοτάδι (♦).

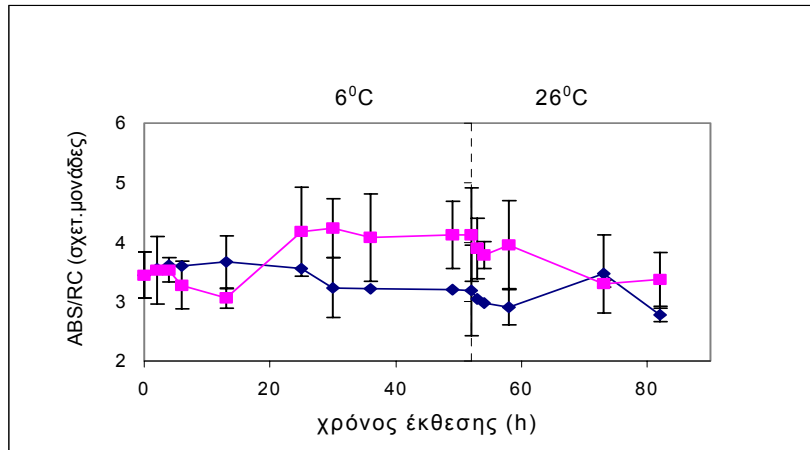
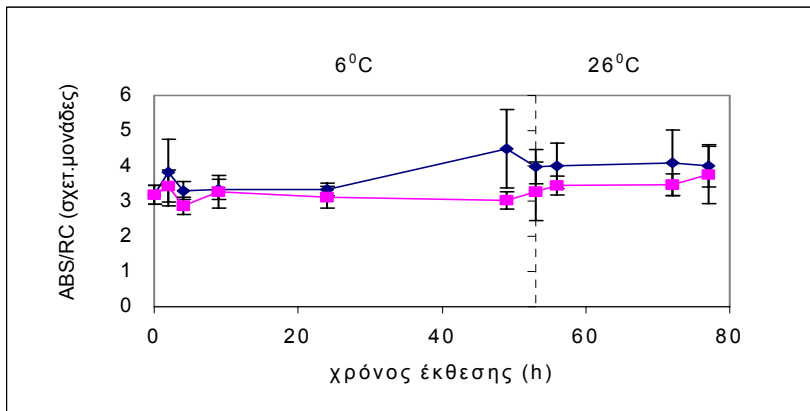
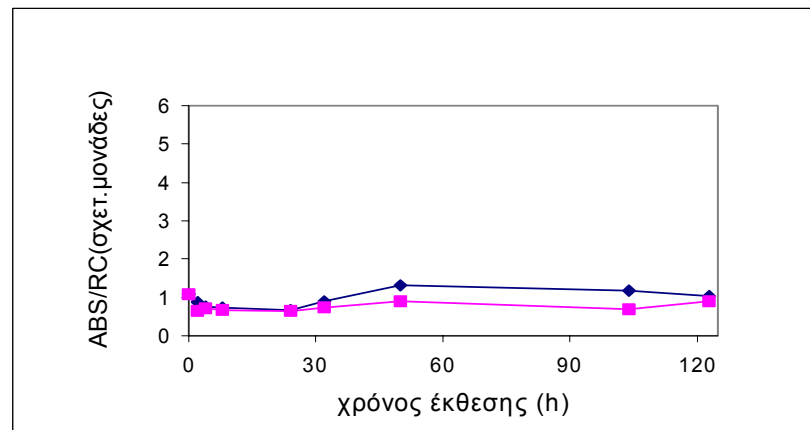
περισσότερο από τις αντιστοίχες τιμές των φυτών-μαρτύρων, που παράμειναν στο σκοτάδι σε 26⁰C (Εικ.6B).

Αντίθετα με τα παραπάνω στο απόλυτο σκοτάδι η ηλεκτρονιακή μεταφορά δεν επηρεάστηκε από τη χαμηλή θερμοκρασία 6⁰C και παράμεινε στα ίδια χαμηλά επίπεδα με το φυτά που ήταν στο σκοτάδι σε 26⁰C (Εικ.6Γ). Η χαμηλή θερμοκρασία παρεμποδίζει την ηλεκτρονιακή μεταφορά σε συνθήκες φωτός και η δεξαμενή της κινόνης γίνεται πιο αναγωγική, δηλαδή η περιορισμένη μεταφορά των ηλεκτρονίων συμβαίνει προς τη δεκτική πλευρά του PSII, όπως έχει αποδείξει και ο Bruggeman (1992).

Η μείωση της ηλεκτρονιακής μεταφοράς μπορεί να οφείλεται σε μείωση της ρευστότητας των μεμβρανών, που συμβαίνει όταν στα φυτά επιδράσει χαμηλή θερμοκρασία. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη του PSII που περιορίζει την ηλεκτρονιακή μεταφορά (McCormac et al., 1994). Οι Huner et al. (1987) και οι Krupa et al. (1987) προσδιόρισαν αλλαγή της σύστασης των λιπών των μεμβρανών με μείωση της θερμοκρασίας.

Τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα δεν συνηγορούν με αλλαγές της μεμβρανικής ρευστότητας, που επάγεται από τη χαμηλή θερμοκρασία, αφού οι διαφοροποιήσεις στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό γίνονται αισθητές μόνο με τον συνδυασμό χαμηλής θερμοκρασίας και φωτισμού. Τότε η επίδραση της χαμηλής θερμοκρασίας στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό πολλαπλασιάζεται παρουσίας φωτισμού, παρόλο που ο φωτισμός, που χρησιμοποιήθηκε, ήταν χαμηλής έντασης και δεν προκάλεσε φωτοαναστολή.

Η παράμετρος ABS/RC είναι ανάλογη με το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (LHCII) ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (Strasser et al., 1995). Υψηλές τιμές αντιστοιχούν σε μεγάλο μέγεθος LHCII ενώ μικρές τιμές σε μικρό μέγεθος LHCII. Τις πρώτες ώρες έκθεσης των φυτών (L26⁰C→L6⁰C/L26⁰C) σε χαμηλή θερμοκρασία (6⁰C) η ABS/RC μειώθηκε και μετά αυξήθηκε σταδιακά από τις 10 ως τις 52 h επώασης. Μετά την επαναφορά των φυτών στην αρχική θερμοκρασία 26⁰C, οι τιμές ABS/RC μειώθηκαν και επανήλθαν στα επίπεδα των τιμών του μάρτυρα (Εικ.7Α). Αντίθετα με τα παραπάνω, στα φυτά που αναπτύχθηκαν στο φως και θερμοκρασία 26⁰C για 10 ημέρες και μεταφέρθηκαν στους 6⁰C στο σκοτάδι, υπήρξε μόνο μια μικρή μείωση στο μέγεθος του LHCII μετά από 25 h (Εικ.7,Β). Στα φυτά που

A**B****Γ**

Εικόνα 7: Μέγεθος φωτοσυλλεκτικής κεραίας (ABS/RC). **A.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε φως στους 26°C για 10 ημέρες, εκτέθηκαν στους 6°C με φως για 52 h και μεταφέρθηκαν στις αρχικές συνθήκες (26°C και φως) για 24 h (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παράμειναν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος σε φωτισμό (70μmol.m⁻².s⁻¹) και 26°C (◆). **B.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε φως στους 26°C για 10 ημέρες, εκτέθηκαν στους 6°C στο σκοτάδι για 52 h και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στους 26°C σε σκοτάδι για επιπλέον 24 h (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παράμειναν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (52h+24h) σε απόλυτο σκοτάδι και 26°C (◆). **Γ.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε απόλυτο σκοτάδι και 26°C για 10 ημέρες (χλωρωτικά φυτά), εκτέθηκαν στους 6°C στο σκοτάδι (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παράμειναν για όλη τη διάρκεια του πειράματος στους 26°C σε απόλυτο σκοτάδι (◆).

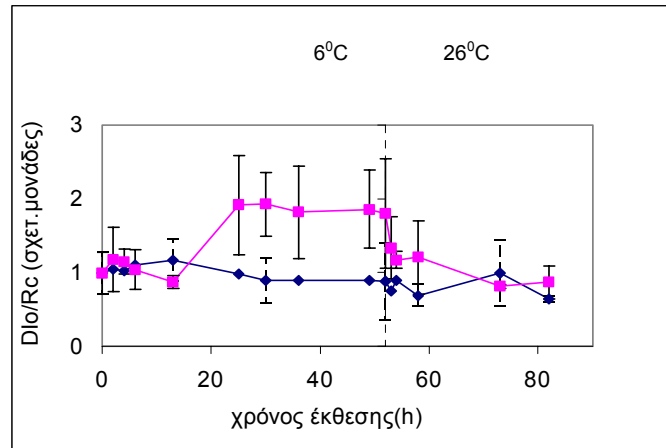
επέδρασε η χαμηλή θερμοκρασία, η φωτοσυλλεκτική κεραία έμεινε σταθερή ενώ αυξήθηκε στα φυτά μάρτυρες που παρέμειναν στους 26⁰C στο σκοτάδι. Στα φυτά, που αναπτύχθηκαν σε απόλυτο σκοτάδι και 26⁰C, η τιμή του ABS/RC παρέμεινε σε πολύ χαμηλές τιμές (χλωρωτικά φυτά) σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο φως (πράσινα φυτά). Μετά από 45 h κρύου διαπιστώθηκε μία μικρή μείωση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας, που όμως καθώς περνούσαν οι ώρες έτεινε να γίνει όμοια με το μάρτυρα. Η τιμή ABS/RC στα φυτά, που αναπτύχθηκαν στο σκοτάδι ήταν χαμηλότερη από τα υπόλοιπα φυτά γιατί τα μόρια της χλωροφύλλης της φωτοσυλλεκτικής κεραίας ήταν περιορισμένα λόγω απουσίας του φωτός. Η φωτοσυλλεκτική κεραία όπως φαίνεται δεν είχε αναπτυχθεί (Εικ.7Γ).

Το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης στα φυτά, που αναπτύχθηκαν σε φως και χαμηλή θερμοκρασία, αυξάνεται. Όμως, όπως ήδη έχει αποδειχθεί η ενέργεια που δεσμεύεται από τα ενεργά κέντρα έχει μειωθεί (Εικ.5Α) καθώς και η ηλεκτρονιακή μεταφορά (Εικ.6Α). Αυτό μπορεί να είναι αποτέλεσμα απενεργοποίησης κάποιων κέντρων αντίδρασης, τα οποία γίνονται πηγές ενεργειακής διάχυσης, όπως υποστηρίζουν και οι Kruger et al (1997) και Tsimmilli-Michael et al (1998). Ο αριθμός των ενεργών κέντρων αντίδρασης και η απόδοση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Fv/Fm) μειώθηκε, και γενικά η δομή και η λειτουργία του διαφοροποιείται για να ανταπεξέλθει στις συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας. Όσο μεγαλύτερη είναι η φωτοσυλλεκτική κεραία (LHCII), τόσο μεγαλύτερη είναι η δεσμευόμενη φωτεινή ενέργεια. Όμως, όταν μεγάλα ποσά ενέργειας διοχετεύονται από το LHCII προς τα φωτοσυνθετικά κέντρα αντίδρασης, τότε τα ενεργά κέντρα αντίδρασης, καλύπτονται πολύ γρήγορα από τα μετακινούμενα προς αυτά ηλεκτρόνια. Η συνεχής ροή ηλεκτρονίων στα ενεργά κέντρα έχει ως αποτέλεσμα ο ρυθμός παροχής να είναι μεγαλύτερος από τον ρυθμό προώθησης των ηλεκτρονίων κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς τους. Έτσι, τα ηλεκτρόνια συσσωρεύονται στα ενεργά κέντρα αντίδρασης και μειώνεται ο αριθμός των ανοικτών κέντρων αντίδρασης, δηλαδή των κέντρων εκείνων που μπορούν να δεχτούν και άλλα ηλεκτρόνια και να τα προωθήσουν αργότερα στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Η επιπλέον ενέργεια μπορεί να συλλέγεται από τις χρωστικές της φωτοσυλλεκτικής κεραίας που, εκτός από το ρόλο τους στη λειτουργία της

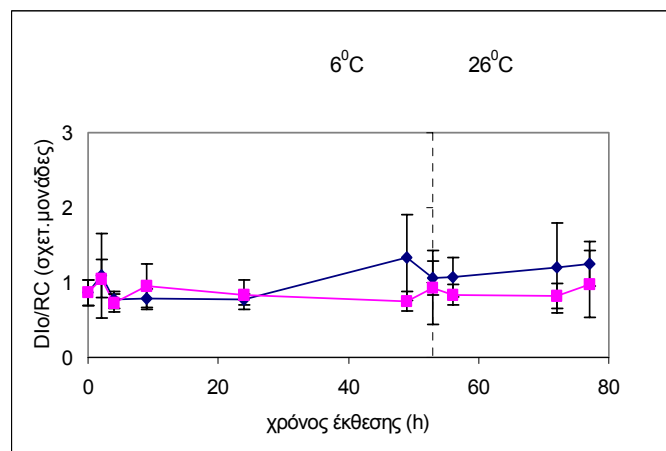
φωτοσύνθεσης, απορροφούν την επί πλέον ενέργεια και την διασκορπίζουν ως θερμότητα, περιορίζοντας επίσης και τη δράση των διεγερμένων μορίων της χλωροφύλλης (Chl*) (Melis, 1991). Στη συνέχεια μπορούν να συνεισφέρουν στην απόσβεση των AOS (ενεργών μορφών οξυγόνου) και στη 'βλάβη' των ενεργών κέντρων του PSII που αυξάνονται με τη χαμηλή θερμοκρασία (Demmig-Adams, 1990; Horton and Ruban, 1996).

