

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΦΩΤΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΤΗΣΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΣΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ

**ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΟΥ ΧΛΩΡΟΦΥΚΟΥΣ
Scenedesmus obliquus ΣΕ ΥΨΗΛΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ CO₂**

Υπό την επίβλεψη του Αναπλ. Καθηγητή Κ. Κοτζαμπάση

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΛΟΓΟΘΕΤΗΣ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2001

Στο τέλος αυτού του φθινοπώρου κλείνει ένας προσωπικός κύκλος που άνοιξε δύο χρόνια πριν, με την εισαγωγή μου στο ΠΜΣ ΜΒΒΦ του Τμήματος Βιολογίας. Λίγο πριν κλείσει, όμως, θα ήθελα να ευχαριστήσω:

- τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κυριάκο Κοτζαμπάση, ο οποίος καθόλη τη διάρκεια της εργασίας μου στο εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας παρακολούθησε από κοντά την πορεία της προσπάθειάς μου, μου έδωσε τις κατάλληλες συμβουλές, πίεσε όταν έπρεπε και πάνω απ' όλα μου παρείχε την απαραίτητη ηθική υποστήριξη κατά τις διάφορες ατυχίες εντός του εργαστηρίου

- την Καθηγήτρια κ. Μαρουδιώ Κεντούρη για την προθυμία με την οποία δέχτηκε να κρίνει την επιστημονική και την εν γένει αρτιότητα της παρούσας εργασίας

- την υποψήφια διδάκτορα Ελένη Ναβακούδη για τις συμβουλές της και τη βοήθειά της σε εργαστηριακής υφής θέματα

- το μεταδιδακτορικό ερευνητή Νικόλα Πριμηκύριο για τις πολύτιμες εμπειρίες και γνώσεις που μου μετέδωσε κατά τη διάρκεια της τετράμηνης συνεργασίας μας στον πρώτο χρόνο του προγράμματος

- τη μεταδιδακτορικό ερευνήτρια Αναστασία Παπαδάκη για τη βοήθειά της στην αντιμετώπιση της " κρίσης " με τα καπάκια

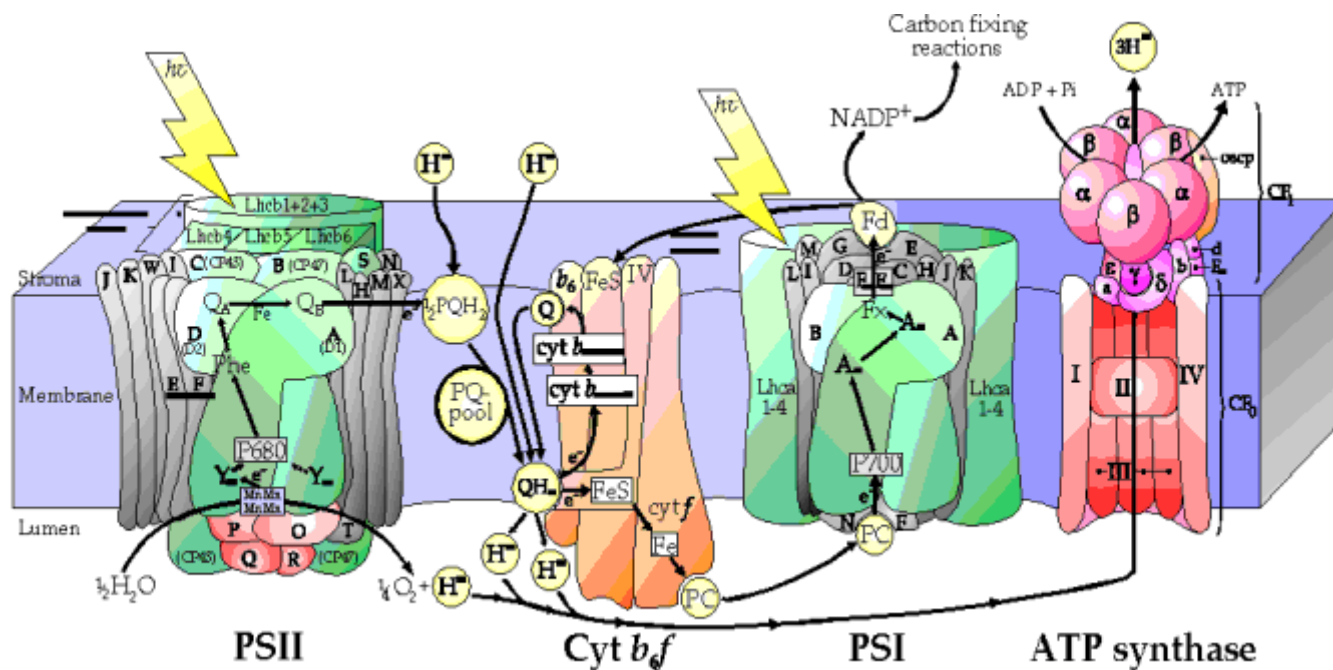
- τους Νίκο Ιωαννίδη, Liliانا Sfichi, Μαρία Σφακιανάκη, Γιάννη Ντελή, Μάνο Τραντά, Τάνια Γαζή και Κατερίνα Βρέντζου για την αρμονική συνύπαρξή μας και τη συνεργασία τους στα πλαίσια του εργαστηρίου. Ελπίζω και πιστεύω πως ήμουν το ίδιο συνεργάσιμος και εξυπηρετικός (όσο μπορούσα...)

- τον Στέλιο Γκίρη (συγκάτοικοι είμαστε όλοι στην τρέλλα) για τη βοήθειά του στο σχεδιασμό των εξωφύλλων και στη " high tech " υποστήριξή του στην εκτύπωση του κειμένου που ακολουθεί

Τα Λογοθετάκια είναι η οικογένειά μου...
(για όσους απορούν ακόμα...)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μονοκύτταροι και πολυκύτταροι ευκαρυωτικοί φωτοσυνθετικοί οργανισμοί είναι οι κυριότεροι πρωτογενείς παραγωγοί βιομάζας στη βιόσφαιρα. Την ιδιότητά τους αυτή οι εν λόγω οργανισμοί την οφείλουν στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, την οποία και φέρουν σε πέρας χάρη στο φωτοσυνθετικό τους μηχανισμό. Στα ευκαρυωτικά φύκη και στους πολυκύτταρους φυτικούς οργανισμούς ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός βρίσκεται στο χλωροπλάστη και αποτελείται από τέσσερα σύμπλοκα, τα οποία είναι συνδεδεμένα με την πλαστιδιακή μεμβράνη κατά τον τρόπο που δείχνει το σχήμα 1. Τα τέσσερα αυτά σύμπλοκα είναι τα φωτοσυστήματα I και II (PSI και PSII αντίστοιχα), το κυτοχρωμικό σύμπλοκο Cytb₆/f και η ATP – συνθάση.

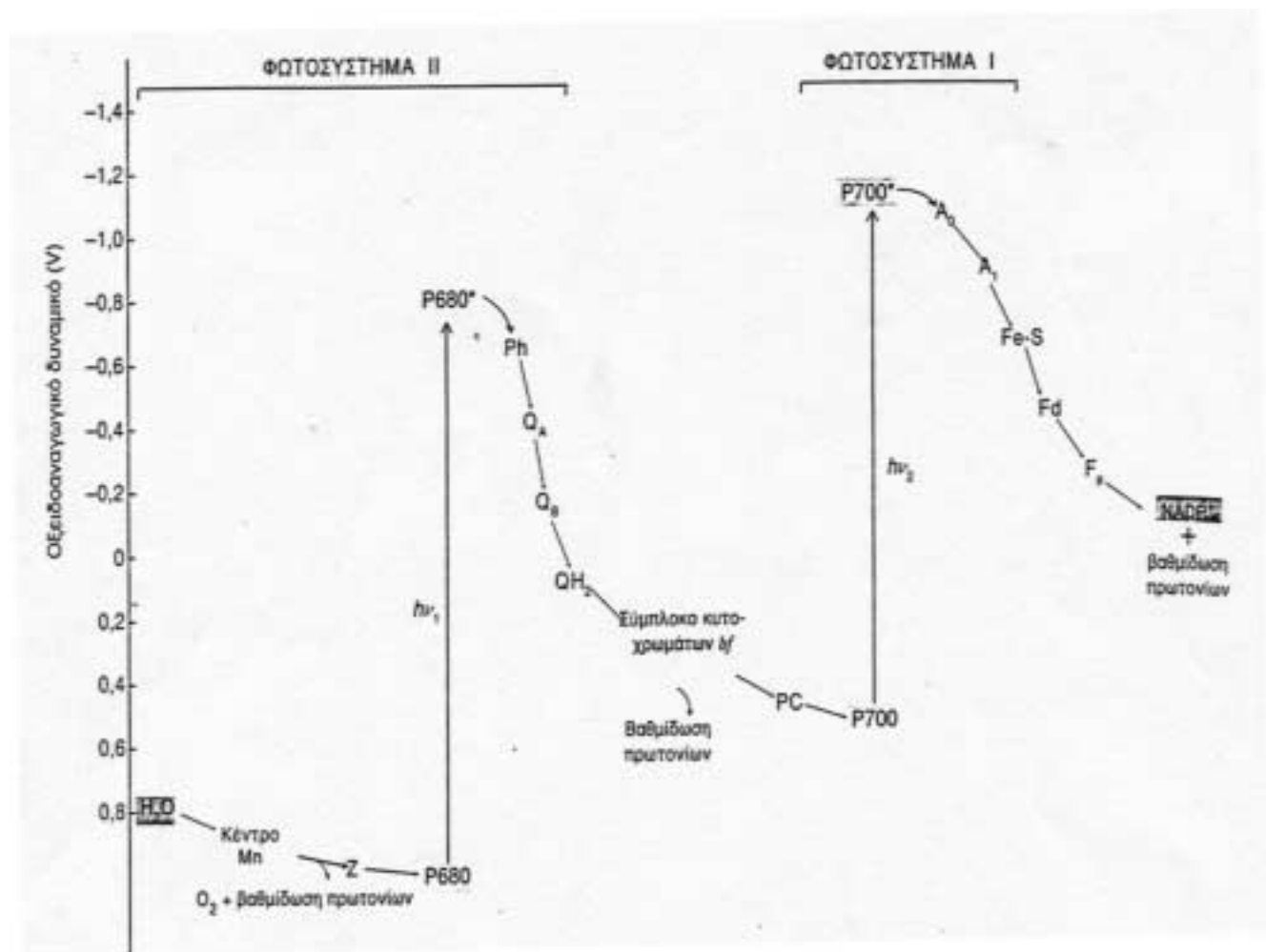


Σχήμα 1: Δομή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των μονοκύτταρων ευκαρυωτικών φυκών και των πολυκύτταρων φωτοσυνθετικών ευκαρυωτικών οργανισμών. Παρουσιάζονται τα τέσσερα σύμπλοκα που συμμετέχουν στη δομή του (από αριστερά προς τα δεξιά: φωτοσύστημα II, κυτοχρωμικό σύμπλοκο Cytb₆/f, φωτοσύστημα I και ATP – συνθάση. Με τις ενδείξεις Lhcb και Lhca, αντίστοιχα, διακρίνονται οι πρωτεΐνες των φωτοσυνθετικών κεραιών των φωτοσυστημάτων I και II). Στο σχήμα παρουσιάζεται και η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά μήκος του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, με τα μετακινούμενα ηλεκτρόνια να παριστάνονται με τη μορφή ανηγμένων ατόμων υδρογόνου (H⁺).

Από: Wolfson Laboratories, Imperial College, London 2001

(www.bc.ic.ac.uk/research/barber/photosystemII)

Κάθε φωτοσύστημα αποτελείται από τον πυρήνα του (Core Complex) και από τη φωτοσυλλεκτική του κεραία (Light Harvesting Complex). Στις φωτοσυλλεκτικές κεραίες των φωτοσυστημάτων I και II βασίζεται η ικανότητα των φωτοσυστημάτων να συλλέγουν την ηλιακή ακτινοβολία. Τα υπόλοιπα λειτουργικά στοιχεία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού βρίσκονται και αυτά τοποθετημένα στις φωτοσυνθετικές μεμβράνες των χλωροπλαστών, σχηματίζοντας μία διάταξη περισσότερο γνωστή ως " σχήμα Z ". Η συγκεκριμένη διάταξη παρουσιάζεται στο σχήμα 2.