Η τιμή της D_{10}/RC , που εκφράζει το συνολικό ποσό ενέργειας που διαχέεται από τα ενεργά κέντρα αντίδρασης και δεν οδηγείται στην φωτοχημεία της φωτοσύνθεσης, αυξήθηκε όντως κατά την διάρκεια της έκθεσης στο κρύο ($6^{\circ}C$) και μειώθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας ($26^{\circ}C$) (Εικ8,Α). Όπως εξηγείται και από τους Strasser et al. (1995), η συνολική ενέργεια που απορροφάται από ένα δείγμα, μπορεί να απορροφηθεί από χημικές ενώσεις η να διαχυθεί με μορφή θερμότητας. Στα φυτά που αναπτύχθηκαν στο φως και μετά στο σκοτάδι και σε χαμηλή θερμοκρασία, η τιμή της D_{10}/RC αυξήθηκε ελάχιστα τις πρώτες 25 h επώασης στους $6^{\circ}C$, στη συνέχεια μειώθηκε και παρέμεινε μειωμένη, ακόμα και όταν τα φυτά μεταφέρθηκαν στην αρχική θερμοκρασία ($26^{\circ}C$) (Εικ.8B). Αυτό συμφωνεί με τα πειραματικά δεδομένα που αφορούν το μέγεθος του LHCII, που μειώθηκε στη διάρκεια του χρόνου (εικ.7B). Τα φυτά, που αναπτύχθηκαν σε απόλυτο σκοτάδι, είχαν ελάχιστη διάχυση ενέργειας από τα ενεργά κέντρα στη διάρκεια παραμονής στο κρύο, που όπως φαίνεται στην Εικόνα 8Γ η ενέργεια διάχυσης μειώθηκε στη διάρκεια του χρόνου σε σχέση με την αντίστοιχη των φυτών μαρτύρων. Η αύξηση της ενέργειας, που διαχέεται σε συνθήκες φωτός και κρύου, οφείλεται στα πολλά ανενεργά κέντρα αντίδρασης, τα οποία προκάλεσαν την απώλεια της ενέργειας. Τα ανενεργά κέντρα, που δημιουργούνται σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας, προσφέρουν προστασία στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό σύμφωνα και με τους Greer et al. (1991), γιατί με τον τρόπο αυτό συμβάλλουν στη μείωση της ενέργειας, που διαπερνά το φωτοσυνθετικό μηχανισμό, έτσι ώστε να ανταπεξέλθει στις συνθήκες αυτές. Η τιμή της ενέργειας διάχυσης επηρεάζεται από το μέγεθος του LCHIII. Όσο μεγαλύτερη είναι η φωτοσυλλεκτική κεραία, τόσο μεγαλύτερη είναι και η ενέργεια διάχυσης. Αυτό αποδεικνύει το μηχανισμό προστασίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, που το κύτταρο εφαρμόζει, για να αποφύγει τις συνέπειες της χαμηλής θερμοκρασίας.

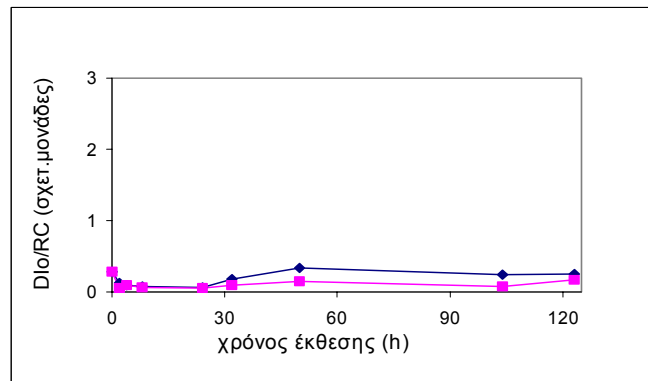
A



B



Γ

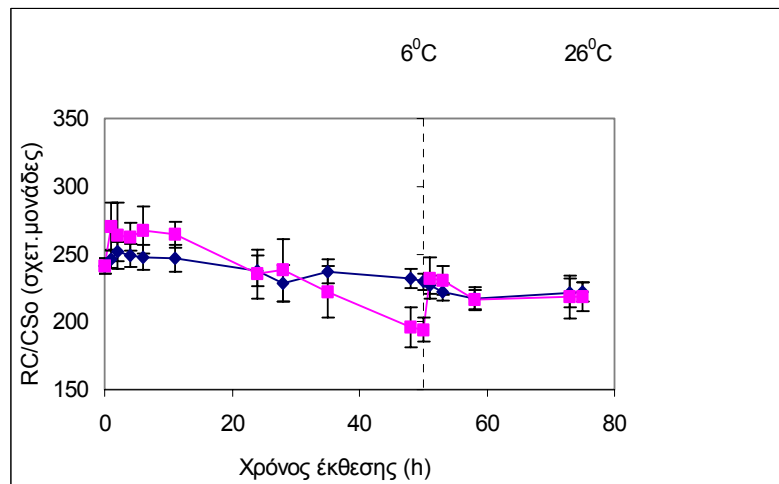


Εικόνα 8: Η δεσμευμένη φωτονιακή ενέργεια που δεν χρησιμοποιείται στην φωτοβιοχημεία της φωτοσύνθεσης αλλά διαχέεται (Dissipation energy, D1o/RC) εκφρασμένη σε σχετικές μονάδες ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης. **A.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε φως στους 26°C για 10 ημέρες, εκτέθηκαν στους 6°C με φως για 52 h και μεταφέρθηκαν στις αρχικές συνθήκες (26°C και φως) για 24 h (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παρέμειναν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος σε φωτισμό (70μmol.m⁻².s⁻¹) και 26°C (◆). **B.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε φως στους 26°C για 10 ημέρες, εκτέθηκαν στους 6°C στο σκοτάδι για 52 h και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στους 26°C σε σκοτάδι για επιπλέον 24 h (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παρέμειναν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (52h+24h) σε απόλυτο σκοτάδι και 26°C (◆). **Γ.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε απόλυτο σκοτάδι και 26°C για 10 ημέρες (χλωρωπικά φυτά), εκτέθηκαν στους 6°C στο σκοτάδι (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παρέμειναν για όλη τη διάρκεια του πειράματος στους 26°C και απόλυτο σκοτάδι (◆).

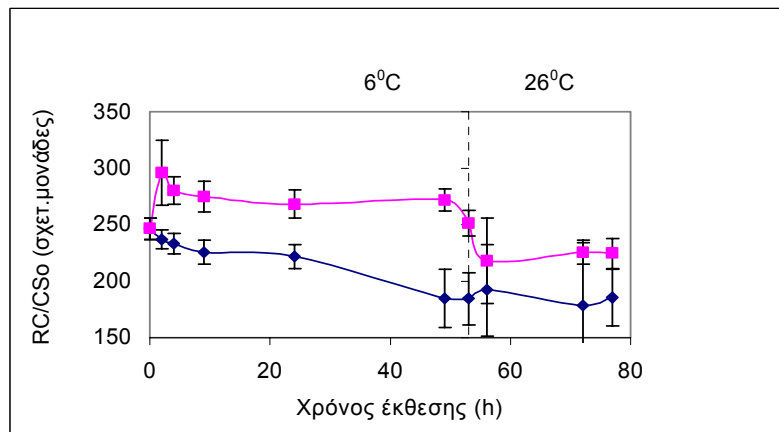
Αυτό που συμβαίνει με την ενέργεια διάχυσης μπορεί να εξηγηθεί με δύο μηχανισμούς. Στον πρώτο η ενέργεια βρίσκεται στα ενεργά κέντρα και αυτό απαιτεί τη μετατροπή μιας μεταβλητής περιοχής των ενεργών κέντρων του PSII σε ανενεργή κατάσταση και αύξηση της ικανότητάς τους να διασκορπίζουν την ενέργεια γύρω τους σε μη φωτοχημική μορφή. Στο δεύτερο η εκτόνωση της ενέργειας γίνεται στην περιοχή των χρωστικών με διαδικασία αύξησης του ποσοστού διαφυγής της ενέργειας σε θερμότητα (Horton and Ruban, 1996). Στα δύο μοντέλα, η ενέργεια διάχυσης θεωρείται ότι ρυθμίζεται από το pH του μικροχώρου των μεμβρανών των θυλακοειδών. Σύμφωνα και με τους Ruban et al. (1993), χαμηλό pH δημιουργεί αύξηση στη μη φωτοχημική ενέργεια. Για να παραμείνει το ποσοστό των ενεργών κέντρων του PSII σε διεγερμένη κατάσταση, κατά τη διάρκεια παραμονής στο κρύο, το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας αυξάνει συνεισφέροντας στην αύξηση του ποσοστού της ενέργειας διαφυγής σε μορφή θερμότητας. Επειδή η ενέργεια, που παγιδεύτηκε στα κέντρα αντίδρασης (TRo/RC), μειώθηκε και η φωτοσυνθετική κεραία αυξήθηκε κατά τη διάρκεια επίδρασης της χαμηλής θερμοκρασίας, η αύξηση της διαχεόμενης ενέργειας ήταν αναμενόμενη.

Για να δοθεί μια σαφής απάντηση στο παραπάνω σκεπτικό μετρήθηκε ο παράγοντας (RC/CSo), ο οποίος δείχνει την πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης. Μετρήσεις και στις τρεις πειραματικές σειρές έδειξαν ότι στα φυτά, που αναπτύχθηκαν στο φως, η μείωση της θερμοκρασίας από τους 26⁰C σε 6⁰C συντέλεσε στην αύξηση των ενεργών κέντρων αντίδρασης ως τις 10 h και μετά στην μείωση ως τις 52 h χαμηλής θερμοκρασίας σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες (Εικ.9Α). Με την επαναφορά των φυτών στην αρχική θερμοκρασία (26⁰C), τα ενεργά κέντρα αυξήθηκαν στο επίπεδο του μάρτυρα. Τα φυτά L26⁰C→ D6⁰C/D26⁰C, που αναπτύχθηκαν σε φως και εκτέθηκαν στο σκοτάδι και χαμηλή θερμοκρασία, παρουσίασαν αύξηση της πυκνότητας των ενεργών κέντρων ενώ όταν μεταφέρθηκαν σε 26⁰C τα ενεργά κέντρα μειώθηκαν πλησιάζοντας τις τιμές των φυτών-μαρτύρων L26⁰C→ D26⁰C/D26⁰C, (Εικ.9B). Στα φυτά της τρίτης πειραματικής σειράς (D26⁰C→ D6⁰C), που αναπτύχθηκαν αποκλειστικά σε σκοτάδι (χλωρωτικά φυτά) στους 26⁰C και μετά μεταφέρθηκαν στους 6⁰C τα ενεργά κέντρα παρουσίασαν μια αρχική μείωση και στη συνέχεια μικρή αύξηση, που στη

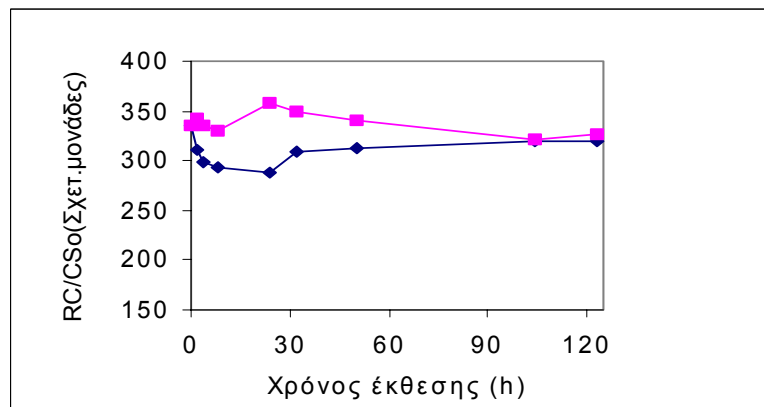
A



B



Γ



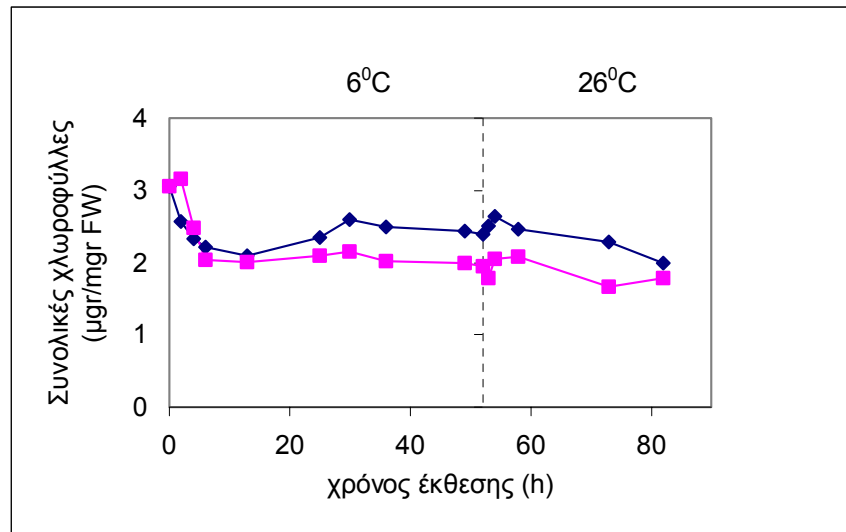
Εικόνα 9: Πυκνότητα των ενεργών φωτοσυνθετικών κέντρων (RC/CSo). **A.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε φως στους 26°C για 10 ημέρες, εκτέθηκαν στους 6°C με φως για 52 h και μεταφέρθηκαν στις αρχικές συνθήκες (26°C και φως) για 24 h (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παρέμειναν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος σε φωτισμό (70μmol.m⁻².s⁻¹) και 26°C (◆). **B.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε φως στους 26°C για 10 ημέρες, εκτέθηκαν στους 6°C στο σκοτάδι για 52 h και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στους 26°C σε σκοτάδι για επιπλέον 24 h (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παρέμειναν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (52h+24h) σε απόλυτο σκοτάδι και 26°C (◆). **Γ.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε απόλυτο σκοτάδι και 26°C για 10 ημέρες (χλωρωτικά φυτά), εκτέθηκαν στους 6°C στο σκοτάδι (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παρέμειναν για όλη τη διάρκεια του πειράματος στους 26°C σε απόλυτο σκοτάδι (◆).

διάρκεια του χρόνου είχε τάση να φτάσει στο επίπεδο του μάρτυρα. Η αύξηση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας, σε συνδυασμό με τη μείωση των ενεργών κέντρων αντίδρασης, υποδηλώνει ότι πιθανόν η αύξηση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας να οφείλεται όχι μόνο στην αύξηση του μεγέθους του LHCII αλλά και στην αύξηση των ανενεργών κέντρων. Αρχικά, όταν τα φυτά μεταφέρθηκαν στο κρύο, υπήρξε αύξηση των ενεργών κέντρων, η οποία συνοδεύτηκε με μείωση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (Εικ.7Α και Εικ.9Α). Όταν άρχισε να αυξάνεται η φωτοσυλλεκτική κεραία, όπως παρατηρήθηκε, έγινε απενεργοποίηση κάποιων ενεργών κέντρων τα οποία λειτούργησαν ως φωτοσυλλεκτική κεραία και συνέβαλλαν στη διάχυση της ενέργειας (Εικ.8Α). Κατά την επαναφορά της θερμοκρασίας σε υψηλά επίπεδα, τα ενεργά κέντρα αυξήθηκαν και αυτό συνοδεύτηκε με μείωση του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (Εικ.7Α). Αυτό διαπιστώθηκε επίσης με αντίστοιχη αύξηση της ενέργειας δέσμευσης από τα ενεργά κέντρα (TRo/RC) και αύξηση της ηλεκτρονιακής μεταφοράς ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης ET/RC, (Εικ.5Α και Εικ.6,Α).

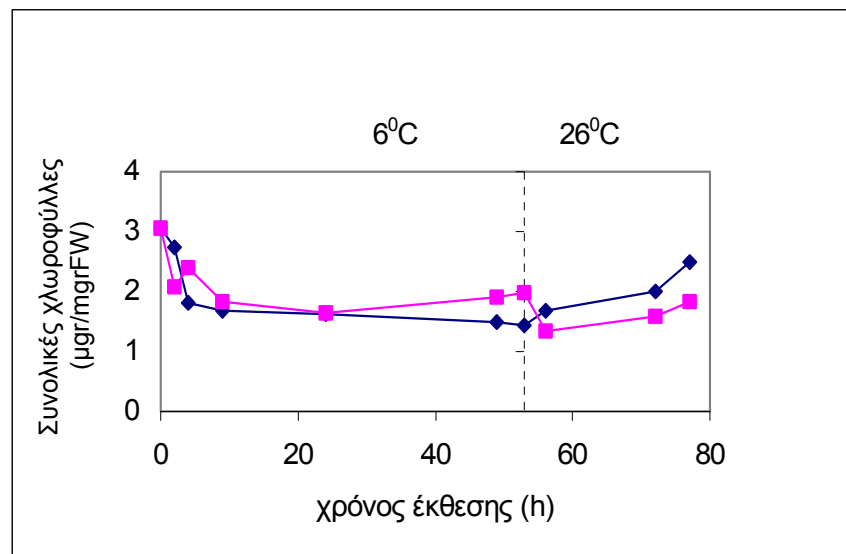
Συνοψίζοντας τα παραπάνω, ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός, για να ανταπεξέλθει σε συνθήκες κρύου σε φωτονικό περιβάλλον, αυξάνει την φωτοσυλλεκτική κεραία, μειώνοντας ταυτόχρονα τα ενεργά κέντρα αντίδρασης με αποτέλεσμα την αύξηση διάχυσης της επί πλέον ενέργειας με μορφή θερμότητας. Παράλληλα με τα παραπάνω, η μείωση της ροής των ηλεκτρονίων φαίνεται ότι ελαττώνει τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, χωρίς να τη σταματά, έτσι ώστε να αποφύγει την καταστροφή των επιμέρους στοιχείων του. Με αυτά τα δεδομένα, οι φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης μεταφέρουν μικρότερη αναγωγική ενέργεια προς τις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης (κύκλος Calvin), οι οποίες ως εκ τούτου μειώνουν και αυτές με την σειρά τους την δραστηριότητά τους. Αυτό συμφωνεί και με τα αποτελέσματα των Nie and Baker (1991), οι οποίοι διαπίστωσαν μείωση στην αφομοίωση του CO₂ στη διάρκεια της χαμηλής θερμοκρασίας. Με την αύξηση της θερμοκρασίας, όλοι οι επιμέρους παράγοντες της δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού επανέρχονται στην αρχική τους κατάσταση. Για επιβεβαίωση των παραπάνω τροποποιήσεων, η ερευνητική διαδικασία συνεχίστηκε και με αναλύσεις χλωροφυλλών και πολυαμινών.

Αναλύσεις χλωροφυλλών από φύλλα, κατά τακτά χρονικά διαστήματα σε όλη τη διάρκεια των τριών πειραματικών σειρών, έδειξαν μείωση του επιπέδου των χλωροφυλλών κατά την διάρκεια της έκθεσης σε χαμηλή θερμοκρασία, το οποίο επανήλθε ουσιαστικά στα αρχικά επίπεδα μετά την επαναφορά των φυτών στους 26⁰C. Αναφορές ερευνητών επιβεβαιώνουν τη μείωση των χλωροφυλλών με επίδραση κρύου σε συνδυασμό με υψηλότερη ένταση φωτισμού (Stamp et al., 1983; Nie et al., 1992; Haldimann et al., 1995, 1996; Haldimann, 1996, 1998). Στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε φως και 26⁰C και μετά εκτέθηκαν σε σκοτάδι και χαμηλή θερμοκρασία 6⁰C, παρατηρήθηκε μικρή αύξηση του επιπέδου των χλωροφυλλών σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες. Όταν τα φυτά μεταφέρθηκαν σε 26⁰C, το επίπεδο των Chls παρουσίασε αισθητή μείωση σε σχέση με τον μάρτυρα (Εικ.10B). Στα φυτά, που αναπτύχθηκαν σε απόλυτο σκοτάδι σε 26⁰C, η μέτρηση των χλωροφυλλών έγινε με τη μέθοδο Bouers και Woltertz, (1983) όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 'Υλικά και Μέθοδοι' για να συνεκτιμηθεί το πρωτοχλωροφυλλίδιο, που συγκεντρώνεται σε σχετικά επίπεδα στο απόλυτο σκοτάδι. Όταν χλωρωτικά φυτά εκτέθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία 6⁰C και σκοτάδι, παρατηρήθηκε μείωση του επιπέδου Chls σε σχέση με τον μάρτυρα (Εικ.11A). Επίσης η ίδια μείωση επικράτησε και στο πρωτοχλωροφυλλίδιο, όπως φαίνεται στην Εικόνα 11B. Η βιοσύνθεση των χλωροφυλλών ξεκινά από το γλουταμικό οξύ (βιοσυνθετικό μονοπάτι C₅) και η συνέχιση του βιοσυνθετικού μονοπατιού ως το πρωτοχλωροφυλλίδιο συμβαίνει και στο σκοτάδι. Στα χλωρωτικά φυτά υπάρχει αυξημένη ποσότητα πρωτοχλωροφυλλιδίου, που βρίσκεται μέσα στους ωχροπλάστες και αναμένει τα πρώτα φωτόνια για να μετατραπεί σε χλωροφυλλίδιο και στη συνέχεια σε χλωροφύλλη. Με τη μείωση της θερμοκρασίας, μειώνεται η ενεργότητα των ενζύμων του βιοσυνθετικού μονοπατιού και επομένως η ποσότητα του πρωτοχλωροφυλλιδίου μειώνεται. Αν και στην πειραματική διαδικασία τα φυτά διατηρήθηκαν σε απόλυτο σκοτάδι, δημιουργήθηκε μικρή ποσότητα χλωροφύλλης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 11A. Παρόλο που είναι γνωστό (Senger and Brinkmann, 1986) ότι η βιοσύνθεση των χλωροφυλλών στα αγγειόσπερμα σταματά στο επίπεδο του πρωτοχλωροφυλλιδίου και μόνο μέσω του φωτισμού μπορεί να γίνει η μετατροπή των ενδιάμεσων βημάτων για το σχηματισμό της χλωροφύλλης και τη δημιουργία λειτουργικού

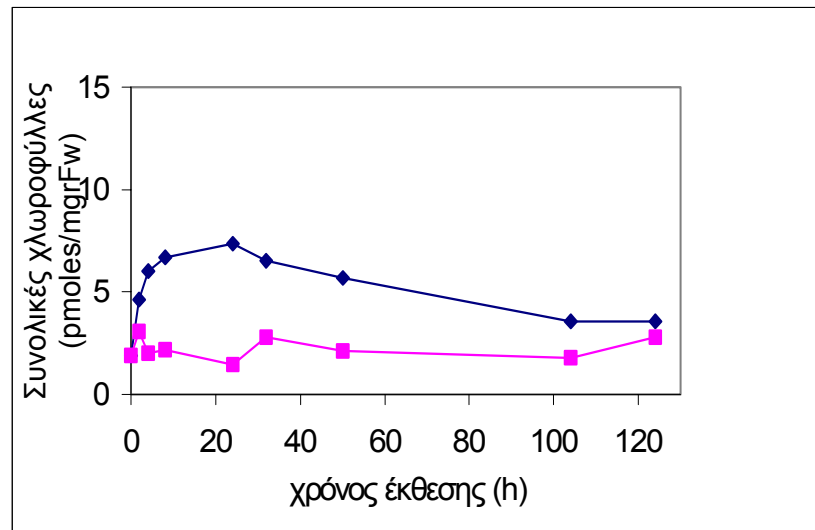
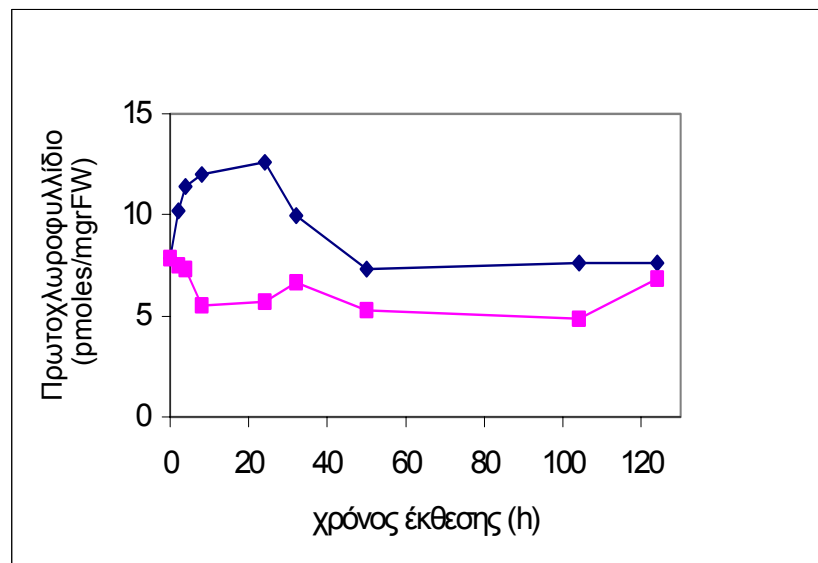
A