Σχήμα 2: Σχηματική απεικόνιση του " σχήματος Z " του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και της πορείας των ηλεκτρονίων από τον αρχικό τους δότη (νερό) μέχρι και τον τελικό τους δέκτη (NADP^+). Συμβολισμοί: P680: φωτοσύστημα II, P680*: ενεργοποιημένο φωτοσύστημα II, P700: φωτοσύστημα I, P700*: ενεργοποιημένο φωτοσύστημα I, Z: παράγωγο του υδροδιασπόντος συμπλόκου, Ph: φαιοφυτίνη, Q_A και Q_B : πρωτεΐνες που δεσμεύουν πλαστοκινόνη, QH_2 : ανηγμένη πλαστοκινόνη, PC: πλαστοκυανίνη, A_0 και A_1 : δέκτες ηλεκτρονίων από την P700*, Fe-S: πρωτεΐνη σιδήρου - θείου, F_d : φερρεδοξίνη, F_p : φλαβοπρωτεΐνη.
 Από R. E. Blankenship and R. Prince. *Trends in Biochem. Science* 10(1985): 383.

Η ενέργεια που απορροφάται με τη μορφή φωτονίων από τις φωτοσυλλεκτικές κεραίες LHCI και LHCII διοχετεύεται στα κέντρα αντίδρασης του κάθε φωτοσυστήματος. Από εκεί κι έπειτα τα λειτουργικά στοιχεία του σχήματος Z είναι διαταγμένα έτσι, ώστε να σχηματίζουν μία αλυσίδα μεταφοράς 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 στη μορφή του ATP. Τα γεγονότα που περιλαμβάνει όλη αυτή η πορεία των ηλεκτρονίων χαρακτηρίζονται συνολικά ως φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης. Και αυτό γιατί για την πραγματοποίησή τους είναι απαραίτητη η διοχέτευση ηλιακής ενέργειας στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Στη συνέχεια, η αναγωγική ενέργεια, το ανηγμένο $\text{NADPH} + \text{H}$, και η ενέργεια των δεσμών, το ATP, που προέκυψαν από τις φωτεινές αντιδράσεις προωθούνται στην αλυσίδα των σκοτεινών αντιδράσεων. Εκεί η αναγωγική ενέργεια και το προσλαμβανόμενο από την ατμόσφαιρα CO_2 χρησιμοποιούνται για την παραγωγή μονοσακχαριτών (μορίων φωσφορικής φρουκτόζης).

Η φωτοσυλλεκτική κεραία του PSII (LHCII) είναι το χλωροφυλλοπρωτεϊνικό σύμπλοκο που απαντάται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων (Peter et al 1991a, Bassi et al 1997). Στη δομή της συμμετέχουν πέντε χλωροφυλλοπρωτεϊνικά υποσύμπλοκα καθένα από τα οποία φέρει διαφορετικό αποπρωτεϊνικό τμήμα. Τα πέντε αυτά υποσύμπλοκα είναι τα LHCII_a, LHCII_b, LHCII_c, LHCII_d και LHCII_e (Bassi et al 1990, Thornber et al 1991). Από αυτά το μεγαλύτερο σε συγκέντρωση στο εσωτερικό του κυττάρου είναι το LHCII_b, αφού το αποπρωτεϊνικό του τμήμα αντιστοιχεί στο 1 / 3 της συνολικής περιεκτικότητας του φυτικού κυττάρου σε πρωτεΐνες, ενώ οι συνδεδεμένες με αυτό χλωροφύλλες αντιστοιχούν στο 42% της συνολικής ποσότητας χλωροφυλλών του φυτικού κυττάρου (Thornber et al 1991). Κάθε χλωροφυλλοπρωτεϊνικό υποσύμπλοκο του LHCII είναι ουσιαστικά ένα τριμερές που προκύπτει από τη συνένωση τριών διαφορετικών πρωτεϊνικών μονομερών (Dreyfuss et al 1994, Kalosakas et al 1981). Η τριμερής δομή είναι η μέχρι στιγμής πιο λειτουργική μορφή με την οποία εμφανίζεται το LHCII στα ώριμα φυτά (Guseinova et al 2000). Με τις αποπρωτεΐνες του LHCII είναι συνδεδεμένα και μόρια άλλων

ενδοκυτταρικών ουσιών. Σε μεγαλύτερο ποσοστό απο κάθε άλλη ενδοκυτταρική ουσία οι αποπρωτεΐνες του LHCII φέρουν συνδεδεμένα μόρια α και β χλωροφυλλών. Οι χλωροφύλλες α και β είναι υπεύθυνες για την απορρόφηση της ηλιακής ενέργειας αλλά και τη σταθεροποίηση του αποπρωτεϊνικού συμπλόκου (Paulsen et al 1993, Kühlbrandt et al 1994) και τη μέχρι ενός σημείου προστασία του από ενδοπλαστιδιακές πρωτεάσες (Harisson et al 1992, Kuttkat et al 1995). Συνδεδεμένες με τις αποπρωτεΐνες του LHCII είναι επίσης οι ξανθοφύλλες λουτεΐνη, βιολαξανθίνη και νεοξανθίνη (Plumley et al 1987, Kühlbrandt et al 1991) οι οποίες δρουν συμπληρωματικά στη φωτοσυλλογή και προστατεύουν το φωτοσυνθετικό μηχανισμό από οξειδωτικές καταπονήσεις (Demmig-Adams 1992) καθώς και τα λιπίδια μονογαλακτόσυλο - διακυλογλυκερόλη (MGDG), διγαλακτόσυλο - διακυλογλυκερόλη (DGDG), φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG) (Simidjiev et al 1998) και trans - εξαδεκανοϊκό οξύ (Remy et al 1984), τα οποία συντελούν στη σταθεροποίηση και την ένθεση του συμπλόκου στην πλαστιδιακή μεμβράνη (Nussberger et al 1993, Hobe et al 1995, Simidjiev et al 1998). Πρόσφατες μελέτες (Kotzabasis et al 1993b, Besford et al 1993) έχουν αποδείξει πως με το LHCII είναι συνδεδεμένη και μία άλλη ομάδα μορίων, οι πολυαμίνες. Από την τελευταία κατηγορία ενώσεων η διαμίνη πουτρεσκίνη (Put), η τριαμίνη σπερμιδίνη (Spd) και η τετραμίνη σπερμίνη (Spm) είναι αυτές που αλληλεπιδρούν με το LHC II (Kotzabasis et al 1993b, Kotzabasis et al 1994, Kotzabasis et al 1996).

Στο σύνολό του ως λειτουργική διάταξη ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός χαρακτηρίζεται από την ικανότητά του να προσαρμόζεται σε διάφορες αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της φωτοπροσαρμογής (Bjorkman 1972, Senger et al 1978), παρέχοντας την ικανότητα στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς να επιδιώκουν σε κάθε περίπτωση τη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση.

Μία από τις σημαντικότερες περιβαλλοντικές αλλαγές που επιδρά ιδιαίτερα έντονα πάνω στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό είναι η αύξηση του διαθέσιμου στην ατμόσφαιρα CO₂. Τα επίπεδα συγκέντρωσης του CO₂ στην ατμόσφαιρα έχουν αυξηθεί τα τελευταία 150 χρόνια, από 270 μmol.mol⁻¹ αέρα, που ήταν πριν από τη βιομηχανική επανάσταση, σε 354 μmol.mol⁻¹ αέρα,

ενώ αναμένεται να διπλασιαστούν μέχρι το 2100 (McElroy et al 1994), εντείνοντας ακόμα περισσότερο το φαινόμενο του θερμοκηπίου.

Η αύξηση της ατμοσφαιρικής συγκέντρωσης του CO₂ προκαλεί διάφορες αποκρίσεις από πλευράς φυτών, όπως τη μείωση της πυκνότητας των στομάτων, τη μείωση της φωτοαναπνοής, την αύξηση του λόγου C/N, και τη μείωση της αναπνευστικής δραστηριότητας (Bowes 1996). Ο κυριότερος αντίκτυπος της αύξησης του CO₂ , όμως, στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων εντοπίζεται στα επίπεδα της ποσότητας και της ενζυμικής δραστηριότητας της καρβοξυλάσης – οξυγενάσης της 1,5 διφωσφορικής ριβουλόζης (RubisCO) (Stitt 1991, Van Oosten et al 1994, Nie et al 1995). Αναλυτικότερα, κατά τις πρώτες ώρες της έκθεσης των φυτών σε υψηλές ατμοσφαιρικές συγκεντρώσεις CO₂ (φάση πρώιμης προσαρμογής) υπερισχύει η δράση καρβοξυλάσης της RubisCO (Stitt 1991), γεγονός που συνοδεύεται από μία αξιοσημείωτη αύξηση στο φωτοσυνθετικό ρυθμό των φυτών (Nie et al 1995, Medlyn et al 1999, Stitt et al 1999), στην παραγωγή υδατανθράκων (Stitt et al 1999) και στην τελική αύξηση της βιομάζας (Kimball et al 1983, Bowes 1996). Ωστόσο, όταν η έκθεση των φυτών σε υψηλές ατμοσφαιρικές συγκεντρώσεις CO₂ παραταθεί (φάση εγκλιματισμού), η κατάσταση αρχίζει να αντιστρέφεται (Bowes 1996). Συγκεκριμένα, με τη συμπλήρωση ημερών (Nie et al 1992) ή εβδομάδων (Kramer 1981, Medlyn et al 1999) έκθεσης σε υψηλά επίπεδα CO₂ ο φωτοσυνθετικός ρυθμός μειώνεται (Sage 1994, Makino et al 1997), οι παραγόμενοι υδατάνθρακες δεν αξιοποιούνται από τα κύτταρα, αλλά συσσωρεύονται σε αυτά με τη μορφή αμυλόκοκκων (Sasek et al 1985), ενώ και τα επίπεδα της RubisCO μειώνονται δραματικά (Besford 1990, Van Oosten et al 1992, Moore et al 1998). Την τύχη της RubisCO ακολουθούν και άλλες πρωτεΐνες των θυλακοειδών των φυτικών κυττάρων, όπως οι πρωτεΐνες D1 και D2 του πυρήνα του PS II και τα κυτοχρωμικά σύμπλοκα Cyt f και Cyt b₆f της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Wilkins et al 1994). Στην τομάτα βρέθηκε πως ταυτόχρονα με τη μείωση στην ποσότητα της πρωτεΐνης RubisCO παρατηρείται και ανάλογη μείωση στον αριθμό των μεταγράφων του γονιδίου *rbcS*, το οποίο φέρει την πληροφορία για τη μικρή υπομονάδα της RubisCO (Van Oosten et al 1995). Την ίδια τύχη, όμως, είχαν και τα μέταλλα δύο γονιδίων που κωδικοποιούσαν για πρωτεΐνες της

φωτοσυλλεκτικής κεραίας αλλά και το γονίδιο του ενεργοποιητή της RubisCO (RubisCO activase) (Van Oosten et al 1994, Van Oosten et al 1995).

Υπό το πρίσμα των πρόσφατων μεγάλων αυξήσεων στις ατμοσφαιρικές συγκεντρώσεις του CO₂, η ιδιότητα αρκετών φυτικών ειδών να αυξάνουν τη φωτοσυνθετική τους απόδοση για ένα αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα έκθεσής τους σε υψηλό CO₂ (Kimball 1983) απέκτησε τεράστιο ενδιαφέρον. Μάλιστα, κάποια φυτά δεν καταπονούνται από τις υψηλές περιβαλλοντικές θερμοκρασίες (Taub 2000), αλλά κατορθώνουν να τις συνδυάζουν με το υψηλό CO₂, προς αύξηση της φωτοσυνθετικής τους απόδοσης (Bowes 1993, Huxman et al 1998, Vu et al 2001). Η ιδιότητά τους αυτή τους προσδίδει ιδιαίτερη αξία και τα φέρνει στο προσκήνιο της έρευνας της σχετικής με το φαινόμενο του θερμοκηπίου και τις συνέπειές του στη χλωρίδα της βιόσφαιρας.

Παρόμοιες αποκρίσεις απέναντι σε υψηλές συγκεντρώσεις CO₂ εμφανίζουν και τα μονοκύτταρα ευκαρυωτικά φύκη (Muller et al 1993), η σπουδαιότερη ίσως ομάδα πρωτογενών παραγωγών των υδάτινων οικοσυστημάτων (Raymont 1980). Σε πολλές περιπτώσεις η δομή και η οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των εν λόγω μικροοργανισμών δε διαφέρουν από τις αντίστοιχες των πολυκύτταρων φυτικών οργανισμών (Plumley et al 1984, Browns 1988, Plumley et al 1993). Ωστόσο, προς το παρόν λίγα έχουν γίνει γνωστά (Muller et al 1993) για τις αποκρίσεις του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των μικροφυκών οι οποίες συνοδεύουν τις παρατηρούμενες κατά την έκθεση σε υψηλό CO₂ αυξήσεις της βιομάζας.