B



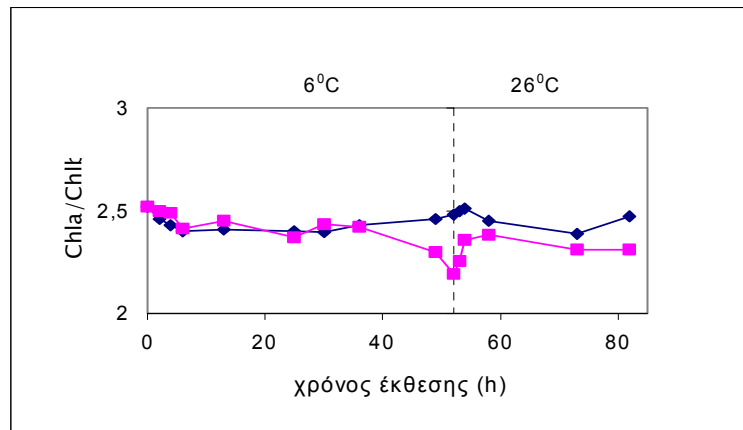
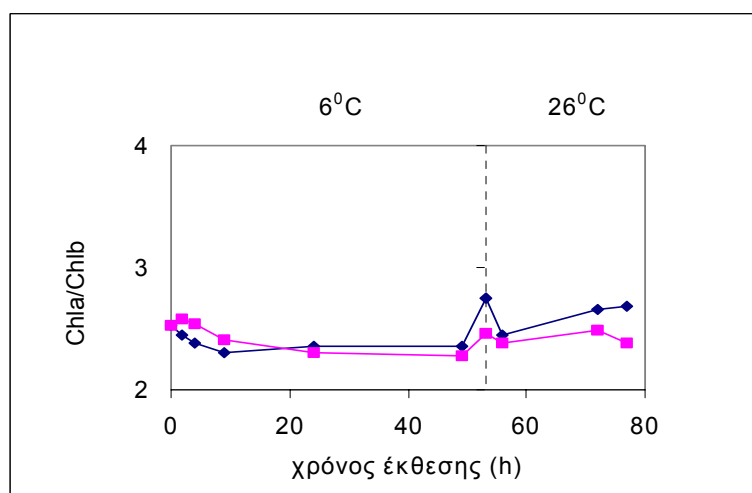
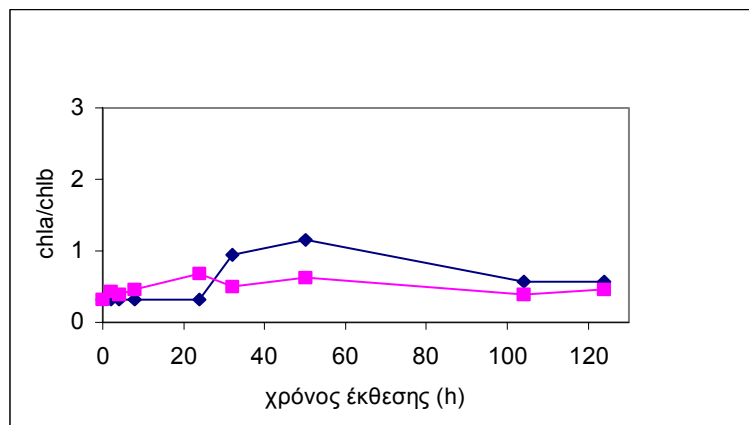
Εικόνα 10: Συγκεντρώσεις των συνολικών χλωροφυλλών (Chla+Chlb). **A.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε φως στους 26°C για 10 ημέρες, εκτέθηκαν στους 6°C με φως για 52 h και μεταφέρθηκαν στις αρχικές συνθήκες (26°C και φως) για 24 h (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παρέμειναν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος σε φωτισμό (70µmol.m⁻².s⁻¹) και 26°C (◆). **B.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε φως στους 26°C για 10 ημέρες, εκτέθηκαν στους 6°C στο σκοτάδι για 52 h και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στους 26°C σε σκοτάδι για επιπλέον h (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παρέμειναν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (52h+24h) σε απόλυτο σκοτάδι και 26°C (◆).

A**B**

Εικόνα 11: Συγκέντρωση συνολικών χλωροφυλλών (A) και πρωτοχλωροφυλλιδίου (B) σε φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε απόλυτο σκοτάδι και 26°C για 10 ημέρες (χλωρωτικά φυτά), εκτέθηκαν στους 6°C στο σκοτάδι (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παράμειναν για όλη τη διάρκεια του πειράματος στους 26°C και απόλυτο σκοτάδι (◆).

φωτοσυνθετικού μηχανισμού, τα αποτελέσματα αυτά καταλήγουν σε διαφορετικά συμπεράσματα. Η ελάχιστη ποσότητα χλωροφύλλης στο σκοτάδι, βοήθησε στο σχηματισμό του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, όπως φάνηκε και στα αποτελέσματα των τιμών του F_v/F_m (Εικ.4Γ) που διακυμάνθηκαν σε τιμές πάνω από 0.8 σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Σημαντικότερος από το επίπεδο των $Chls$ είναι ο λόγος $Chla/Chlb$. Στην πρώτη πειραματική σειρά ($L26^{\circ}C \rightarrow L6^{\circ}C/L26^{\circ}C$), η χαμηλή θερμοκρασία $6^{\circ}C$ στις πρώτες 20 h έκθεσης διατηρήθηκε στα επίπεδα των φυτών μαρτύρων και στη συνέχεια ακολούθησε μία πτωτική πορεία ως τις 52 ώρες. Αυξήθηκε ξανά μόλις τα φυτά μεταφέρθηκαν σε θερμοκρασία $26^{\circ}C$ (Εικ.12Α). Αυτό δείχνει μια αύξηση της $Chlb$, που συμβαίνει όταν αρχίζει να αυξάνεται η φωτοσυλλεκτική κεραία (LHCII), που είναι το χλωροφυλλοπρωτεϊνικό σύμπλοκο του φυτικού κυττάρου με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση μορίων χλωροφύλλης b (Erickson, 1992). Επομένως η αύξηση του LHCII έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ποσότητας των μορίων της χλωροφύλλης b και συνεπώς την ελάττωση του λόγου $Chla/Chlb$, ενώ αντίθετα, μείωση του LHCII συνοδεύεται από αύξηση του λόγου αυτού. Όπως απόδειξαν και οι Walters et al. (1994), οποιαδήποτε αλλαγή στο μέγεθος του LHCII προκαλεί αντίστροφα ανάλογη μεταβολή του $Chla/Chlb$. Η μείωση του λόγου $Chla/Chlb$ κατά τον Nie and Baker (1991) συσχετίζεται με χαμηλό ποσοστό των ενεργών κέντρων του PSII, όπως αποδείχτηκε και από τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας (Εικ.9Α). Η μείωση των ενεργών φωτοσυνθετικών κέντρων μπορεί να εξηγήσει παράλληλα και τη μειωμένη ροή των ηλεκτρονίων (ETo) στα PSI και PSII (Εικ.6Α) όπως απόδειξαν οι Nie and Baker, (1991) και (1995), αλλά με διαφορετικές συνθήκες φωτισμού. Αντίθετα, στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε φως και $26^{\circ}C$ και μετά επέδρασε σκοτάδι και κρύο ($6^{\circ}C$), ο λόγος $Chla/Chlb$ παρέμεινε σχεδόν σταθερός και είχε μικρή μείωση όταν τα φυτά μεταφέρθηκαν σε σκοτάδι και $26^{\circ}C$. Αυτό συμφωνεί και επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα του μεγέθους του LHCII (Εικ.7B) αυτών των φυτών, που παρέμεινε σε όλη τη διάρκεια του πειράματος σχεδόν αμετάβλητο. Στα φυτά, που αναπτύχθηκαν σε απόλυτο σκοτάδι (χλωρωτικά φυτά) και μετά επέδρασε χαμηλή θερμοκρασία και σκοτάδι οι τιμές του λόγου $Chla/Chlb$ κυμάνθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα από τις τιμές των φυτών, που

A**B****Γ**

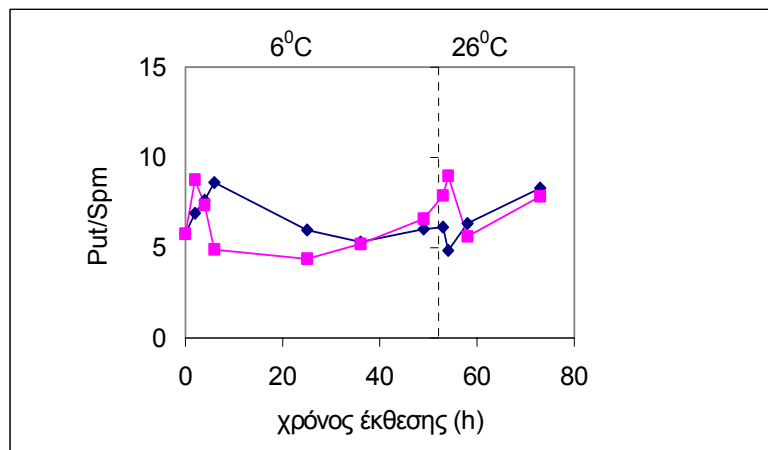
Εικόνα 12: Μεταβολή του λόγου Chla/Chlb των φύλλων φασολιού. **A.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε φως στους 26°C για 10 ημέρες, εκτέθηκαν στους 6°C με φως για 52 h και μεταφέρθηκαν στις αρχικές συνθήκες (26°C και φως) για 24 h (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παράμειναν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος σε φωτισμό (70μmol.m⁻².s⁻¹) και 26°C (♦). **B.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε φως στους 26°C για 10 ημέρες, εκτέθηκαν στους 6°C στο σκοτάδι για 52 h και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στους 26°C σε σκοτάδι για επιπλέον 24 h (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παράμειναν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (52h+24h) σε απόλυτο σκοτάδι και 26°C (♦). **Γ.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε απόλυτο σκοτάδι και 26°C για 10 ημέρες (χλωρωτικά φυτά), εκτέθηκαν στους 6°C στο σκοτάδι (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παράμειναν για όλη τη διάρκεια του πειράματος στους 26°C και απόλυτο σκοτάδι (♦).

αναπτύχθηκαν στο φως. Αυτό εξηγεί ότι υπάρχει, με μαθηματική εκτίμηση, μία τεχνητή αύξηση χλωροφύλλης β, λόγω του ότι το πρωτοχλωροφυλλίδιο, που είναι αυξημένο, απορροφά δίπλα στη χλωροφύλλη β με συνέπεια να παίρνει μέρος στην αύξηση αυτή (της χλωροφύλλης β).

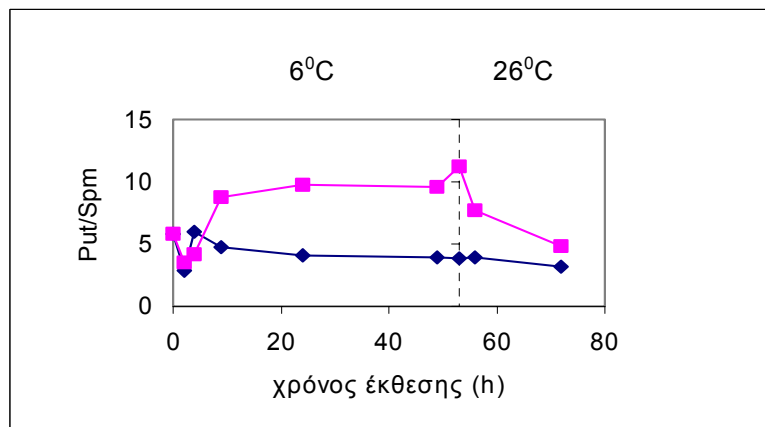
Επειδή πρόσφατα διαπιστώθηκε η συμμετοχή των πολυαμινών στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό (Kotzabasis et al., 1993a), στη φωτοσυνθετική δραστηριότητα (Galston et al., 1983; Kotzabasis and Senger, 1994) στην ανάπτυξη του χλωροπλάστη (Andreadakis and Kotzabasis, 1996), αλλά και στη διαδικασία της φωτοπροσαρμογής του φωτοσυνθετικού μηχανισμού με την ρύθμιση του μεγέθους του LHCII (Kotzabasis et al., 1999), έγιναν μετρήσεις ολικών πολυαμινών για να διαπιστωθούν τυχόν διακυμάνσεις τους με την εναλλαγή της θερμοκρασίας. Έτσι μετρήθηκε η ενδοκυτταρική περιεκτικότητα σε πουτρεσίνη (Put), σπερμιδίνη (Spd) και σπερμίνη (Spm), όπως επίσης ο λόγος Put/Spm, που έχει θεωρηθεί ως δείκτης του βαθμού φωτοπροσαρμογής του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και ως εκ τούτου του μεγέθους του LHCII (Kotzabasis et al., 1999). Τα αποτελέσματα των πολυαμινών δεν παρουσιάζονται. Επειδή ο λόγος των ενδοκυτταρικών Put/Spm συνδέεται με το μέγεθος του LHCII με σχέση αντιστρόφως ανάλογη (Kotzabasis et al., 1999b), έγιναν μετρήσεις του λόγου αυτού στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε φως και μετά επέδρασε χαμηλή θερμοκρασία (Εικ.13). Ο λόγος Put/Spm τις πρώτες ώρες κρύου έδωσε τιμές χαμηλότερες των αντιστοίχων του μάρτυρα και όταν μεταφέρθηκαν τα φυτά στην αρχική θερμοκρασία (26⁰C) επανήλθε και ο λόγος Put/Spm στα επίπεδα του μάρτυρα (Εικ.13Α). Στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε φως και μετά επέδρασε χαμηλή θερμοκρασία και σκοτάδι, ο λόγος Put/Spm μετά από 5 h αυξήθηκε και παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα ενώ η μεταφορά του στους 26⁰C και σκοτάδι οδήγησε στην μείωση του έτσι ώστε μετά από 24 h επώασης σε αυτές τις συνθήκες να φτάσει τις τιμές του μάρτυρα (Εικ.13Β). Τα φυτά, που αναπτύχθηκαν στο σκοτάδι, είχαν πολύ μικρό λόγο Put/Spm που αυξήθηκε όταν τα φυτά μεταφέρθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία και σκοτάδι (Εικ.13Γ).

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της σχέσης Put/Spm επιβεβαίωσαν όλα τα προηγούμενα αποτελέσματα, που αφορούσαν αλλαγές της δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας. Ο λόγος Put/Spm ήταν αντιστρόφως ανάλογος με το

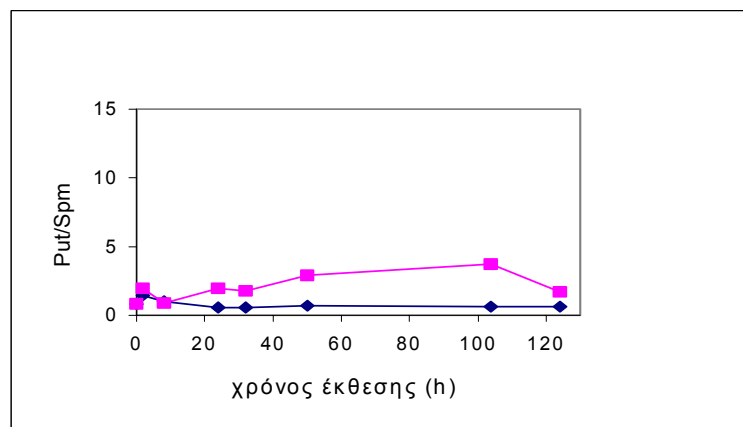
A



B



Γ



Εικόνα 13: Ο λόγος πουτρεσίνης προς σπερμίνη (Put/Spm). **A.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε φως στους 26°C για 10 ημέρες, εκτέθηκαν στους 6°C με φως για 52 h και μεταφέρθηκαν στις αρχικές συνθήκες (26°C και φως) για 24 h (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παράμειναν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος σε φωτισμό (70μmol.m⁻².s⁻¹) και 26°C (◆). **B.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε φως στους 26°C για 10 ημέρες, εκτέθηκαν στους 6°C στο σκοτάδι για 52 h και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στους 26°C σε σκοτάδι για επιπλέον 24 h (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παράμειναν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (52h+24h) σε απόλυτο σκοτάδι και 26°C (◆). **Γ.** Φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε απόλυτο σκοτάδι και 26°C για 10 ημέρες (χλωρωτικά φυτά), εκτέθηκαν στους 6°C στο σκοτάδι (■). Τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παράμειναν για όλη τη διάρκεια του πειράματος στους 26°C σε απόλυτο σκοτάδι (◆).

μέγεθος του LHCII όπως φαίνεται στην εικόνα 7A. Η μικρή αύξηση του λόγου τις πρώτες ώρες, συμφωνεί με τη μείωση του LHCII, ενώ η τάση μείωσης του λόγου προμηνύει την αύξηση του LHCII. Στα φυτά, που επέδρασε χαμηλή θερμοκρασία και σκοτάδι, η αύξηση του λόγου Put/Spm υποστηρίζει την μείωση του LHCII όπως αυτή καταγράφηκε (Εικ.7B). Σύμφωνα με τους Kotzabasis et al. (1999), ο λόγος Put/Spm αποτελεί ρυθμιστικό μηχανισμό του μεγέθους του LHCII κατά την διαδικασία της φωτοπροσαρμογής του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Η σταδιακή μείωση του λόγου Put/Spm με επίδραση της χαμηλής θερμοκρασίας φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην προστασία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, σύμφωνα με τους Besford et al. (1993), όπου έχουν δείξει ότι μείωση της Put ή η αύξηση της Spm επιβραδύνει την αποδόμηση των D1 και D2 πρωτεϊνών του PSII.

Όλα τα παραπάνω δείχνουν ότι το μέγεθος του LHCII παίζει έναν κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση της δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού με μείωση της θερμοκρασίας. Διευκρινίστηκε ότι αυτή η αύξηση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας είναι εν μέρει αποτέλεσμα της μετατροπής των ενεργών κέντρων αντίδρασης σε ανενεργά, αλλά οι καταγραφές των σχέσεων Chla/Chlb και Put/Spm δίνουν μια πρώτη σοβαρή ένδειξη ότι η αύξηση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας σε χαμηλή θερμοκρασία είναι αποτέλεσμα και της αύξησης του LCHII. Για αυτό το λόγο επιδιώχθηκε η απομόνωση και η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του LCHII αλλά και των επιμέρους υποσυμπλόκων του, ολιγομερών και μονομερών μορφών του. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν:

Φυτά που αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 26⁰C και φωτισμό 70μmolm⁻²s⁻¹ επί 10 ημέρες και συνέχισαν να βρίσκονται σε αυτές τις συνθήκες μέχρι το τέλος του πειράματος (μάρτυρας).

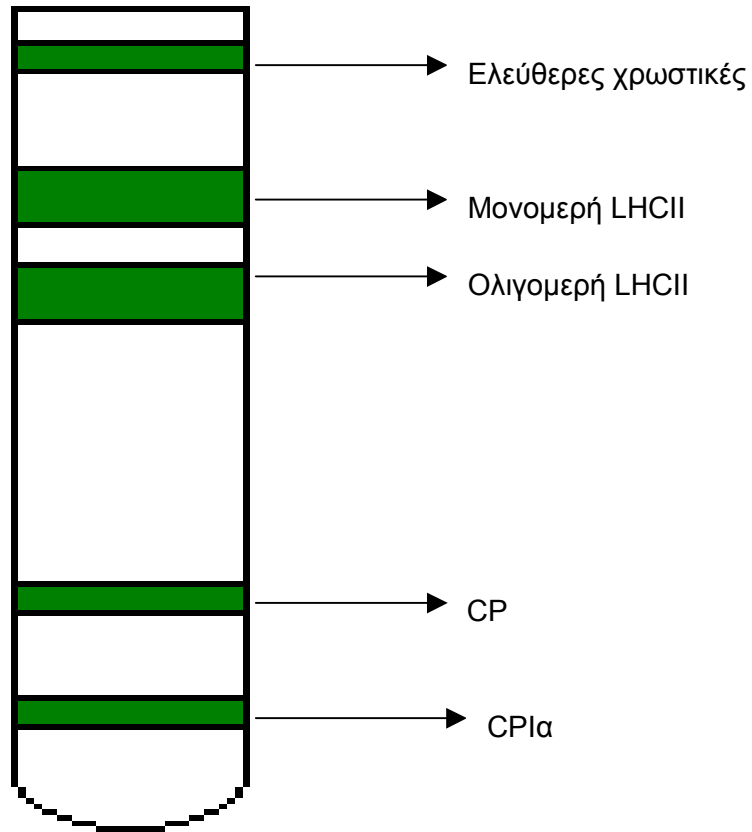
Φυτά που αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 26⁰C και φωτισμό 70μmolm⁻²s⁻¹ επί 10 ημέρες και μετά στον ίδιο φωτισμό και χαμηλή θερμοκρασία 6⁰C επί 52 ώρες (chilling).

Φυτά που αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 26⁰C και φωτισμό 70μmolm⁻²s⁻¹ επί 10 ημέρες, μετά τον ίδιο φωτισμό και χαμηλή θερμοκρασία 6⁰C επί 52 ώρες και μετά ξανά σε θερμοκρασία 26⁰C (rewarming).

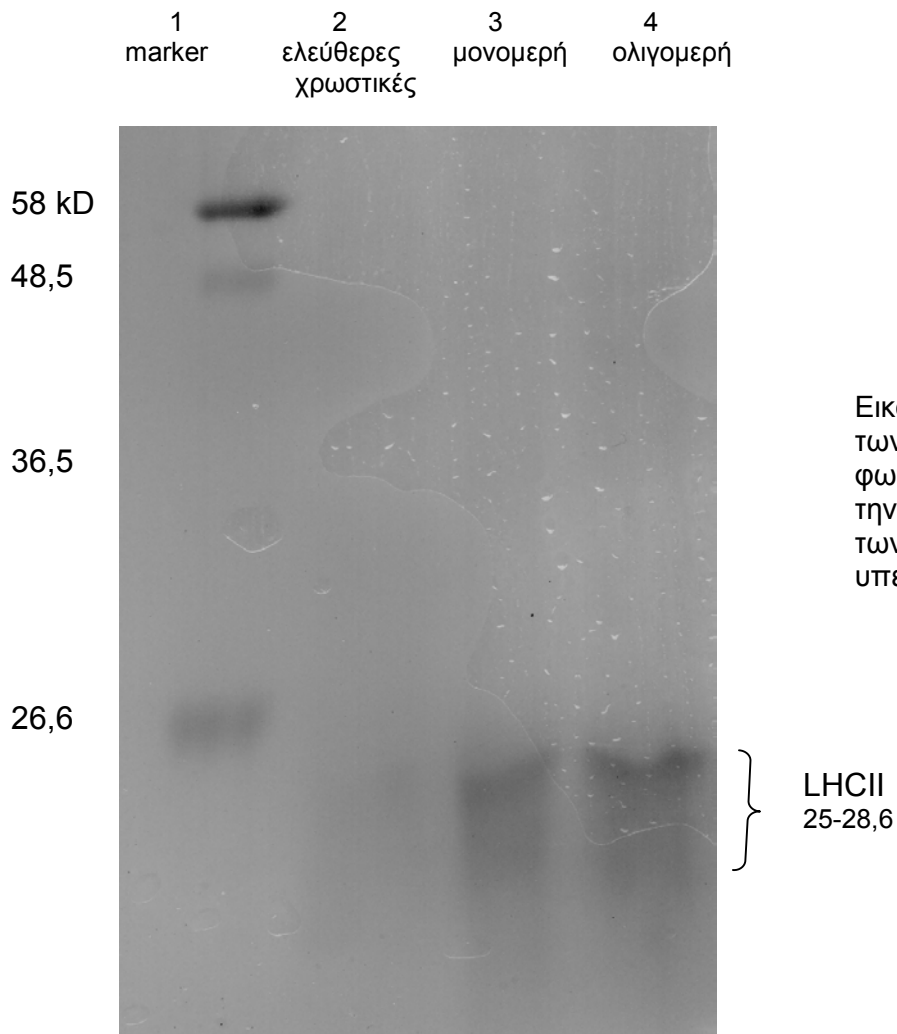
Απομονώθηκαν χλωροπλάστες από τα φύλλα των φυτών των τριών αυτών μεταχειρήσεων και στη συνέχεια οι μεμβράνες θυλακοειδών του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Τελικά η πειραματική διαδικασία συνεχίστηκε με την απομόνωση του συμπλόκου της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (LHCII) και την κλασμάτωση του σε μονομερή και ολιγομερή με την μέθοδο των Argyroudi-Akoynoglou et al., (1981). Ο διαχωρισμός των υποσυμπλόκων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, έγινε με υπερφυγοκέντρηση με διαβάθμιση σακχαρόζης 5%-22% όπως φαίνεται στην Εικόνα 14.