Στόχος της παρούσας έρευνας είναι η εκτενέστερη μελέτη της πρώιμης απόκρισης σε υψηλές συγκεντρώσεις CO₂ του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μονοκύτταρου ευκαρυωτικού φύκου *Scenedesmus obliquus* και η αναζήτηση οδών για την παράτασή της, με σκοπό τη μεγέθυνση των θετικών επιδράσεων της αυξημένης συγκέντρωσης του CO₂ στην αύξηση της βιομάζας.

Οργανισμός και συνθήκες καλλιέργειας:

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο άγριος τύπος του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* [*Scenedesmus* (*Acutoscedesmus*) *obliquus*] (Gaffron 1939). Πρόκειται για μονοκύτταρο ευκαρυωτικό μικροοργανισμό με διάμετρο περίπου 2 μm. Ο κύκλος ζωής του διαρκεί γύρω στις 20 ώρες. Ο άγριος τύπος είναι ικανός να βιοσυνθέτει χλωροφύλλη στο σκοτάδι, όπως ακριβώς και στο φως (Kasemir 1983). Δηλαδή, ακόμα και στο σκοτάδι έχει διαμορφωμένους χλωροπλάστες και ενεργά φωτοσυστήματα I και II με την προϋπόθεση ότι στο θρεπτικό μέσο του κυττάρου υπάρχει κάποια πηγή οργανικού άνθρακα. Η ανάπτυξη αυτότροφων καλλιεργειών έγινε σε ειδικούς σωλήνες της εταιρίας *Schott* διαμέτρου 4cm. Οι σωλήνες περιείχαν 200 ml από το υγρό θρεπτικό μέσο η σύσταση του οποίου παρουσιάζεται στον πίνακα 2 (Bishop and Senger, 1971). Η όλη διάταξη τοποθετήθηκε σε ενυδρείο με ελεγχόμενη θερμοκρασία (28 °C) και απέναντι από ρυθμιζόμενη πηγή φωτισμού (δέκα λάμπες φθορισμού *L – 40 W, Osram, Muenchen, FRG*). Η ένταση της προσπίπτουσας σε κάθε καλλιέργεια PAR ακτινοβολίας (Photosynthetically Actine Radiation) που χρησιμοποιήθηκε ήταν 180 μmol. m⁻². s⁻¹. Ο αερισμός και η ανάδευση των καλλιεργειών έγιναν με αντλίες αέρα (*Optima, Rolf C. Hagen, UK*). Στις καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες χορηγήθηκε φιλτραρισμένος αέρας περιεκτικότητας 0,03% σε CO₂. Στις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις CO₂ χορηγήθηκε μίγμα αέρα εμπλουτισμένο με CO₂. Η ποσοστιαία κατ' όγκον σύσταση του μίγματος παρουσιάζεται στον πίνακα 1. Η εκκίνηση νέων καλλιεργειών έγινε με τη μεταφορά ποσότητας από παλιά καλλιέργεια (τριών ημερών) σε φρέσκο θρεπτικό μέσο.

Πίνακας 1: Κατ' όγκον σύσταση του αερίου μίγματος που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των αυτότροφων καλλιεργειών σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης CO₂. Τα στοιχεία αναφέρονται σε ποσοστά %.

Αζωτο (N ₂)	72%
Οξυγόνο (O ₂)	18%
Διοξείδιο του άνθρακα (CO ₂)	10%

Πίνακας 2: Σύσταση του υγρού θρεπτικού μέσου που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των καλλιεργειών.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (σε g/l)	ΜΟΡΙΑΚΟΤΗΤΑ (M)
CaCl ₂ x 2H ₂ O	1.50	1x10 ⁻⁴
KNO ₃	80.0	8x10 ⁻³
MgSO ₄ x7H ₂ O	24.6	1x10 ⁻³
NaCl	47.0	8x10 ⁻³
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	17.8	1x10 ⁻³
NaH ₂ PO ₄ x1H ₂ O	40.5	3x10 ⁻³
Na-Citrate x2H ₂ O	16.5	5.5x10 ⁻⁴
Fe ₂ (SO ₄) ₃ x1H ₂ O	0.40	7.5x10 ⁻⁶
<u>Microelements</u>		
H ₃ BO ₃	2.86	
MnCl ₂ x4H ₂ O	1.81	
ZnSO ₄ x7H ₂ O	0.222	
CuSO ₄ x5H ₂ O	0.079	
MoO ₃ (85%-99.5%)	0.0177	
C ₆ H ₅ FeO ₇ x5H ₂ O	18.025	

Απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών:

Για την απομόνωση των θυλακοειδών μεμβρανών από τα κύτταρα του *Scenedesmus obliquus* εφαρμόστηκε η ακόλουθη διαδικασία: Από 1 lt υγρής καλλιέργειας *Scenedesmus obliquus* ελήφθη με φυγοκέντρηση για 7 min στις 1500 g η κυτταρική μάζα με τη μορφή ιζήματος (πελέτας). Εν συνεχεία, τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων με τελικές συγκεντρώσεις 0,06 M για το Na₂HPO₄ και 0,015 M για το NaH₂PO₄ και pH 7,5. Ακολούθησε θραύση των κυττάρων. Η θραύση των κυττάρων έγινε μηχανικά με τη χρήση γυάλινων σφαιριδίων διαμέτρου 0,7 mm και εφαρμογή του συστήματος bead – beater μέσα σε ομογενοποιητή και σε θερμοκρασία 4°C. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές για κάθε δείγμα. Η διάρκεια της κάθε επανάληψης ήταν 1 min, ενώ ανάμεσα σε δύο διαδοχικές επαναλήψεις μεσολάβησε διάστημα 5 min. Με τη χρήση γυάλινου φίλτρου μικρών πόρων απομακρύνθηκαν τα σφαιρίδια και ελήφθη το διάλυμα με τα σπασμένα κύτταρα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 30.000 g σε κεφαλή εκτρεπόμενων κάδων (swing out rotor, type HB – 4, Sorvall) και σε θερμοκρασία 4°C για 45 min. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, ενώ η πελέτα παρουσίαζε τις εξής χαρακτηριστικές ζώνες: την ανώτερη η οποία περιείχε τα θυλακοειδή των κυττάρων, τη μεσαία η οποία περιείχε μόρια αμύλου και την κατώτερη η οποία

αντιστοιχούσε σε κύτταρα που δεν είχαν σπάσει κατά την εφαρμογή της μηχανικής πίεσης. Το περιεχόμενο της ζώνης των θυλακοειδών συλλέχθηκε με ειδικό πινέλο. Κατόπιν, τα θυλακοειδή επαναδιαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα Tricine 2 mM με pH 7,3 και θερμοκρασία 4°C. Η αποθήκευσή τους, όταν χρειάστηκε, έγινε στους - 80°C.

Απομόνωση και διαχωρισμός των μονομερών και ολιγομερών μορφών των φωτοσυλλεκτικών κεραιών:

Απομονωμένα θυλακοειδή επαναδιαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα Tricine 2mM με pH 7,3 και ακολούθησε φωτομετρική εκτίμηση της συγκέντρωσης των χλωροφυλλών σε κάθε δείγμα με τη μέθοδο της Holden (1965). Μετά τη φωτομέτρηση ακολούθησε επώαση των επαναδιαλυμένων θυλακοειδών στον πάγο για περίπου 30 min. Εν συνεχεία, στο διάλυμα των θυλακοειδών προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος διαλυτοποίησης, η σύσταση του οποίου παρουσιάζεται στον πίνακα 3. Τα αραιωμένα δείγματα τοποθετήθηκαν σε συνεχή διαβάθμιση σακχαρόζης (από 5% έως και 22%) και ακολούθησε η υπερφυγοκέντρωση των αραιωμένων δειγμάτων μέσα σε κεφαλή εκτρεπόμενων κάδων (swing out rotor, type SW 40 Ti, Beckman) στις 170.000 g και σε θερμοκρασία 4°C για 17 h. Μετά το πέρας της υπερφυγοκέντρωσης οι ζώνες με τα μονομερή και τα ολιγομερή του LHClI απομονώθηκαν με τη χρήση περισταλτικής αντλίας (econo pump, Bio – rad). Από κάθε ζώνη ελήφθησαν δείγματα και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις πρωτεϊνών, με σκοπό την εκτίμηση της συνολικής ποσότητας πρωτεϊνών σε κάθε ζώνη.

Πίνακας 3: Σύσταση του διαλύματος διαλυτοποίησης

Συστατικό	Συγκέντρωση στο τελικό διάλυμα
Tris	0,3 M
SDS	1 %
Γλυκερόλη	10 %

Η συνεχής διαβάθμιση σακχαρόζης που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των μονομερών και τριμερών μορφών του LHClI παρασκευάστηκε με τη χρήση περισταλτικής αντλίας (econo pump, Bio – rad). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο διαλύματα σακχαρόζης με κατ' όγκο περιεκτικότητα 5% και 22%. Συνεπώς, με τη χρήση της περισταλτικής αντλίας προέκυψαν συνεχείς διαβαθμίσεις με περιεκτικότητα

σακχαρόζης κυμαινόμενη μεταξύ 5% (ανώτερο σημείο της βαθμίδωσης) και 22% (κατώτερο σημείο της βαθμίδωσης). Μετά την παρασκευή τους οι συνεχείς διαβαθμίσεις της σακχαρόζης διατηρήθηκαν για όχι μεγαλύτερο από 30 min χρονικό διάστημα στους 4°C. Στους πίνακες 4, 5 και 6 παρατίθενται οι συνθέσεις των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των συνεχών διαβαθμίσεων σακχαρόζης.

Πίνακας 4: Σύσταση του διαλύματος περιεκτικότητας 5% κατ' όγκο σε σακχαρόζη

Συστατικό	Τελική ποσότητα στο διάλυμα 5%
Δεοξυχολικό οξύ	0, 2gr
Triton x 100	0, 2 ml
Σακχαρόζη	5 gr
Διάλυμα διαβαθμίσεων (pH 9,5)	100 ml

Πίνακας 5: Σύσταση του διαλύματος περιεκτικότητας 22% κατ' όγκο σε σακχαρόζη

Συστατικό	Τελική ποσότητα στο διάλυμα 22%
Δεοξυχολικό οξύ	0, 2gr
Triton x 100	0, 2 ml
Σακχαρόζη	22 gr
Διάλυμα διαβαθμίσεων (pH 9,5)	100 ml

Πίνακας 6: Σύσταση του διαλύματος διαβαθμίσεων (pH 9,5*)

Συστατικό	Συγκέντρωση στο διάλυμα διαβάθμισης
Tris	0, 05 M
Βορικό οξύ	0, 06 M
SDS	0,01%

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

Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού:

Η ηλιακή ενέργεια που απορροφάται από τη φωτοσυλλεκτική κεραία του PS II δεν αξιοποιείται πάντα μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης. Έτσι, είναι δυνατό τμήμα της να εκπέμπεται από το PS II ως φθορισμός ή να διαχέεται ως θερμότητα. Το μεγαλύτερο ποσοστό του φθορισμού προέρχεται από τα μόρια χλωροφύλλης a του φωτοσυστήματος II (Furuya et al 1992). Ωστόσο, τα χαρακτηριστικά του εκπεμπόμενου από τις χρωστικές φθορισμού εξαρτώνται και από άλλους παράγοντες. Αυτοί είναι η μεταφορά της απορροφώμενης ενέργειας κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού καθώς και η οξειδοαναγωγική κατάσταση των κέντρων αντίδρασης αλλά και των δοτών και δεκτών ηλεκτρονίων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Η επαγωγή του φθορισμού από τα φυτά παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τον Kautsky το 1931 (Kautsky et al 1931). Το όλο φαινόμενο

πραγματοποιείται σε δύο φάσεις, εκ των οποίων η πρώτη είναι ταχεία και η δεύτερη αργή. Στο σχήμα 3 παρουσιάζεται η αντιστοιχία των σταδίων επαγωγής φθορισμού από τα φυτά με τα διάφορα στάδια της μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Σήμερα, η μελέτη της καμπύλης του επαγωγικού φθορισμού – και ιδιαίτερα της ταχείας φάσης του – έχει εξελιχθεί σε πολύτιμο ερευνητικό μέσο για τη μελέτη της δραστηριότητας αλλά και της απόδοσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Lichtenhaler 1992, Bulhar – Nordenkampf et al 1993, Lazar 1999).

Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού έγιναν με τη συσκευή PEA (Plant Efficiency Analyser) της Hansatech Instruments. Η ποσότητα του δείγματος που ελήφθη από κάθε καλλιέργεια προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις ήταν 1 ml. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο JIP TEST των *Strasser* και *Strasser* (1995). Τα μεγέθη του επαγωγικού φθορισμού που μελετήθηκαν σε κάθε μέτρηση ήταν τα εξής:

(α) Μέγιστη φωτοχημική απόδοση (Φ_{po}): Η τιμή του συγκεκριμένου μεγέθους συνδέεται ανάλογα με το ποσοστό της δεσμευόμενης ηλιακής ενέργειας που το φυτικό κύτταρο εκμεταλλεύεται μέσω της φωτοχημικής οδού, δηλαδή συνδέεται ανάλογα με τη φωτοσυνθετική απόδοση του φυτικού κυττάρου. Η Φ_{po} μπορεί να πάρει οποιαδήποτε τιμή ανάμεσα στο 0,0 και το 1,0. Για τους φυτικούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ωστόσο, η Φ_{po} κυμαίνεται από 0,6 μέχρι περίπου 0,8. Όταν ένας φυτικός ευκαρυωτικός οργανισμός παρουσιάζει φωτοχημική απόδοση μικρότερη του 0,6, τότε είναι πολύ πιθανό να βρίσκεται εκτεθειμένος σε κάποιο είδος καταπόνησης. Γενικώς, πάντως, χαμηλές τιμές του μεγέθους Φ_{po} συνδέονται με την απώλεια μεγάλου ποσού από την προσλαμβανόμενη ηλιακή ενέργεια διαμέσου μη φωτοχημικών διαδικασιών, δηλαδή μέσω διάχυσης με τη μορφή θερμότητας και μέσω φθορισμού.

(β) Απορρόφηση ηλιακής ενέργειας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (ABS/RC): Η τιμή του συγκεκριμένου μεγέθους συνδέεται ανάλογα με το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (LHCI) του φυτικού κυττάρου. Κατά συνέπεια, αποτελεί έναν πρακτικότερο και πολύτιμο δείκτη για την εκτίμηση των μεταβολών και των διαφορών στο μέγεθος του LHC ανάμεσα σε διαφορετικές καλλιέργειες.

(γ) Διάχυση ενέργειας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (DI_o/RC): Πρόκειται για το τμήμα της απορροφώμενης ενέργειας που χάνεται από κάθε κέντρο αντίδρασης, παραμένοντας έτσι ανεκμετάλλευτο από το φωτοσυνθετικό μηχανισμό.

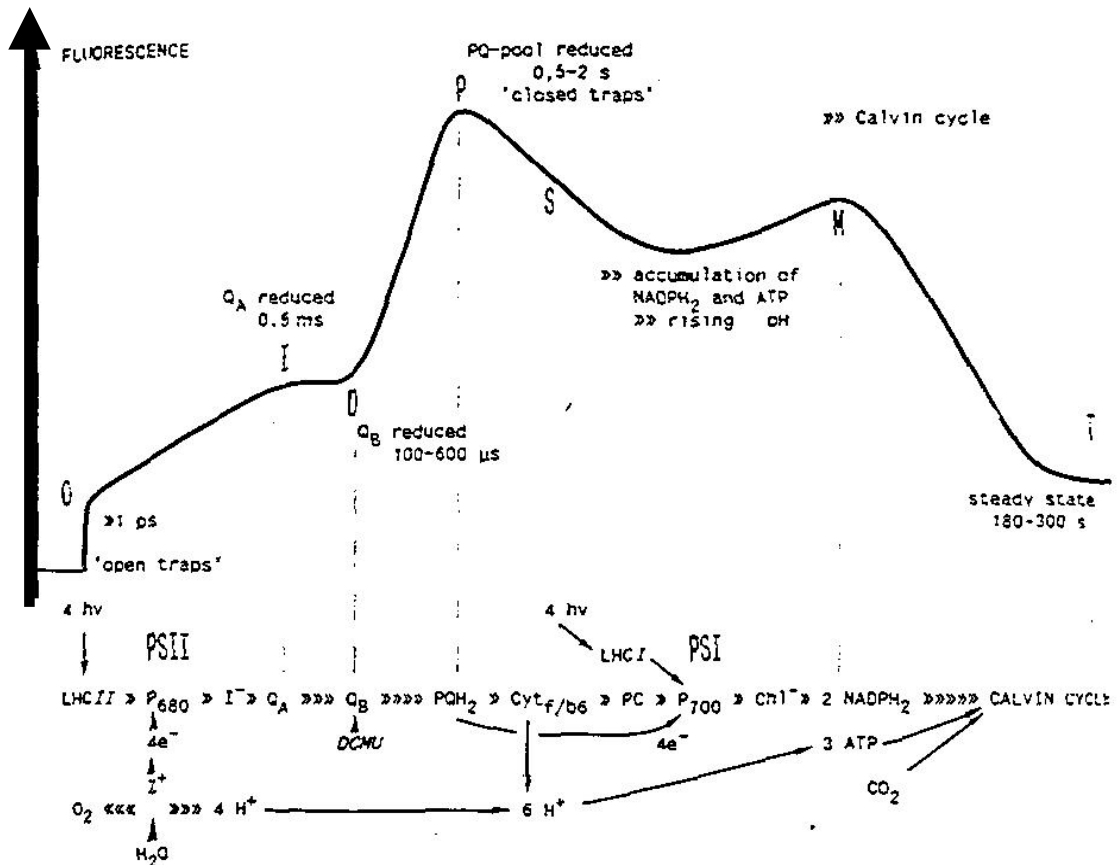
(δ) Παγίδευση ενέργειας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (TR_o/RC): Πρόκειται για το ρυθμό με τον οποίο ηλεκτρόνια παγιδεύονται από τα κέντρα αντίδρασης του φυτικού κυττάρου, προκαλώντας την αναγωγή της κινόνης A στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων.

(ε) Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης (D_o): Το συγκεκριμένο μέγεθος αποτελεί δείκτη για τον αριθμό των ενεργών κέντρων αντίδρασης που είναι ικανά σε δεδομένη χρονική στιγμή να δεχτούν ηλεκτρονικό φορτίο και να το προωθήσουν επιτυχώς κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Οι εξισώσεις που περιγράφουν τα ανωτέρω μεγέθη παρατίθενται, όπως περιγράφηκαν από τους *Strasser* και *Strasser* (1995), στον πίνακα 7.

Πίνακας 7: Σχέσεις υπολογισμού των παραμέτρων του επαγωγικού φθορισμού.

$(α) \Phi_{po} = (1 - F_o)/F_m = F_v / F_m$ $(β) ABS/RC = M_o \cdot (1/V_J) \cdot (1/ \Phi_{po})$ $(γ) DI_o/RC = (ABS/RC - TR_o/RC)$ $(δ) TR_o/RC = M_o \cdot (1/V_J)$ $(ε) D_o = \Phi_{po} \cdot (V_J/M_o) \cdot F_o$
<p>όπου F_o: ένταση του επαγωγικού φθορισμού στα 50μs από την επαγωγή του F_m: μέγιστη τιμή της έντασης του επαγωγικού φθορισμού $M_o = 4 \cdot (F_{300} - F_o) / (F_m - F_o)$ $V_J = (F_{2ms} - F_o) / (F_m - F_o)$</p>



Σχήμα 3: Συσχέτιση των σταδίων της επαγωγής φθορισμού από τα φυτά με τα στάδια μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά τη φωτοσύνθεση. Στο σχήμα φαίνεται, επίσης, το τμήμα της αλυσίδας ηλεκτρονίων στο οποίο επιδρά, ο αναστολέας DCMU. Συμβολισμοί:

O, I, D, P, S, M, T: τα διαδοχικά επίπεδα κατά την επαγωγή φθορισμού στα φυτικά κύτταρα.

hν: φωτόνιο

P_{680} και P_{700} : τα κέντρα αντίδρασης των PS II και PS I, αντίστοιχα

Z^+ : ενδιάμεσος μεταφορέας ηλεκτρονίων από το υδροδιασπών σύμπλοκο στο PS II

I : φαιοφυτίνη α

Q_A : κινόνη α

Q_B : κινόνη β

PQH_2 : ανηγμένη πλαστοκινόνη

$Cyt_{f/b6}$: κυτοχρωμικό σύμπλοκο f/b₆

PC : πλαστοκυανίνη

DCMU: 3 - (3,4 διχλωροφαινυλ -) - 1,1 διμεθυλ - ουρία

Υπολογισμός της κυτταρικής πυκνότητας:

Για τον υπολογισμό της κυτταρικής πυκνότητας των καλλιεργειών πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του όγκου πακεταρισμένων κυτάρων σε κάθε καλλιέργεια. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε ειδικά αιματοκριτικά σωληνάκια. Αναλυτικότερα, 1 ml καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε στα 1500 g για

7 min. Κατόπιν, υπολογίστηκαν τα μικρόλιτρα (μl) “ πακεταρισμένων ” κυττάρων ανά ml καλλιέργειας.

Ποσοτική εκτίμηση των χρωστικών:

Για την απομόνωση των χλωροφυλλών ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Αρχικά, δείγματα από κάθε καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκαν στα 1500 g για 7 min. Ο όγκος των δειγμάτων που ελήφθησαν από τις αυτότροφες καλλιέργειες ήταν 10 ml. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, η πελέττα επαναδιαλύθηκε σε 1,5 ml μεθανόλης, το μίγμα θερμάνθηκε στους 70 °C και φυγοκεντρήθηκε (1500 g, 7 min). Η όλη διαδικασία επαναλήφθηκε μέχρι τον πλήρη αποχρωματισμό των δειγμάτων και στο συνολικό εκχύλισμα υπολογίστηκαν οι ποσότητες chl_a και chl_b φασματοφωτομετρικά, σύμφωνα με τη μέθοδο της *Holden* (1965):

$\begin{aligned} (\text{chl}_a) &= 16,5 \cdot \text{Απορρόφηση} (665 \text{ nm}) - 8,3 \cdot \text{Απορρόφηση} (650 \text{ nm}) \\ (\text{chl}_b) &= 33,8 \cdot \text{Απορρόφηση} (650 \text{ nm}) - 12,5 \cdot \text{Απορρόφηση} (665 \text{ nm}) \end{aligned}$

Ποσοτική εκτίμηση πρωτεϊνών:

Οι συνολικές πρωτεΐνες στα διάφορα δείγματα μετρήθηκαν φασματοφωτομετρικά, σύμφωνα με τη μέθοδο *Bradford* (1976), όπως προτείνεται από τους *Jones et al.* (1989).

Προσθήκη πολυαμινών και αναστολέων της βιοσύνθεσής τους:

Η προσθήκη της πολυαμίνης πουτρεσκίνης και του αναστολέα της έγινε σε στείρες συνθήκες μέσα σε εστία *Laminair* κατά τη χρονική στιγμή εκκίνησης των καλλιεργειών. Ο αναστολέας που χρησιμοποιήθηκε για την πουτρεσκίνη ήταν η 1,4 – διαμινο – 2 – βουτανόνη (1,4 DB). Ο στόχος του προαναφερθέντος αναστολέα εντοπίζεται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της πουτρεσκίνης, καθώς το 1,4 DB αναστέλλει τη δράση του ενζύμου της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η επίδραση των αυξημένων συγκεντρώσεων του CO₂ στην αύξηση της βιομάζας των φυτικών οργανισμών και στο φωτοσυνθετικό τους μηχανισμό είναι ένα φαινόμενο ιδιαίτερα μελετημένο στα ανώτερα φυτά (Kimball 1983, Hunt et al 1991, Van Oosten et al 1996). Όταν, μάλιστα, συνδυάζεται με την ύπαρξη ευνοϊκών για τη φωτοσύνθεση συνθηκών, όπως ο επαρκής φωτισμός, η κατάλληλη θερμοκρασία και η διάθεση νερού και θρεπτικών στοιχείων (Ross et al 1992), τότε μπορεί να οδηγήσει και σε αύξηση της βιομάζας σε ποσοστό που στην περίπτωση αρκετών φυτικών ειδών ξεπερνά το 50% (Hunt et al 1991, Kimball 1983).