Όπως είναι γνωστό στη δομή του LHCII, συμμετέχουν πέντε χλωροφυλλοπρωτεϊνικά υποσύμπλοκα καθένα από τα οποία φέρει διαφορετικό αποπρωτεϊνικό τμήμα. Κάθε τέτοιο σύμπλοκο είναι ένα τριμερές, που προκύπτει από τη συνένωση τριών διαφορετικών πρωτεϊνικών μονομερών (Dreyfuss et al., 1994; Kalosakas et al., 1981). Επομένως, το LHCII βρίσκεται τόσο με τη μορφή των μονομερών του όσο και με την περισσότερο λειτουργική μορφή των τριμερών. Η τελευταία αποτελεί το ανώτερο, στάδιο λειτουργικής οργάνωσης του LHCII και προκύπτει από την συνένωση τριών διαφορετικών μονομερών (Dreyfuss et al., 1994; Guseinova et al., 2000).

Μετά την επιτυχή απομόνωση των κλασμάτων των θυλακοειδών μεμβρανών διερευνήθηκε η ακριβής ταυτότητα των κλασμάτων αυτών, για να διαπιστωθεί αν αντιπροσώπευαν τη φωτοσυνθετική κεραία (LHCII) και τα υποσύμπλοκα της (μονομερή και ολιγομερή). Μετά από ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό και ανοσοανίχνευση (Western blotting) επιβεβαιώθηκε ότι το 2^ο από πάνω κλάσμα είναι η μονομερής μορφή και η 3^η η ολιγομερής μορφή του LHCII (Εικ.15,16). Η κλασμάτωση των επιμέρους υποσυμπλόκων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού έγινε από συγκεκριμένη ποσότητα απομονωμένων θυλακοειδών (550μg chl). Η συλλογή των επιμέρους κλασμάτων (ολιγομερή και μονομερή του LHCII) και ο ολικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών τους δείχνει τη σχετική ποσότητα του LHCII συνολικά, αλλά και των επιμέρους μορφών του (ολιγομερή + μονομερή). Τα αποτελέσματα (Εικ.17) δείχνουν συνολική αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών των δύο κλασμάτων (ολιγομερή + μονομερή) του LHCII των φυτών, που είχαν την επίδραση της χαμηλής θερμοκρασίας για 52 h, σε σχέση με τα φυτά που ήταν συνεχώς σε 26^οC. Επανεκθεση των φυτών σε



Εικόνα 14: Κλάσματα υπερφυγοκέντρωσης απομονωμένων θυλακοειδών του *Phaseolus vulgaris* σε διαβάθμιση σακχαρόζης (5% - 22%) βάσει της μεθόδου των Argyroudi-Akoymoglou (1981). Η κορυφαία ζώνη περιλαμβάνει τις ελεύθερες χρωστικές και μόρια λιπιδικής φάσης των θυλακοειδών. Η δεύτερη είναι η ζώνη των μονομερών του LHCII και τρίτη η ζώνη των ολιγομερών (τριμερών) του LHCII. Τέταρτη εμφανίστηκε η ζώνη με πρωτεΐνες των κέντρων αντίδρασης του PSII (core proteins) και πέμπτη η ζώνη με το LHCI και πρωτεΐνες των κέντρων αντίδρασης του PSI.



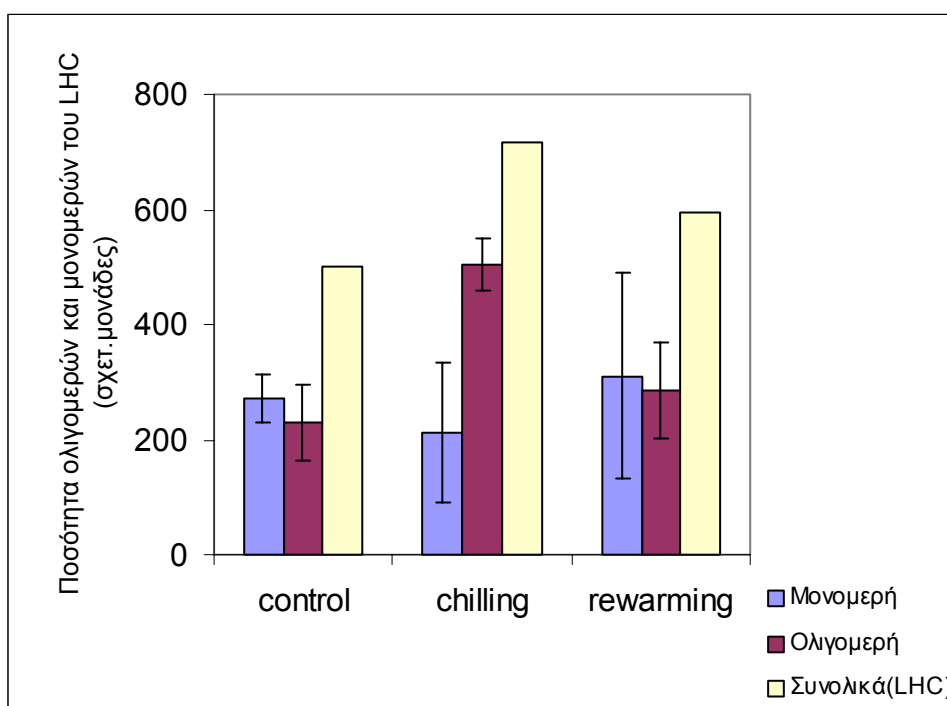
Εικόνα 15 : Ηλεκτροφόρηση SDS των υποσυμπλόκων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού μετά την αποδιάταξη και κλασμάτωση των θυλακοειδών μεμβρανών με υπερφυγοκέντρηση.



Εικόνα 16 : Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών (Western Blot) των απομονωμένων υποσυμπλόκων του LHCII (ολιγομερή, μονομερή).

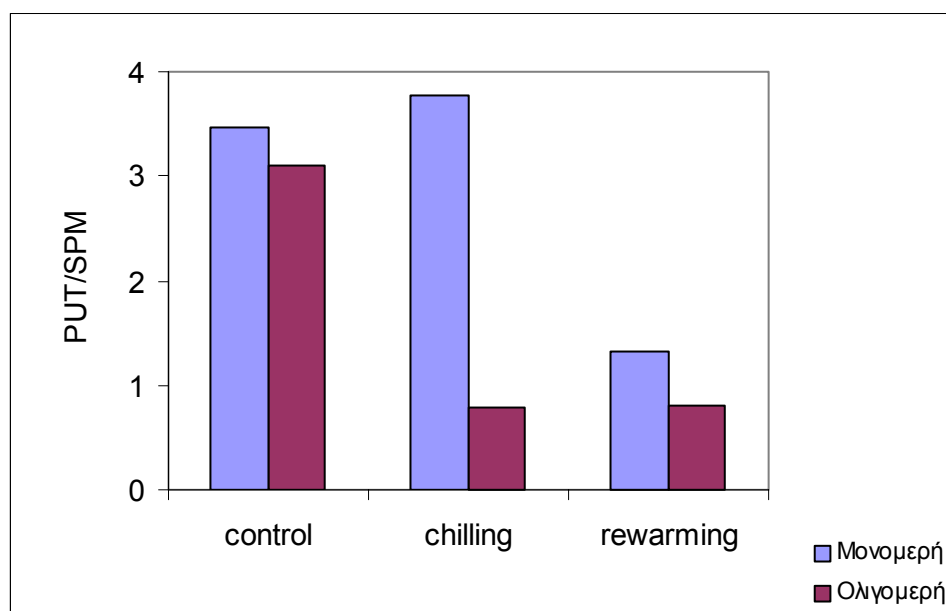
Ελεύθερες χρωστικές μονομερή ολιγομερή

θερμοκρασία 26⁰C για 24 h μείωσε πάλι το LHCII. Αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα του επαγωγικού φθορισμού, όπου το μέγεθος της φωτοσυνθετικής κεραίας (ABS/RC) αυξήθηκε κατά τη διάρκεια έκθεσης στη χαμηλή θερμοκρασία και μειώθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας. Επίσης, βρέθηκε ότι στη χαμηλή θερμοκρασία αυξάνονται τα ολιγομερή και μειώνονται τα μονομερή του LHCII. Αντίθετα με επαναφορά της θερμοκρασίας στους 26⁰C για 24 h (rewarming) τα μονομερή αυξάνονται και τα ολιγομερή μειώνονται (Εικ.17). Τα ίδια αποτελέσματα προέκυψαν όταν το μέγεθος του LHCII καταγράφηκε ως συγκέντρωση των χλωροφυλλών στα μονομερή και ολιγομερή του LHCII (αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).



Εικόνα 17: Ποσότητα της φωτοσυνθετικής κεραίας (LHCI) και των υποσυμπλόκων της μονομερών και ολιγομερών του σε σχετικές μονάδες, από φυτά που παράμειναν συνεχώς σε 26⁰C (control), από φυτά που εκτέθηκαν στους 6⁰C για 52 h (chilling) και από φυτά που εκτέθηκαν στους 6⁰C επί 52 h και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στους 26⁰C για 24 h (rewarming).

Η εκχύλιση και η HPLC-ανάλυση των πολυαμινών από τα απομονωμένα κλάσματα ολιγομερή και μονομερή του LHCII, έδειξαν ότι ο λόγος Put/Spm στα μονομερή είναι υψηλότερος από τον αντίστοιχο στα ολιγομερή του LHCII. Η μεταφορά των φυτών σε χαμηλή θερμοκρασία συνοδεύεται με επιπλέον αύξηση του λόγου Put/Spm στα μονομερή και δραστική μείωση του στα ολιγομερή (Εικ.18). Αυτό, σε συνδυασμό και με τα παραπάνω αποτελέσματα, υποδεικνύει ότι η μείωση της σχέσης Put/Spm δε ρυθμίζει μόνο το μέγεθος του LHCII, αλλά και την οργάνωσή του σε πλήρως λειτουργική μορφή (τριμερής).



Εικόνα 18: Ο λόγος Put/Spm των μονομερών και ολιγομερών του LHCII, σε φυτά που παράμειναν συνεχώς σε 26°C (control), σε φυτά που εκτέθηκαν στους 6°C για 52 h (chilling) και σε φυτά που εκτέθηκαν στους 6°C επί 52 h και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στους 26°C για 24 h (rewarming).

Από όλα τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας φαίνεται ότι ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός προσαρμόζεται άμεσα σε θερμοκρασιακές διακυμάνσεις με τροποποιήσεις, που επικεντρώνονται σε διαφοροποιήσεις στην πυκνότητα των ενεργών φωτοσυνθετικών κέντρων και της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, αλλά κυρίως στην διαφοροποίηση του μεγέθους και της οργάνωσης του LHCII για την καλύτερη διαχείριση της επί πλέον ενέργειας.

Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα αυτής της ερευνητικής προσέγγισης, συνάγονται τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός έχει την δυνατότητα να προσαρμόζει άμεσα την δομή και λειτουργία του σε θερμοκρασιακές διακυμάνσεις.
- Η μείωση της φωτοσυνθετικής ροής των ηλεκτρονίων, η μείωση της πυκνότητας των ενεργών φωτοσυνθετικών κέντρων, σε συνδυασμό με την αύξηση του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής κεραίας, είναι οι άμεσες αποκρίσεις του φωτοσυνθετικού μηχανισμού κατά την έκθεσή του σε χαμηλή θερμοκρασία, που οδηγεί σε μείωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης F_v/F_m . Η επαναφορά από την χαμηλή στην υψηλή θερμοκρασία επαναφέρει τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό, σχετικά γρήγορα, στην αρχική του κατάσταση.
- Η επίδραση του φωτός στη διαφοροποίηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού κατά την έκθεσή του σε χαμηλή θερμοκρασία είναι μέγιστη και μπορεί να επικεντρωθεί στη μεγάλη αύξηση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας, ως αποτέλεσμα της μετατροπής μέρους των ενεργών φωτοσυνθετικών κέντρων αντίδρασης σε ανενεργά αλλά και της σημαντικής αύξησης του LHCII. Η αύξηση του LHCII συνοδεύεται και με την διαφοροποίηση της οργάνωσής του, που οδηγεί στην αύξηση των ολιγομερών και μείωση των μονομερών του μορφών. Αυτή η αύξηση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας δίνει την μοναδική δυνατότητα διάχυσης της επί πλέον φωτονιακής ενέργειας, που δεν θα διοχετευθεί στην φωτοχημεία της φωτοσύνθεσης, προσδίδοντας έτσι πλήρη προστασία από την υπερδιέγερση (Excitation pressure) του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Βιβλιογραφία

1. Agati, G., Cerovic, Z., Moya, I. (2000). The effect of decreasing temperature up to chilling values on the in vivo F685/F735 chlorophyll fluorescence ratio in *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum*: The role of the Photosystem I contribution to the 735 nm fluorescence band. *Photochem. and Photob.* 72(1): 75-84.
2. Allen D.J., Ratner, K., Giller, Y.E., Gussakovsky, E.E., Shahak, Y., Ort, D.R. (2000). An overnight chill induces a delayed inhibition of photosynthesis at midday in mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Experim Bot.* 51(352):1893-1902.
3. Andreadakis, A. and Kotzabasis, K. (1996). The role of polyamines in the chloroplast photodevelopment. Changes in the biosynthesis and catabolism of the polyamines in isolated plastids during the chloroplast photodevelopment. *Journal of Photochem and Photobiol.* 33:163-170.
4. Andrews, J.R., Fryer, M.J., Baker, N. R. (1995). Characterization of chilling effects on photosynthetic performance of maize crops during early season growth using chlorophyll fluorescence. *Journal of Experim Bot.* 46(290): 1195-1203.
5. Argyroudi-Akoyunoglou, J.H., Thomou, H. (1981). Separation of the pigment-protein complexes of the thylakoid by SDS-sucrose density gradient centrifugation. *FEBS Lett.* 135, 177-181.
6. Baker, N.R. (1994). Chilling stress and photosynthesis. In: *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants.* (C. H. Foyer ed), pp127-154.
7. Baker, N.R., Long, S.P., Ort, D.R. (1988). Photosynthesis and temperature with particular reference to effects on quantum yield. In: Long SP, Woodward FI, eds. *Plants and temperature.* Cambridge: Company of Biologists, pp 347-375.
8. Baker, N.R., Nie, G-Y. (1994). Chilling sensitivity of photosynthesis in maize. In : Bajaj YPS, ed. *Biotechnology of Maize.* Berlin: Springer – Verlag, 465-481.
9. Barenji, B., Krause, G.H. (1985). Inhibition of photosynthesis by light. *Planta* 163:218-226.