Εξίσου σημαντικά, όμως, με τα ανώτερα φυτικά είδη είναι και τα μονοκύτταρα ευκαρυωτικά φύκη. Η θέση τους ως κυριότερων πρωτογενών παραγωγών στο φυτοπλαγκτόν των υδάτινων οικοσυστημάτων (Raymont 1980) προσδίδει σε αυτά ιδιαίτερη οικολογική αλλά και εμπορική σημασία, καθώς η ανάπτυξη φυτικής βιομάζας για την τροφή των ζωοπλαγκτονικών οργανισμών είναι ένα από τα απαραίτητα στάδια στο σχεδιασμό και την υλοποίηση των περισσότερων ιχθυογεννητικών σταθμών.

Αφορμή για την παρούσα μελέτη αποτέλεσε πρόσφατη εργασία που εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου της Κρήτης και στην οποία παρατηρήθηκε η αύξηση της βιομάζας του μονοκύτταρου ευκαρυωτικού φύκου *Scenedesmus obliquus* σε συνθήκες αυξημένης συγκέντρωσης CO₂ (Dakanali 1999).

Υγρές καλλιέργειες του *Scenedesmus obliquus* αναπτύχθηκαν αυτότροφα. Ο φωτισμός των καλλιεργειών έγινε με τη χρήση σταθερής πηγής φωτισμού. Η ένταση της PAR ακτινοβολίας (φωτοσυνθετικά ενεργής ακτινοβολίας) ήταν 180 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Ο αερισμός των καλλιεργειών έγινε με την παροχή μέσω αντλίας μιγμάτων αέρα περιεκτικότητας 0,03% και 10% σε CO₂, ενώ η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων κατά την εκκίνηση των καλλιεργειών ήταν 0,1 $\mu\text{l PCV} / \text{ml}$ καλλιέργειας. Επειδή στα μονοκύτταρα ευκαρυωτικά φύκη, συνεπώς και στο *Scenedesmus obliquus*, οι αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης εξαρτώνται από το αναπτυξιακό στάδιο του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Bishop et al 1971) η ανάπτυξη των διαφορετικών καλλιεργειών έγινε ισοχρονικά. Η διάρκεια της επώασης ήταν 18h.

Μετά την ολοκλήρωση της επώασης η επί τοις εκατό αύξηση στη βιομάζα της καλλιέργειας με 10% CO₂ σε σύγκριση με την καλλιέργεια 0,03% CO₂ (καλλιέργεια μάρτυρα) έφθανε το 19,5%. Η παρατήρηση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με τη διαπίστωση της *Dakanali* (1999) πως οι πρώτες εμφανείς διαφορές στην αύξηση της βιομάζας ανάμεσα στο μάρτυρα και της επωασμένη με αυξημένο CO₂ καλλιέργεια παρατηρούνταν με την ολοκλήρωση των πρώτων 20h από την εκκίνηση των καλλιεργειών.

Όταν, ωστόσο, η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων σε κάθε καλλιέργεια κατά τη στιγμή της εκκίνησής τους αυξήθηκε, τότε αυξήθηκε και η παρατηρούμενη διαφορά στη βιομάζα ανάμεσα στην καλλιέργεια με το 10% CO₂ και το μάρτυρα. Στον πίνακα 8 παρουσιάζεται η διαφορά στη βιομάζα ανάμεσα στην καλλιέργεια με το 10% CO₂ και το μάρτυρα όταν η αρχική συγκέντρωση κυττάρων σε κάθε καλλιέργεια κατά τη στιγμή της εκκίνησης ήταν ίση με: (α) 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας, (β) 0,2 μl PCV / ml καλλιέργειας, (γ) 0,3 μl PCV / ml καλλιέργειας.

Πίνακας 8: Για το ζεύγος καλλιεργειών 10% CO₂ και control παρουσιάζεται η ποσοστιαία διαφορά στη βιομάζα μετά την ολοκλήρωση της επώασης, για τις περιπτώσεις όπου η αρχική συγκέντρωση κυττάρων και στις δύο καλλιέργειες ήταν ίση με (α) 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας, (β) 0,1 μl PCV / ml καλλιέργειας, (γ) 0,2 μl PCV / ml καλλιέργειας.

Αρχικό PCV καλλιέργειας (μl κυττάρων / ml καλλιέργειας)	% διαφορά στη βιομάζα σε σύγκριση με το control
0,1	19,5
0,2	30,5
0,3	60,5

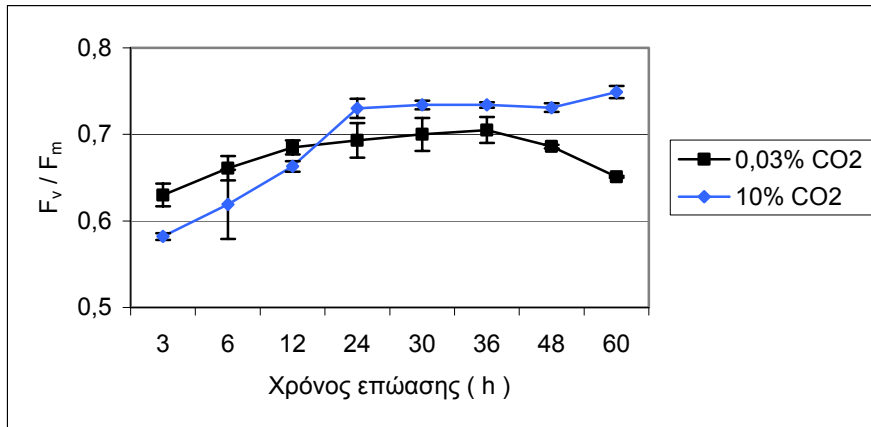
Από τις τρεις διαφορετικές κινητικές που πραγματοποιήθηκαν για το ζεύγος 10% CO₂ – μάρτυρα, η περίπτωση όπου η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων σε κάθε καλλιέργεια ήταν 0,3 PCV / ml καλλιέργειας ήταν αυτή όπου στο συντομότερο χρονικό διάστημα επιτεύχθηκε η μεγαλύτερη διαφορά ανάμεσα στη βιομάζα των δύο καλλιεργειών. Προς τούτο και επιλέχθηκε ως η αρχική συγκέντρωση για τη διεξαγωγή των περαιτέρω πειραμάτων.

Η επιλογή αρχικής συγκέντρωσης μεγαλύτερης των 0,3 μl PCV / ml καλλιέργειας (παραδείγματος χάριν, 0,4, 0,5 ή 0,6 μl PCV / ml) αποκλείστηκε, γιατί υπήρχε η περίπτωση της αύξησης της βιομάζας στις συγκεκριμένες καλλιέργειες να ενέπλεκε στην πειραματική διαδικασία και την παράμετρο του αυτοσκιασμού (Senger et al 1978). Ο τελευταίος προκύπτει όταν εξαιτίας της υπερβολικής αύξησης της βιομάζας σε μία καλλιέργεια, ο μέσος φωτισμός που αναλογεί σε κάθε κύτταρο γίνεται πολύ χαμηλότερος του απαιτούμενου.

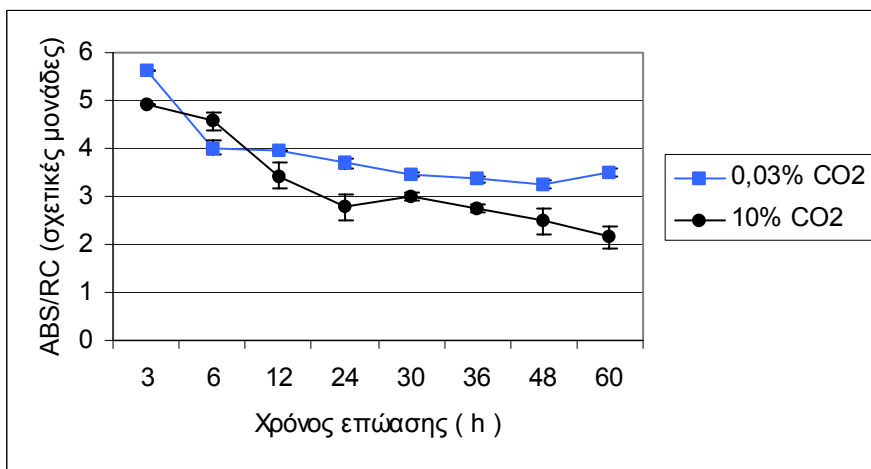
Όσον αφορά δε μελέτες, όπως η παρούσα, σχετικές με τις τιμές φωτοεξαρτημένων μεγεθών, όπως είναι η μεταβολή του LHCII, ο αυτοσκιασμός μπορεί να οδηγήσει σε σύγχυση και στην εξαγωγή πλάσματικών συμπερασμάτων. Ιδιαίτερα, μάλιστα, όταν πειραματικές διαδικασίες, όπως η επόμενη, ενέχουν μεγάλη πιθανότητα δημιουργίας αυτοσκιασμού, τότε είναι απαραίτητη μία εκ των προτέρων προσπάθεια για τον περιορισμό του συγκεκριμένου φαινομένου.

Η αύξηση της βιομάζας που προκαλείται σε φυτικούς οργανισμούς αναπτυσσόμενους σε υψηλό CO₂ είναι αποτέλεσμα της αύξησης της φωτοσυνθετικής τους δραστηριότητας (Nie 1995, Stitt 1999). Από πρόσφατες μελέτες στο *Scenedesmus obliquus* (Dakanali 1999) βρέθηκε πως και στα ευκαρυωτικά μικροφύκη που αναπτύσσονταν σε υψηλό CO₂ η αύξηση της μέγιστης φωτοσυνθετικής τους δραστηριότητας ήταν ο κύριος λόγος για την αύξηση της κυτταρικής βιομάζας. Στο *Scenedesmus obliquus*, όμως, (Senger et al 1987) αλλά και σε άλλα ανώτερα φυτά (Walters et al 1994) η αύξηση στη μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα προκύπτει από την ελάττωση στο μέγεθος του LHCII.

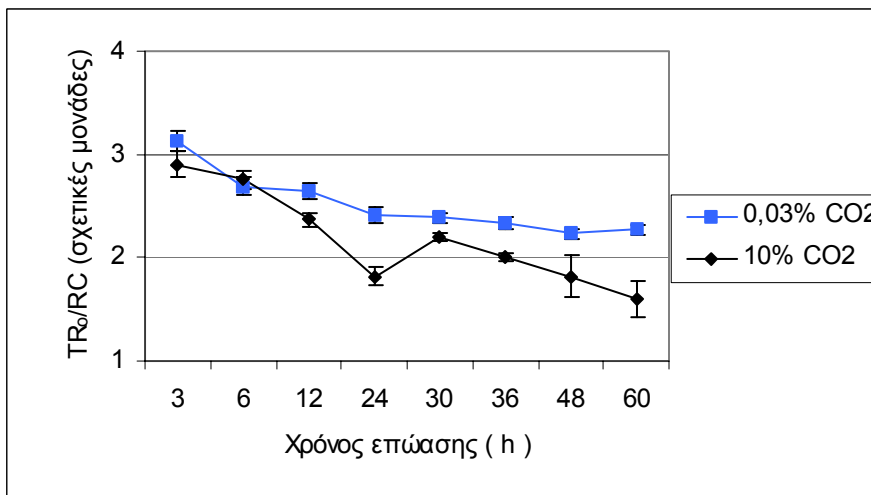
Προκειμένου να διαπιστωθεί αν και στην περίπτωση της επίδρασης του 10% CO₂ στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό του *Scenedesmus obliquus* παρατηρούνταν μείωση του μεγέθους του LHCII, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού σε δύο ισοχρονικές καλλιέργειες 0,03% CO₂ και 10% CO₂. Δείγματα από τις καλλιέργειες 0,03% CO₂ και 10% CO₂ ελήφθησαν στις 3, 6, 12, 24, 30, 36, 48 και 60h από την εκκίνηση των δύο καλλιεργειών. Στα δείγματα αυτά προκλήθηκε επαγωγή φθορισμού και κατόπιν με τη μέθοδο JIP TEST εκτιμήθηκαν για τα ανωτέρω οκτώ χρονικά σημεία οι τιμές των παραμέτρων Φ_{po}, ABS/RC, TR_o/RC, DI_o/RC και RC/Cs_o για καθεμιά από τις δύο καλλιέργειες. Στο σχήμα 4 παρουσιάζεται η μεταβολή του Φ_{po} (F_v/F_m) για τις δύο καλλιέργειες σε συνάρτηση με το χρόνο, ενώ παρόμοιες κινητικές για τα μεγέθη ABS/RC, TR_o/RC, DI_o/RC και RC/Cs_o παρουσιάζονται στα σχήματα 5, 6, 7 και 8, αντίστοιχα.



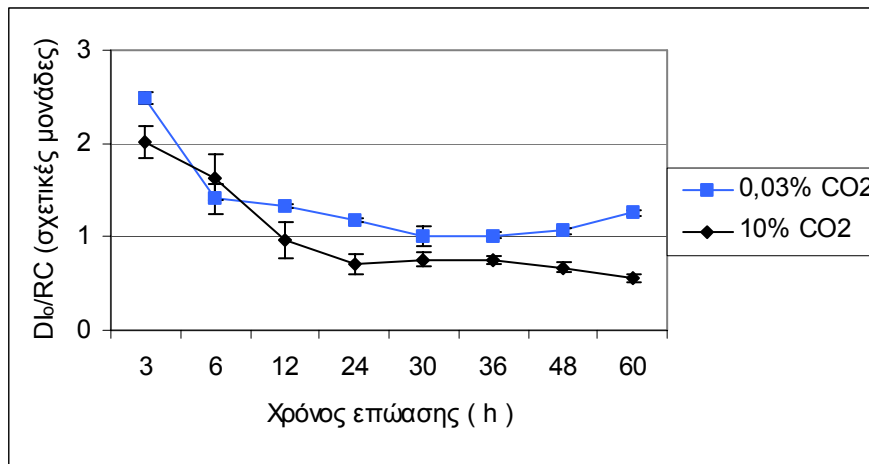
Σχήμα 4: Μεταβολή της μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης (F_v/F_m) των καλλιεργειών 0,03% CO₂ και 10% CO₂ σε συνάρτηση με το χρόνο.



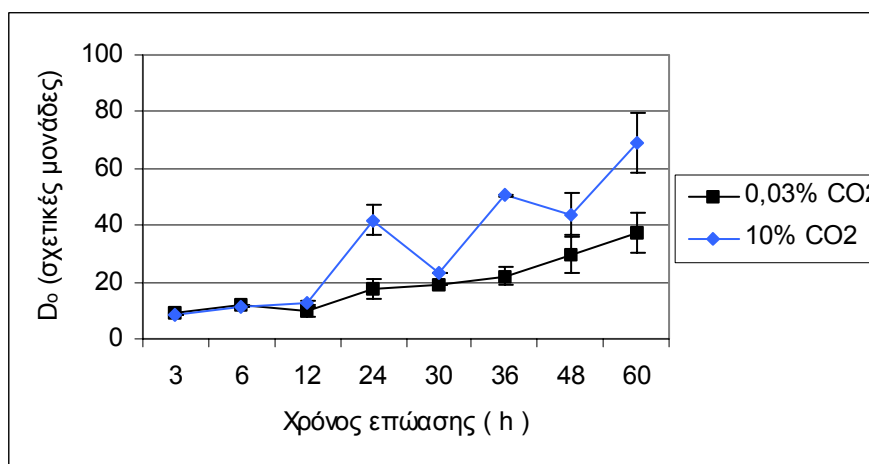
Σχήμα 5: Μεταβολή στην απορρόφηση ηλιακής ενέργειας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (ABS/RC) των καλλιεργειών 0,03% CO₂ και 10% CO₂ σε συνάρτηση με το χρόνο.



Σχήμα 6: Μεταβολή στην “ παγίδευση “ ενέργειας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (TR_o/RC) στις καλλιεργείες 0,03% CO₂ και 10% CO₂ σε συνάρτηση με το χρόνο.



Σχήμα 7: Μεταβολή στις απώλειες ενέργειας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (DI_o/RC) για τις καλλιέργειες 0,03% CO_2 και 10% CO_2 σε συνάρτηση με το χρόνο.



Σχήμα 8: Μεταβολή της πυκνότητας “ ανοικτών “ ενεργών κέντρων αντίδρασης (D_o) των καλλιεργειών 0,03% CO_2 και 10% CO_2 σε συνάρτηση με το χρόνο.

Από την παρατήρηση της παραμέτρου Φ_{po} για τις καλλιέργειες 0,03% CO_2 και 10% CO_2 καθόλη τη διάρκεια της επώασής τους διαπιστώθηκε πως οι ελάχιστες τιμές αυτής δεν απείχαν πολύ από το 0,6, ενώ οι μέγιστες δεν υπερέβαιναν το 0,76. Το γεγονός αυτό απέδειξε πως δεν υπήρχε περίπτωση τα κύτταρα κάποιας από τις δύο καλλιέργειες να είχαν υποστεί κάποιο είδος καταπόνησης. Κατά συνέπεια, οι μεταβολές που θα παρατηρούνταν στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό θα προέρχονταν από φυσιολογική προσαρμογή αυτού στις συνθήκες ανάπτυξης της κάθε καλλιέργειας και δε θα ήταν αποτέλεσμα δυσλειτουργίας αυτού, εξαιτίας πιθανού τραυματισμού του.

Όσον αφορά την απορρόφηση της ηλιακής ενέργειας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (ABS/RC), διαπιστώθηκε πως ενώ μέχρι και τις 6h οι τιμές της για το 0,03% CO_2 ήταν μικρότερες από τις αντίστοιχες της 10% CO_2 , από τις 12h κι έπειτα η κατάσταση παρουσίαζε ακριβώς αντίθετη όψη. Δηλαδή, οι

τιμές για την ABS/RC ήταν μεγαλύτερες στο 0,03% CO₂ σε σύγκριση με το 10% CO₂. Η διαφορά αυτή έφθανε στη μέγιστη τιμή της στις 24h, ενώ από τις 36h και μέχρι το τέλος της πειραματικής διαδικασίας δεν παρουσίαζε κάποια ιδιαίτερη μεταβολή.

Η παράμετρος ABS/RC, όμως, είναι ανάλογη με το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (LHCII) των φυτικών οργανισμών (Strasser et al 1995). Δηλαδή, υψηλές τιμές της αντιστοιχούν σε μεγάλο μέγεθος LHCII, ενώ χαμηλές τιμές της αντιστοιχούν σε μικρό μέγεθος LHCII. Συνεπώς, όσον αφορά το ζεύγος 0,03% CO₂ - 10% CO₂ το LHCII ήταν μεγαλύτερο στην καλλιέργεια 10% CO₂ μέχρι και τις 6h, ενώ από τις 12h κι έπειτα η καλλιέργεια μάρτυρας παρουσίαζε μεγαλύτερο μέγεθος LHCII απ' ό, τι η καλλιέργεια 10% CO₂.

Στο ίδιο συμπέρασμα οδήγησε και η παρατήρηση της μεταβολής με το χρόνο των παραμέτρων DI_o/RC και TR_o/RC για την κάθε καλλιέργεια. Η απωλεσθείσα λόγω διάχυσης από το κάθε ενεργό κέντρο αντίδρασης ενέργεια (DI_o/RC) και η παγίδευση ενέργειας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (TR_o/RC) εμφάνιζαν σε σχέση με το χρόνο παρόμοια μεταβολή με την ABS/RC. Ενώ, δηλαδή, μέχρι και τις 6h οι τιμές τους για την καλλιέργεια 10% CO₂ ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες του 0,03% CO₂, από τις 12h και μέχρι το τέλος της παρατήρησης (60h) οι τιμές των DI_o/RC και TR_o/RC ήταν μεγαλύτερες για το 0,03% CO₂, με τη διαφορά να μην παρουσιάζει ιδιαίτερες μεταβολές μετά τις 36h από την εκκίνηση των καλλιεργειών.

Από την άλλη, όσον αφορά τη συγκέντρωση των " ανοικτών " ενεργών κέντρων αντίδρασης (D_o), διαπιστώθηκε πως αυτή αυξανόταν στην καλλιέργεια 10% CO₂ με την πάροδο του χρόνου. Ετσι, ενώ μέχρι και τις 6h τα ενεργά κέντρα αντίδρασης στη 10% CO₂ ήταν λιγότερα από τα αντίστοιχα του 0,03% CO₂ , από τις 12h μέχρι και το τέλος των παρατηρήσεων στις 60h η 10% CO₂ διέθετε περισσότερα ενεργά κέντρα αντίδρασης απ' ό, τι ο μάρτυρας. Η συγκέντρωση των ανοικτών ενεργών κέντρων αντίδρασης, όμως, είναι μία παράμετρος άμεσα εξαρτημένη από το μέγεθος του LHCII. Αναλυτικότερα, όσο μεγαλύτερη είναι η φωτοσυλλεκτική κεραία, τόσο μεγαλύτερη είναι η απορροφώμενη από αυτή ηλιακή ενέργεια. Όταν, όμως, μεγάλα ποσά ηλιακής ενέργειας διοχετεύονται από το LHCII προς τον υπόλοιπο φωτοσυνθετικό μηχανισμό, τότε τα κέντρα προώθησής της προς την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων – δηλαδή τα ενεργά κέντρα αντίδρασης

– καλύπτονται πολύ γρήγορα από τα μετακινούμενα προς αυτά ηλεκτρόνια. Η συνεχής ροή ηλεκτρονίων προς τα ενεργά κέντρα έχει ως αποτέλεσμα ο ρυθμός με τον οποίο τα τελευταία καλύπτονται να είναι μεγαλύτερος από το ρυθμό προώθησής των ηλεκτρονίων κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Ως αποτέλεσμα, 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 περαιτέρω στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό.

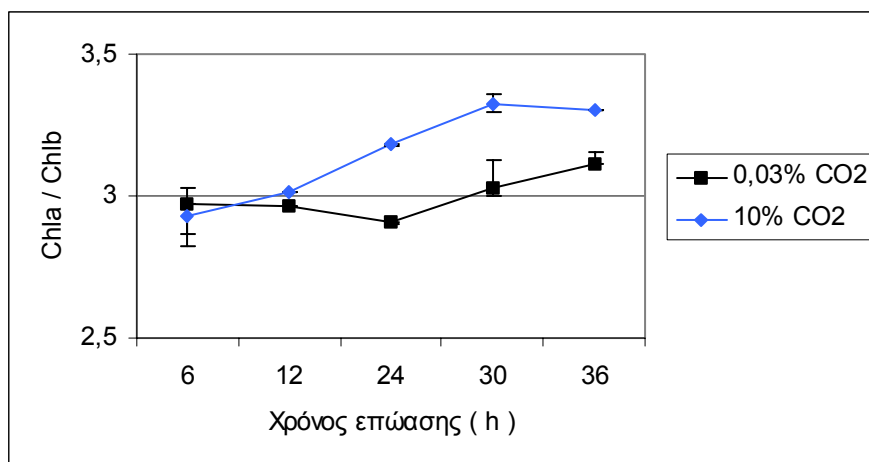
Όπως γίνεται αντιληπτό, ο μειωμένος αριθμός κέντρων αντίδρασης του 0,03% CO₂ συνάδει με την αύξηση του LHCII στα κύτταρα της εν λόγω καλλιέργειας. Από την άλλη, η αύξηση μετά τις 12h των “ ανοικτών ” ενεργών κέντρων αντίδρασης στα κύτταρα της καλλιέργειας 10% CO₂ υποδήλωνε την ελάττωση του LHCII, διαπίστωση που βρισκόταν σε συμφωνία με όσα προέκυψαν για τη μεταβολή του LHCII και από τη μελέτη των υπόλοιπων παραμέτρων του επαγωγικού φθορισμού.

Συνεπώς, από τη μελέτη της μεταβολής των επιμέρους χαρακτηριστικών του επαγωγικού φθορισμού για τις καλλιέργειες 0,03% CO₂ και 10% CO₂ στο χρονικό διάστημα 0 – 60h διαπιστώθηκε πως από τις 12h η φωτοσυλλεκτική κεραία της 10% CO₂ καλλιέργειας ήταν ξεκάθαρα μικρότερη από την αντίστοιχη του μάρτυρα.

Το LHCII είναι το χλωροφυλλοπρωτεϊνικό σύμπλοκο του φυτικού κυττάρου με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση μορίων χλωροφύλλης b (Erickson 1992). Συνεπώς, αύξηση του LHCII έχει ως αντίκτυπο αύξηση της ποσότητας των μορίων χλωροφύλλης b και κατά συνέπεια ελάττωση του λόγου chl_a/chl_b. Αντίθετα, μείωση του LHCII συνοδεύεται από άυξηση του λόγου chl_a/chl_b. Οποιαδήποτε, δηλαδή, αλλαγή στο μέγεθος του LHCII προκαλεί αντίστροφα ανάλογη μεταβολή στην τιμή του λόγου chl_a/chl_b (Walters et al 1994).