10. Bergantino, E., Dainese, P., Cerovic, Z., Salvatore, S., Bassi, R. (1995). A post-translational modification of the Photosystem II subunit CP29 protects maize from cold stress. *The Journal of Biological Chemistry* 270, (15): 8474-8481.
11. Berry, J., Bjorkman, O. (1980). Photosynthetic response adaptation to temperature in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol.* 31:491-543.
12. Besford, R., Richardson, C. M., Campos, J. L. and Tiburcio, A.F. (1993). Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. *Planta* 189: 201-206.
13. Boese, S.R., Huner, N.P.A. (1990). Effect of growth temperature and temperature shifts on spinach leaf morphology and photosynthesis. *Plant Physiol.* 94:1830-1836.
14. Boothe, J.G. Sonnichsen, F.D., de Beus, M.D., Johnson-Flanagan, A.M. (1997). Purification, characterization, and structural analysis of a plant low-temperature-induced protein. *Plant Physiol.* 113:367-376.
15. Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tang, J. (1999). Polyamines and environmental challenges: Recent development. *Plant Sci.* 140:103-125.
16. Bowler, C., Van Montagu, M., Inze, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev of Plant Phys and Plant Mol Biol.* 43:83-116.
17. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the estimation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
18. Bredenkamp, G.J., Baker, N.R. (1994). Temperature-sensitivity of D1 protein metabolism in isolated *Zea mays* chloroplasts. *Plant, Cell and Environ.* 17:205-210.
19. Brouers, M., Michael-Wolwertz, M.R. (1983). Estimation of protochlorophyll(ide) contents in plant extracts, re-evaluation of the molar absorption coefficient of protochlorophyll(ide). *Photos. Res.* 4: 265-270.
20. Bruggeman, W., van der Kooij, T.A.W., van Hasselt, P.R. (1992b). Long-term chilling of young tomato plants under low light and subsequent recovery. Chlorophyll fluorescence, carboxylase/oxygenase. *Planta* 186:179-187.
21. Cattivelli, L., Bartels, D. (1990). Molecular cloning and characterization of cold-regulated genes in barley. *Plant Phys.* 108:795-803.

22. Cooper, P., Ort, D.R. (1988). Changes in protein synthesis induced in tomato by chilling. *Plant Phys.* 88:454-461.
23. Covello, P.S., Hayden, D.B., Baker, N.R. (1988). The roles of low temperature and light in accumulation of a kDa polypeptide in the light-harvesting apparatus of Maize leaves. *Plant Cell and Environ.* 11:481-486.
24. Demming-Adams, B., Adams, W.W. (1990). Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the carotenoid zeaxanthin. *Biochem Biophys. Acta* 1020, 1-24.
25. Dreyfuss, B.W., Thornber, J.P. (1994). Assembly of the Light – Harvesting Complexes of Photosystem II: Monomeric LHCIIb Complexes are intermediates in the formation of oligomeric LHCIIb Complexes. *Plant Physiol.* 106:829-839.
26. Drolet, G., Dumbroff, E. B., Legge, R.L., Thompson, J.E. (1986). Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochem.* 25:367-371.
27. Elis, R.J. (1981). Chloroplast proteins: synthesis, transport and assembly. *Ann Rev of Plant Physiol.* 32:111-137.
28. Erickson, J.M., Rochaix, J.D. (1992). The molecular biology of Photosystem II. In the *Photosystems: structure, function and molecular biology*. J. Barber (ed). Elsevier. Amsterdam. pp 101-177.
29. Faris, J.A. (1926). Cold chlorosis of sugar cane. *Phytopathology* 16:885-891.
30. Flores, H.E. (1990). Polyamines and plant stress. Alscher, JR Cumming, eds, *Stress Responses in Adaptation and Acclimation Mechanisms*. New York. pp 217-239.
31. Foyer, C.H., Descourvieres, P., Kunert, K.J. (1994). Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environ.* 17:507-523.
32. Frachebound, Y., Haldimann, P., Leipner, J., Stamp, P. (1999). Chlorophyll fluorescence as a selection tool for cold tolerance of photosynthesis in Maize (*Zea mays L.*). *Journal of Exper Bot.* 50 (338):1533-1540.
33. Fryer, M.J., Andrews, J.R., Oxborough, K., Blowers, D.A, Baker, N.R. (1998). Relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron

- transport, and active O₂ metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiol.* 116:571-580.
34. Fryer, M.J., Oxborough, K., Martin, B., Ort, D.R., Baker, N.R. (1995). Factors associated with Depressions of photosynthetic quantum efficiency in Maize at low growth temperature. *Plant Physiol.* 108: 61-767.
 35. Fururya, K., William, K.W.Li. (1992). Evaluation of photosynthetic capacity in phytoplankton by flow cytometer analysis of DCMU – enhanced chlorophyll fluorescence. *Marine Ecology Progress Series* 88:179-287.
 36. Galston, A. W., Kaun - Sawhney, R., Altabella, A. and Tiburcio, A. F. (1997). Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Botanica Acta.* 110: 197-207.
 37. Gemel, J., Golinowski, W., Kaniuga, Z. (1986). Low –temperature induced changes in chloroplast ultrastructure in relation to changes of Hill reaction activity, manganese and free fatty acid levels in chloroplasts of chilling-sensitive and chilling resistant plants. *Acta Physiol Plantar.* 8:135-143.
 38. Greer, D.H., Oquist, O and G. (1991). Photoinhibition and recovery of photosynthesis in intact barley leaves at 5^oC and 20^oC. *Phys Plant* 81: 203-210.
 39. Guseinova, J.M., Suleimanov, S.Y., Zulfugarov, I.S., Aliev. J.I. (2000). Assembly of the light – harvesting complexes during plastid development. *Journal of fluorescence* 10, (3):255-260.
 40. Guy, C.L, Haskell, D. (1987). Induction of freezing tolerance in Spinach is associated with the synthesis of cold acclimation induced proteins. *Plant Physiol.* 84:872-878.
 41. Guye, G.M., Vigh, L., Wilson, J.M. (1986). Polyamine titre in relation to chill-sensitivity in *Phaseolus sp.* *Journal of Exper Bot*, 37(180): 1036-1043.
 42. Guye, G.M., Wilson, J.M. (1987). The effects of chilling and chill-hardening temperatures on stomatal behaviour in a range of chill-sensitive species and cultivars. *Plant Physiol and Biochem.* 25:717-721.
 43. Hajela, R.K., Horvath, D.P., Gilmour, S.J., Thomashow, M.F. (1990). Molecular cloning and expression of cor (cold-regulated) genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 93:1246-1252.

44. Haldimann, P. (1996). Effects of changes in growth temperature on photosynthesis and carotenoid composition in *Zea mays* leaves. *Phys Plant*. 97:554-562.
45. Haldimann, P. (1997). Chilling-induced changes to carotenoid composition, photosynthesis and the maximum quantum yield of photosystem II photochemistry in two Maize genotypes differing in tolerance to low temperature. *Journal of Plant Physiol*. 151:610-619.
46. Haldimann, P. (1998). Low growth temperature-induced changes to pigment composition and photosynthesis in *Zea mays* genotypes differing in chilling sensitivity. *Plant, Cell and Environ*. 21:200-208.
47. Haldimann, P. (1999). How do changes in Temperature during growth affect leaf pigment composition and photosynthesis in *Zea mays* genotypes differing in sensitivity to low temperature. *Journal of Exper Bot*. 50, (333): 543-550.
48. Haldimann, P., Frachebound, Y., Stamp, P. (1995). Carotenoid composition in *Zea mays* developed at sub-optimal temperature and different light intensities. *Phys Plant*. 95:409-414.
49. Haldimann, P., Frachebound, Y., Stamp, P. (1996). Photosynthetic performance and resistance to photoinhibition of *Zea mays* L. leaves grown at sub-optimal temperature. *Plant, Cell and Environ*. 19:85-92.
50. Havaux, M., and Lannoye. (1984). Effects of chilling temperatures on prompt and delayed chlorophyll fluorescence in maize and barley leaves. *Photosynt*. 18:117-127.
51. Havaux, M. (1987). Effects of chilling on the redox state of the primary electron acceptor QA of photosystem II in chilling-sensitive and resistant plant species. *Plant Physiol and Biochem*. 25:735-743.
52. Hodgson, R.A.J., Raison, J.K. (1989). Inhibition of photosynthesis by chilling in moderate light: a comparison of plants sensitive and insensitive to chilling. *Planta* 178:545-552.
53. Holden, M. (1965). Chlorophylls. *Chemistry and Biochemistry of plant pigments*. Academic Press. London. In T.W. Goodwin (ed), pp. 461-488.
54. Honour, S.J., Webb, A.A.R., Mansfield, T.A. (1995). The response of stomata to abscisic acid and temperature are interrelated. *Proceedings of the Royal Society of London*, 250:301-306.

55. Horton, P., Ruban, A.V., Walters, R.G. (1996). Regulation of light – harvesting in green plants. *Annu Rev Plant Physiol Mol Bio.* 47: 665-684.
56. Huner, N.P.A, Krol, M., Williams, J. P., Maissan, E., Low, P.S., Roberts, D., Thompson, J.E. (1987). Low temperature development induces a specific decrease in trans- Δ^3 -Hexadecanoic acid content which influences LHCII organization. *Plant Physiol.* 84:12-18.
57. Huner, N.P.A, Oquist, G., Hurry, V.M., Krol, M., Falk, S., Griffith, M. (1993). Photosynthesis , photoinhibition and low temperature acclimation in cold tolerant plants. *Photosynt Res.* 37:19-39.
58. Hurry, V.M., Huner, N.P.A. (1991). Low growth temperature effects a differential inhibition of photosynthesis in spring and winter wheat. *Plant Physiol.* 96:491-497.
59. Janda, T., Szalai, G., Kissimon, J., Paldi, E., Marton, C., Szigeti, Z. (1994). Role of light intensity in the chilling injury of young maize plants studied by chlorophyll fluorescence induction measurements. *Photosynt.* 30: 293-299.
60. Jones, C., Hare, D., Compton, S. (1989). Measuring plant protein with Bradford assay. Evaluation and standard method. *Journal of Chem. Ecol.* 15 (3): 979-992.
61. Jun, S.S., Kim, Moon, B.Y., Lee, C.B. (1995). The effect of chilling treatment on photosynthesis and identification of its lesion sites in cucumber. P Mathis (ed), *Photosynthesis: from light to Biosphere IV*:845-848.
62. Kalosakas, K., Argyroudi – Akoyunoglou, J.H., Akoyunoglou, G. (1981). The formation of pigment – protein complexes in thylakoids of *Phaseolus* during chloroplast development. In G. Akoyunoglou (ed): *Photosynthesis, Balaban Iss. Philadeldhia.* V: 559-580.
63. Kimball, S.L., Salisbury, F.B. (1973). Ultrastructural changes of plants exposed to low temperatures. *American Journal of Bot.* 60:1028-1033.
64. Kotzabasis, K. and Senger, H. (1994). Free, conjugated and bound polyamines during the cell cycle in photosynthesized cultures of *Scenedesmus obliquus*. *Zeitchrift fur Naturforschung.* 49 (c): 181-185.
65. Kotzabasis, K., Christakis – Hampsas, M. and Roubelakis – Angelakis, K. A (1993). A narrow – bore HPLC method for the identification and

- quantification of free, conjugated and bound polyamines. *Analytical Biochem.* 214: 484-489.
66. Kotzabasis, K., Fotinou, C., Roubelakis – Angelakis, K. A. and Ghanotakis, D. (1993). Polyamines in the photosynthetic apparatus. Photosystem II highly resolved subcomplexes are enriched in spermine. *Photos Res.* 38: 83-88.
67. Kotzabasis, K., Strasser, B., Navakoudis, E., Senger, H., Dornemann, D., (1996). The regulatory role of polyamines on the structure and functioning of the photosynthetic apparatus during photoadaptation. *Journal of Photochem and Photob. (B)* 50:29-33.
68. Kotzabasis, K., Strasser, B., Navakoudis, E., Senger, H., Dornemann, D. (1999). The regulatory role of polyamines in structure and function of the photosynthetic apparatus during photoadaptation. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 50:45-52.
69. Kramer, F.G., Wang, C.Y. (1989). Correlation of reduced chilling injury with increased spermine and spermidine levels in Zucchini squash. *Plant Physiol.* 76:479-484.
70. Krause, G.H. (1988). Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol Plant.* 74:566-574.
71. Krause, G.H. (1994). Photoinhibition induced by low temperatures. In *Photoinhibition of photosynthesis, from Molecular mechanisms to the field.* BIOS Scientific Publishers. Oxford. N.R., Baker and J.R., Bowyer eds, 331-348.
72. Kruger, G., Tsimilli-Michael, M., Strasser, R.J. (1997). Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in *Camellia* leaves. *Physiol Plant.* 101:265-277.
73. Krupa, Z., Huner, N.P.A., Williams, J.P., Maissan, E., James, D.R. (1987). Development at cold-hardening temperatures. The structure and composition of purified rye light-harvesting complex II. *Plant Physiol.* 84: 19-24.
74. Kumer, A., Altabella, T., Taylor, M. A. and Tiburcio, A. F. (1997). Recent advances in polyamine research. *Trends in plant Sciences* 2:124-130.
75. Kurkela, S., Borg-Franck, M. (1990). Cloning and characterization of a cold- and ABA-inducible *Arabidopsis* gene. *Plant Mol Biol.* 157:105-132.

76. Kyle, D.J. (1987). The biochemical basis for photoinhibition of photosystem II. In: Photoinhibition, topics of photosynthesis. Kyle, D.J., Osmond, C.B., Elsevier. Amsterdam. Arntzen. C.J. eds, 9:197-266.
77. Laemmli LJK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
78. Lapointe, L., Huner, N.P.A., Carpentier, R., Ottander, C. (1991). Resistance to low temperature photoinhibition is not associated with isolated thylakoid membranes of winter rye. *Plant Physiol.* 97:804-810.
79. Lee, T.M. (1997). Polyamine regulation of growth and chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) roots cultured in vitro. *Plant Sci.* 122:111-117.
80. Leegood, R.C., Edwards, G.E. (1996). Carbon metabolism and photorespiration: temperature dependence in relation to other environmental factors.. *Photosynthesis and the environment*. Dordrecht: Kluwer Academic. In: Baker NR ed 191-221.
81. Leipner, J., Fracheboud, Y., Stamp, P. (1997). Acclimation by suboptimal growth temperature diminishes photooxidative damage in Maize leaves. *Plant, Cell and Environ.* 20: 366-372.
82. Long, S.P., East, T.M., Baker, N.R. (1983). Chilling damage to photosynthesis in young *Zea mays*. I. Effects of light and temperature variation on photosynthetic CO₂ assimilation. *Journal of Exper Bot.* 34:177-188.
83. Martino-Catt, S., Ort, D.R. (1992). Low temperature interrupts circadian regulation of transcriptional activity in chilling-sensitive plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.* 9:3731-3735.
84. McCormac, D.J., Bruce, D., Greenberg, B.M. (1994). State transitions, light harvesting antenna phosphorylation and light harvesting antenna migration in vivo in the higher plant *Spirodela oligorrhiza*. *Biochim Biophys Acta* 1187: 301-312.
85. Melis, A. (1991). Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochim Biophys Acta* 1058: 87-106.
86. Mezza-Basso, L., Alberdi, M., Raynal, M., Ferrero-Candinanos, M-I., Delseny, M. (1986). Changes in protein synthesis in rapeseed (*Brassica napus*) seedlings during a low temperature treatment. *Plant Physiol*, 82: 733-738.

87. Monroy, A. F., Castonguay, Y., Laberge, S., Sarhan, F., Vazina, L.P., Drindsa, R.S. (1993). A new cold-induced alfalfa gene is associated with enhance hardening at subzero temperatures. *Plant Physiol.* 102:873-879.
88. Moon, B.Y., Murata, N. (1995). Fast recovery of photosynthetic machinery from low-temperature photoinhibition in chilling-resistant plants. *Photosynthesis: from light to Biosphere.* P Mathis (ed), IV: 841-844.
89. Nadeau, P., Delaney, S., Chouinard, L. (1987). Effects of cold hardening on regulation of polyamine levels in wheat (*Triticum aestivum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 84:73-77.
90. Nie, G.Y., Baker, N.P. (1991). Modifications to thylakoid composition during development of Maize leaves at low growth temperatures. *Plant Physiol.* 95:184-191.
91. Nie, G.Y., Long, S.P., Baker, N.R. (1992). The effects of development at sub-optimal growth temperature photosynthetic capacity and susceptibility to chilling-dependent photoinhibition in *Zea mays*. *Phys Plant.* 85: 554-560.
92. Nie, G.Y., Robertson, E.J., Fryer, M.J., Leech, R.M., Baker, N.R. (1995). Response of the photosynthetic apparatus in maize leaves grown at low temperature on transfer to normal growth temperature. *Plant, cell and Environ.* 18:1-12.
93. O'Neil, Priestly, D.A., Chabot, B.F. (1981). Temperature and aging effects on leaf membranes of a cold hardy perennial, *Fragaria virginiana*. *Plant Physiol.* 68:1409-1415.
94. Oquist, G., Greer, D.H., Orger, E. (1987). Light stress at low temperature. in photoinhibition. Elsevier, Amsterdam. D. J. Kyle. C.B. Osmond and C.J. Arntzen, eds, 66-67.
95. Oquist, G., Huner, N.P.A. (1993). Cold – hardening – induce resistant to photoinhibition of photosynthesis in winter rye is dependent upon an increased capacity for photosynthesis. *Planta* 189:150-156.
96. Oquist, G., Huner, N.P.A. (1990). Effects of cold acclimation on the susceptibility of photosynthesis to photoinhibition. In *Current Research in Photosynthesis* Kluwer, Dordrecht. M. Baltscheffsky. ed, 11: 471-474.
97. Ortiz-Lopez, A., Nie, G-Y., Ort, D.R., Baker, N.R. (1990). The involvement of the photoinhibition of photosystem II and impaired membrane

- energization in the reduced quantum yield of carbon assimilation in chilled maize. *Planta* 181:78-84.
98. Ottander, C., Campbell, D., Oquist, G. (1995). Seasonal changes in photosystem II organization and pigment composition in *Pinus Sylvestris* . *Planta* 197: 176-183.
99. Powels, S.B. (1984). Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu Rev Plant Physiol.* 35:15-44.
100. Powels, S.B., Berry, J.A., Bjorkman, O. (1983). Interaction between light and chilling temperature on the inhibition of photosynthesis in chilling-sensitive plants. *Plant, Cell and Environ.* 6:117-123.
101. Roberts, D.R., Dumbroff, E.B., Thompson, J. E. (1986). Exogenous polyamines alter membrane fluidity –a basis for potential misinterpretation of their physiological role. *Planta* 167:395-401.
102. Robertson, E.J., Baker, N.R., Leech, R.M. (1993). Chloroplast thylakoid protein changes induced by low growth temperature in maize revealed by immunocytology. *Plant, Cell and Environ.* 16: 809-818.
103. Ruban, A.V., Young, A.Y., Horton, P. (1993). Induction of nonphotochemical energy dissipation and absorbance changes in leaves. Evidence for changes in the state of the light harvesting system of photosystem II in vivo. *Plant Physiol.* 102: 741-750.
104. Samuelsson, G., Lonneborg, A., Gustavsson, P., Oquist, G. (1987). The susceptibility of photosynthesis to photoinhibition and the capacity of recovery in high and low light grown cyanobacteria, *Anacystis nidulans*. *Plant Physiol.* 83:438-441.
105. Satoh, K., Fork, D.C. (1982). Photoinhibition of reaction centers of photosystems I and II in intact Bryopsis chloroplasts under anaerobic conditions. *Plant Physiol.* 70:1004.
106. Senger H., Brinkmann G. (1986). Protochlorophyllide accumulation and degradation in the dark and photoconversion to chlorophyll in the light in pigment mutant C-2A' of *Scenedesmus obliquus*. *Physiol. Plant.* 68:119-124.
107. Somersalo, S., Krause, G.H. (1989). Photoinhibition by chilling temperature. *Planta* 177: 409-416.

108. Srivastava, A., Greppin, H., Strasser, R.J. (1995). Acclimation of land plants to diurnal changes in temperature and light. *Photosynthesis: from light to Biosphere*. P Mathis (ed), IV: 909-912.
109. Stamp, P. (1987). Photosynthetic traits of maize genotypes at constant and fluctuating temperature. *Plant Phys and Biochem*. 25: 729-733.
110. Stamp, P., Thiraporn, R., Geisler, G. (1983). Adaptation to sub- and supraoptimal temperature of inbred maize lines differing in origin with regard to seedling development and photosynthetic traits. *Physiol Plant*. 58: 62-68.
111. Strasser, B.J., Srivastava, A., Govindjee. (1995). Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem Photobiol*. 61: 32-42.
112. Strasser, B.J., Strasser, R.J. (1995). Measuring fast Fluorescence transients to address environmental questions: The JIP test-: *Photosynthesis: from light to Biosphere*. In Mathis, P. (ed). V: 977-980.
113. Strasser, B.J., Strasser, R.J. (1998). Oscillation of the chlorophyll a fluorescence related to the S-state of the oxygen evolving complex. *Photosynthesis : Mechanisms and effects*. 5: 4325-4328.
114. Taylor, A.O., Craig, A.S. (1971). Plants under climatic stress. II. Low temperature, high light effects on chloroplast ultrastructure. *Plant Physiol*. 47: 713-718.
115. Taylor, A.O., Rowley, J.A. (1971). Plants under climatic stress. I. Low temperature, high light effects on photosynthesis. *Plant Physiol*. 47: 719-725.
116. Terashima, I., Funayama, S., Sonoike, K. (1994). The site of photoinhibition in leaves of *Cucumis sativus* L., at low temperature is photosystem I, not photosystem II. *Planta* 193:300-306.
117. Tsimilli-Michael M., Pecheux, M., Strasser, R.J. (1998). Vitality and stress adaptation of the symbionts of coral reef and temperate foraminifers probed in hospite by the fluorescence kinetics OJIP. *Archs Sci Geneve* 49: 173-203.
118. Walker, M.A., Mckersie, B.D., Pauls, P. (1991). Effects of chilling on the Biochemical and Functional Properties of Thylakoid Membranes. *Plant Physiol*. 97: 663-669.

119. Walters, R.G., Horton, P. (1994). Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: changes in composition of the photosynthetic apparatus. *Planta* 195:248-256.
120. Went, F.W. (1961). Temperature. In: W. Ruhland (ed), *Handbuch der Pflanzenphysiologie. Encyclopedia of Plant Physiology*. Berlin: Springer-Verlag, XVI: 1-23.
121. Wise, R.R. (1995). Chilling-enhanced photooxidation: the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light. *Photos Res.* 45:79-97.
122. Wise, R.R., William, J., Naylor, A.W. (1983). A comparative study of low-temperature-induced ultrastructural alterations of three species with differing chilling sensitivities. *Plant, Cell and Environ.* 6:525-535.
123. Yakir, D., Rudich, J., Bravdo, B-A. (1986). Adaptation to chilling: photosynthetic characteristics of the cultivated tomato and a high altitude wild species. *Plant, Cell and Environ.* 9:477-484.
124. Yamamoto, H.Y., Bassi, R. (1996). Carotenoids: localization and function. In *Oxygenic Photosynthesis: The light Reactions Advances in Photosynthesis 4*. Kluwer, Dordrecht. D. R. Ort and C. F. Yocum ed, 539-563.
125. Yun, J.G., Hayaashi, T., Yazawa, S., Katoh, T., Yasuda, Y. (1996). Acute morphological changes of palisade cells of *Saintpaulia* leaves induced by a rapid temperature drop. *Journal of Plant Res.* 109:339-342.