Προκειμένου να ελεγχθούν οι μεταβολές στο λόγο chl_a/chl_b στα κύτταρα του *Scenedesmus obliquus* κατά τη διάρκεια της προσαρμογής τους σε αυξημένες συγκεντρώσεις CO₂ σχεδιάστηκε και πραγματοποιήθηκε η ακόλουθη κινητική: Δύο ισοχρονικές καλλιέργειες (0,03% CO₂, 10% CO₂) αναπτύχθηκαν στους 28°C για 36h. Η αρχική συγκέντρωση κυττάρων σε κάθε καλλιέργεια ήταν 0,3 ml PCV / ml καλλιέργειας. Κατά τη διάρκεια της επώασης ελήφθησαν δείγματα από κάθε καλλιέργεια σε τακτά χρονικά διαστήματα από την εκκίνηση των καλλιεργειών. Από τα δείγματα αυτά έγινε εκχύλιση των

χλωροφυλλών τους και ακολούθως υπολογίστηκε ο λόγος των συγκεντρώσεων χλωροφύλλης a και χλωροφύλλης b (chl_a/chl_b) για το κάθε δείγμα. Στο σχήμα 9 παρουσιάζεται η μεταβολή του λόγου chl_a/chl_b σε σχέση με το χρόνο για τις καλλιέργειες 0,03% CO₂ και 10% CO₂.



Σχήμα 9: Παρουσιάζεται η μεταβολή του λόγου των συγκεντρώσεων της χλωροφύλλης a και της χλωροφύλλης b (chl_a/chl_b) των καλλιεργειών 0,03% CO₂ και 10% CO₂ σε συνάρτηση με το χρόνο.

Από την παρατήρηση των ανωτέρω μεταβολών διαπιστώθηκε πως ενώ μέχρι τις πρώτες 12h της επώασης ο λόγος chl_a/chl_b για το 0,03% CO₂ ήταν μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο για την καλλιέργεια με το 10% CO₂, από τις 12h μέχρι και το πέρας της επώασης η σχέση των δύο λόγων ήταν ακριβώς αντίθετη. Δηλαδή, από τις 12h κι έπειτα, η τιμή του λόγου chl_a/chl_b της καλλιέργειας με το 10% CO₂ ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του μάρτυρα. Από τη διαπίστωση των *Walters et al* (1994) για τη σχέση ανάμεσα στο μέγεθος του LHCII και την τιμή του λόγου chl_a/chl_b γίνεται αντιληπτό πως η μείωση του λόγου chl_a/chl_b στο 0,03% CO₂ από τις 12h κι έπειτα προκλήθηκε από την αύξηση του μεγέθους του LHCII, ενώ αντίθετα η αύξηση του λόγου στη 10% CO₂ – και συνεπώς η ελάττωση των μορίων chl_b – ήταν αποτέλεσμα της μείωσης του μεγέθους του LHCII.

Στη δομή του LHCII, όμως, συμμετέχουν εκτός από μόρια χλωροφυλλών και μόρια πρωτεϊνών. Συνεπώς, ελάττωση στο μέγεθος του LHCII θα έπρεπε να έχει αντίκτυπο και στην πρωτεϊνική του σύσταση. Στους ανώτερους φυτικούς οργανισμούς και στα μονοκύτταρα ευκαρυωτικά φύκη το LHCII απαντάται τόσο με τη μορφή των μονομερών του όσο και με την περισσότερο λειτουργική μορφή των τριμερών συμπλόκων. Η τελευταία

αποτελεί το ανώτερο μέχρι στιγμής στάδιο λειτουργικής οργάνωσης του LHCII (Dreyfuss et al 1994, Guseinova et al 2000).

Δύο υγρές καλλιέργειες - 0,03% CO₂ και 10% CO₂ – με αρχικό PCV ίσο με 0,3 ml κυττάρων / ml καλλιέργειας και όγκο 1 lt η καθεμία επώαστηκαν στους 28°C για 24h. Μετά το πέρας της επώασης τα κύτταρα από κάθε καλλιέργεια ελήφθησαν με τη μορφή πελέτας και υπέστησαν μηχανική θραύση μέσα σε ομογενοποιητή. Με την εφαρμογή της κατάλληλης πειραματικής διαδικασίας (Argyroudi – Akoynoglou et al 1981) απομονώθηκαν μεμβράνες θυλακοειδών, έγινε αποδιάταξη των επιμέρους συμπλόκων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και με κλίση σακχαρόζης 5% - 22% διαχωρίστηκαν τα επιμέρους υποσύμπλοκα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και μεταξύ αυτών οι ολιγομερείς και μονομερείς μορφές του LHCII. Στο σχήμα 10 παρουσιάζεται η εικόνα των συνεχών διαβαθμίσεων της σακχαρόζης αμέσως μετά το πέρας της υπερφυγοκέντρωσης.

Μετά την επιτυχή απομόνωση και το διαχωρισμό των ολιγομερών και των μονομερών του LHCII καλλιεργείων 0,03% CO₂ και 10% CO₂ ακολούθησε η ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνών του κάθε κλάσματος. Τα αποτελέσματα της ποσοτικής αυτής εκτίμησης παρουσιάζονται στον πίνακα 9.

	ελεύθερες χρωστικές

Σχήμα 10: Συνεχής διαβάθμιση σακχαρόζης μετά το πέρας της υπερφυγοκέντρωσης. Η κορυφαία ζώνη περιελάμβανε τα λιπιδικής φύσης μόρια που συμμετέχουν στη δομή των θυλακοειδών καθώς και τις ελεύθερες χρωστικές. Δεύτερη βρισκόταν η ζώνη που περιείχε τα μονομερή του LHCII και τρίτη η ζώνη με τα ολιγομερή (τριμερή) του LHCII. Τέταρτη εμφανιζόταν η ζώνη με πρωτεΐνες των κέντρων αντίδρασης του φωτοσυστήματος II (Core Proteins) και πέμπτη η ζώνη με το LHCI και πρωτεΐνες των κέντρων αντίδρασης του φωτοσυστήματος I.

Πίνακας 9: Για τις καλλιέργειες 0,03 CO₂ και 10% CO₂ παρουσιάζονται οι ποσότητες των αποπρωτεϊνών του LHCII που υπήρχαν στη μορφή των μονομερών δομών και των ολιγομερών συμπλόκων του LHCII. Τα αποτελέσματα αναφέρονται σε δείγματα από τις δύο καλλιέργειες με την ίδια συγκέντρωση ολικών χλωροφυλλών (περίπου ίση με 1500 µgr / ml καλλιέργειας).

	0,03% CO ₂	10% CO ₂
Μονομερείς μορφές LHCII (µgr πρωτεϊνών)	136,5	372
Ολιγομερείς μορφές LHCII (µgr πρωτεϊνών)	369,4	77,8
Ολική ποσότητα LHCII (µgr πρωτεϊνών)	505,9	449,9

Από τη μελέτη των αποτελεσμάτων προέκυψε πως το σύνολο των αποπρωτεϊνών του LHCII (μονομερών και ολιγομερών μορφών) της καλλιέργειας 10% CO₂ στις 24h ήταν μικρότερο από το αντίστοιχο της 0,03% CO₂ στο ίδιο χρονικό σημείο. Το τελευταίο επαλήθευε και συμφωνούσε με τα μέχρι εκείνη τη στιγμή γνωστά και παρατηρηθέντα από τις μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού και τις εκτιμήσεις του λόγου chl_a/chl_b για τα δύο είδη καλλιεργειών. Επιπλέον, αποτέλεσε τη βιοχημική επαλήθευση και

επιβεβαίωση των παρατηρήσεων σε μοριακό επίπεδο των *Van Oosten et al* (1994, 1995). Οι τελευταίοι εργαζόμενοι με την τομάτα (*Lycopersicon esculentum*) είχαν διαπιστώσει πτώση των μεταγράφων cab γονιδίων κατά την έκθεση του φυτού σε υψηλές συγκεντρώσεις CO₂.

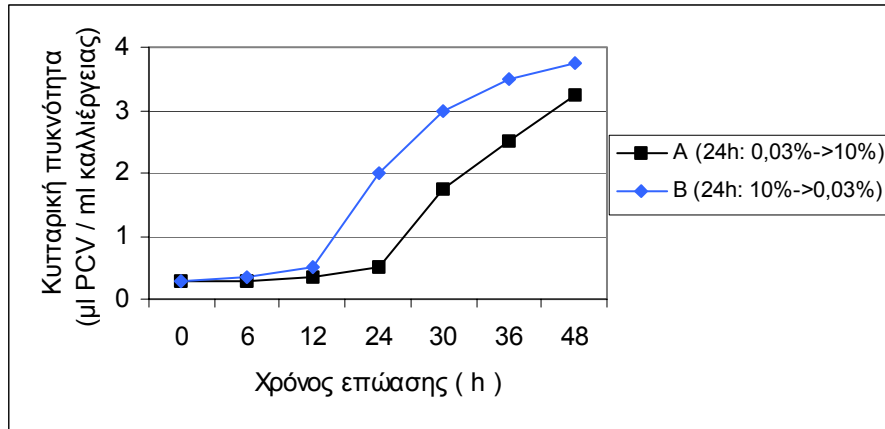
Πρέπει, επίσης, να αναφερθεί πως οι πληροφορίες που έδωσε η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία αναφέρονται στην ποσότητα των αποπρωτεϊνών του LHCII που αναλογούσαν στα θυλακοειδή της κάθε καλλιέργειας. Ο συνδυασμός του με τις πληροφορίες που προήλθαν από την ABS/RC του επαγωγικού φθορισμού και οι οποίες σχετίζονταν με το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας που αναλογεί σε κάθε κέντρο αντίδρασης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού συνεισέφερε ακόμα περισσότερο στο σχηματισμό μίας όσο το δυνατόν πιο ολοκληρωμένης εικόνας για τη γενικότερη μείωση του LHCII κατά την έκθεση του *Scenedesmus obliquus* στο 10% CO₂.

Τέλος, διαπιστώθηκε πως η ποσότητα των αποπρωτεϊνών του LHCII που βρισκόταν με τη μορφή μονομερών στη 10% CO₂ ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της 0,03% CO₂, ενώ αντίθετα οι τριμερείς μορφές του LHCII στη 10% CO₂ ήταν ποσοτικά λιγότερες από τις αντίστοιχες της 0,03% CO₂ . Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να αποτελούσε μία ένδειξη όσον αφορά τον τρόπο με τον οποίο πραγματοποιείται η προσωρινή ρύθμιση στην ποσότητα του LHCII. Δηλαδή, η βραχυπρόθεσμη μείωση του μεγέθους του LHCII κατά το στάδιο της πρώιμης απόκρισης του *Scenedesmus obliquus* σε αυξημένη συγκέντρωση CO₂ ενδεχομένως να εξυπηρετείται από τη μετατροπή ποσότητας από τις τριμερείς μορφές του στις λιγότερο λειτουργικές μονομερείς. Από την άλλη, ο συνδυασμός των τελευταίων είναι αυτός που θα δώσει τη λειτουργική μορφή της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (Dreyfuss et al 1994, Guseinova et al 2000) και στον οποίο φαίνεται να βασίστηκε η αύξηση του LHCII στα κύτταρα της 0,03% CO₂ καλλιέργειας.

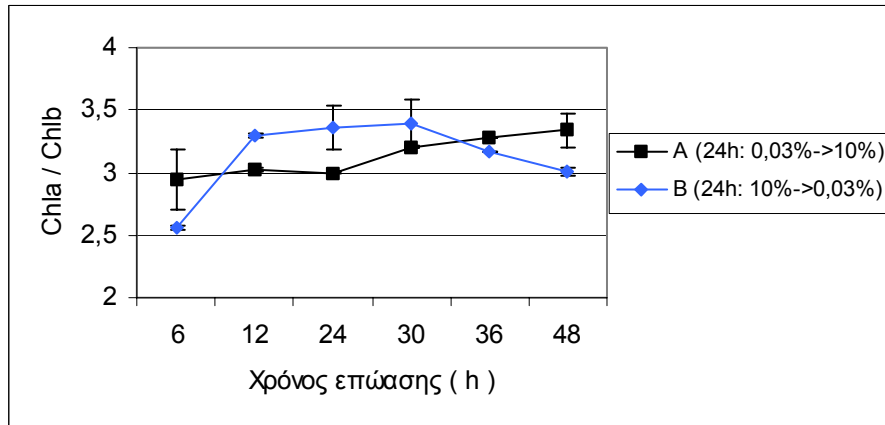
Η μέχρι στιγμής πορεία των μελετών εστίασε στην επίδραση της αυξημένης συγκέντρωσης του CO₂ στην ανάπτυξη των καλλιεργειών του *Scenedesmus obliquus*. Η κατάσταση που διαμορφώνεται, ωστόσο, στο φυσικό περιβάλλον με την αύξηση της συγκέντρωσης του CO₂ στην ατμόσφαιρα φέρνει πολλές φορές αντιμέτωπους με το συγκεκριμένο

φαινόμενο οργανισμούς οι οποίοι έχουν ολοκληρώσει την ανάπτυξή τους. Οι οργανισμοί αυτοί αποκρίνονται στην αύξηση των ατμοσφαιρικών συγκεντρώσεων του CO₂, προβαίνοντας σε ένα σύνολο ανατομικών, μορφολογικών και μεταβολικών προσαρμογών (Bowes 1996). Για να μελετηθεί η πορεία της προσαρμογής και των μονοκύτταρων ευκαρυωτικών φυκών στην αύξηση της ατμοσφαιρικής συγκέντρωσης του CO₂ σχεδιάστηκε και πραγματοποιήθηκε η ακόλουθη σειρά πειραμάτων: Δύο διαφορετικές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν, η πρώτη (καλλιέργεια Α) σε συνθήκες φυσιολογικών συγκεντρώσεων CO₂ (0,03%) και η δεύτερη (καλλιέργεια Β) σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 10% CO₂. Με τη συμπλήρωση των πρώτων 24h της επώασης είχε ολοκληρωθεί η προσαρμογή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των κυττάρων της κάθε καλλιέργειας στις συνθήκες ανάπτυξής της. Σε αυτό ακριβώς το χρονικό σημείο οι συνθήκες των δύο καλλιεργειών αντιστράφηκαν. Έτσι, η καλλιέργεια Α μεταφέρθηκε σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη κατά 10% σε CO₂, ενώ η καλλιέργεια Β μεταφέρθηκε σε ατμόσφαιρα με φυσιολογική συγκέντρωση CO₂ (0,03%). Στις καινούριες συνθήκες οι δύο καλλιέργειες παρέμειναν για 24h. Συνεπώς, ο συνολικός χρόνος επώασης των δύο καλλιεργειών ανήλθε στις 48h.

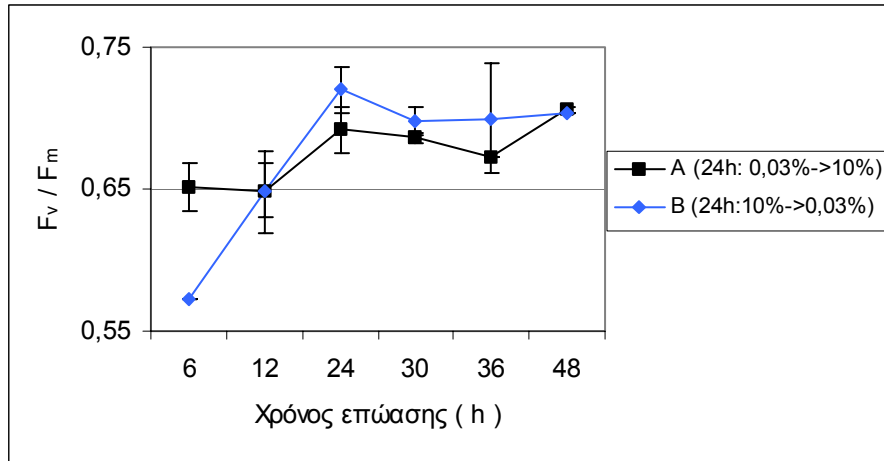
Κατά τη διάρκεια της επώασης των καλλιεργειών μελετήθηκαν τόσο η αύξηση της βιομάζας τους υπό διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης όσο και η μεταβολή του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής τους κεραίας. Αναλυτικότερα, από τις δύο καλλιέργειες ελήφθησαν δείγματα στις 6, 12, 24, 30, 36 και 48h από την εκκίνησή τους, με σκοπό τη μέτρηση του όγκου πακεταρισμένων κυττάρων (PCV) της κάθε καλλιέργειας, την εκχύλιση ολικών χλωροφυλλών και την εκτίμηση του λόγου chl_a/chl_b και τον υπολογισμό των παραμέτρων του επαγωγικού φθορισμού στις έξι προαναφερθείσες χρονικές στιγμές. Στο σχήμα 11 παρουσιάζεται η μεταβολή της κυτταρικής πυκνότητας των δύο καλλιεργειών σε συνάρτηση με το χρόνο. Στο σχήμα 12 παρουσιάζεται η μεταβολή του λόγου chl_a/chl_b των καλλιεργειών σε συνάρτηση με το χρόνο, ενώ στα σχήματα 13, 14, 15, 16 και 17 παρουσιάζεται αντίστοιχα η μεταβολή με το χρόνο των παραμέτρων Φ_{po}, ABS/RC, TR_o/RC, DI_o/RC και D_o του επαγωγικού φθορισμού για τις καλλιέργειες Α και Β.



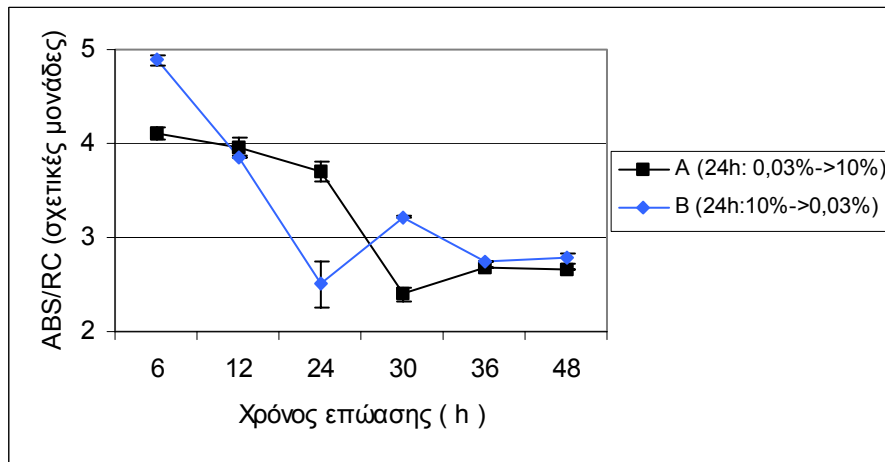
Σχήμα 11: Μεταβολή της κυτταρικής πυκνότητας σε συνάρτηση με το χρόνο για τις καλλιέργειες A και B. Στις 24h από την εκκίνηση του πειράματος η καλλιέργεια A μεταφέρθηκε από φυσιολογική συγκέντρωση CO₂ (0,03%) σε υψηλή (10%), ενώ η καλλιέργεια B μεταφέρθηκε από υψηλή συγκέντρωση CO₂ (10%) σε φυσιολογική (0,03%).



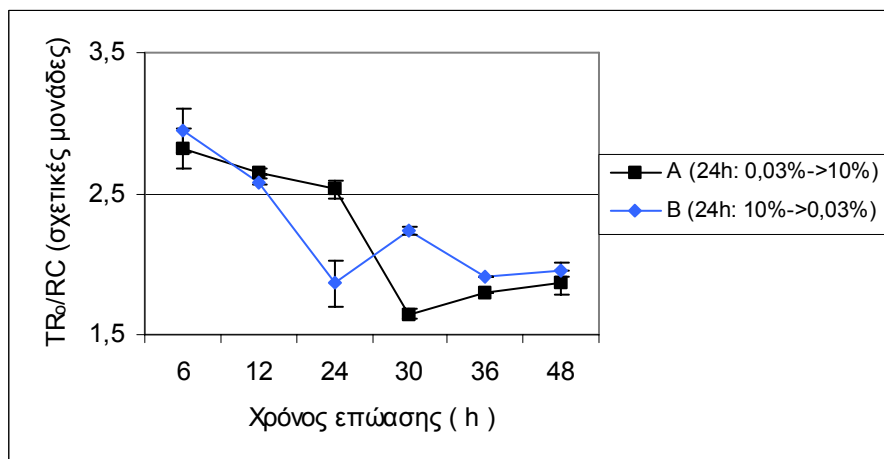
Σχήμα 12: Μεταβολή του λόγου των συγκεντρώσεων της χλωροφύλλης a και της χλωροφύλλης b (chla/chlb) των καλλιεργειών A και B σε συνάρτηση με το χρόνο. Οι 24h αποτελούν το χρονικό σημείο αλλαγής των συνθηκών των δύο καλλιεργειών.



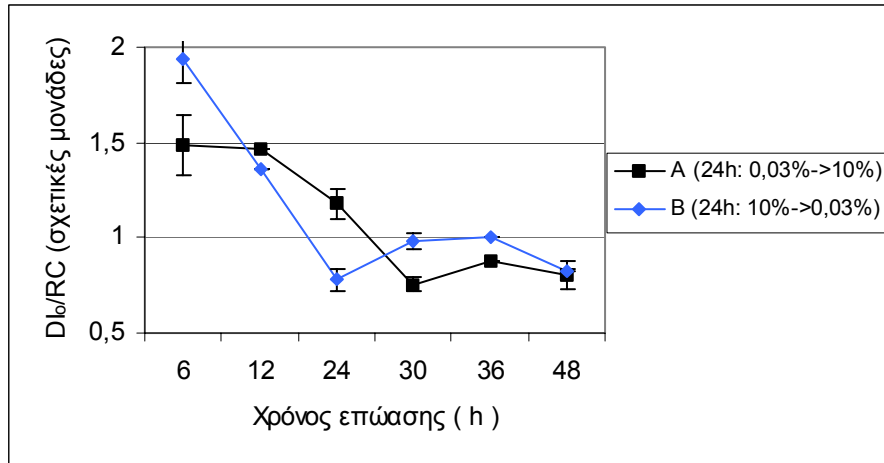
Σχήμα 13: Μεταβολή της μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης F_v/F_m σε συνάρτηση με το χρόνο για τις καλλιέργειες A και B. Οι 24h αποτελούν το χρονικό σημείο αλλαγής των συνθηκών των δύο καλλιεργειών.



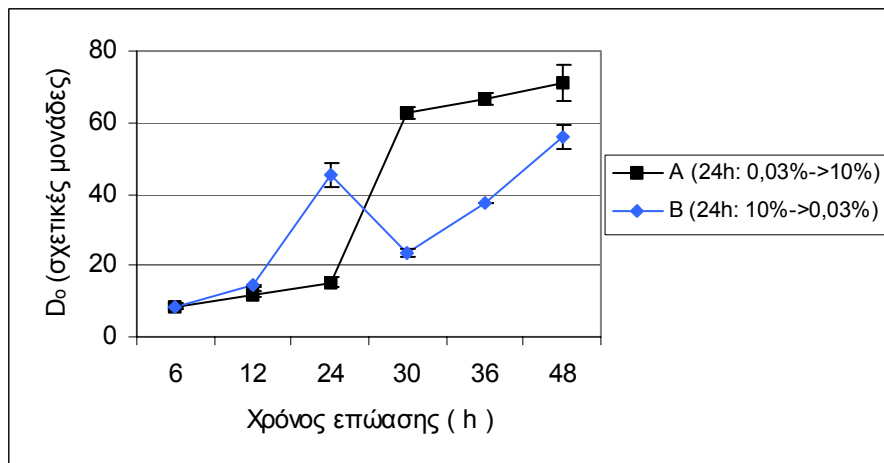
Σχήμα 14: Μεταβολή στην απορρόφηση ηλιακής ενέργειας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (ABS/RC) σε συνάρτηση με το χρόνο για τις καλλιέργειες A και B. Το χρονικό σημείο των 24h αντιστοιχεί στο σημείο αλλαγής των συνθηκών των δύο καλλιεργειών.



Σχήμα 15: Μεταβολή στην “ παγίδευση ” ενέργειας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (TR_o/RC) σε συνάρτηση με το χρόνο για τις καλλιέργειες A και B. Το χρονικό σημείο των 24h αντιστοιχεί στο σημείο αλλαγής των συνθηκών των δύο καλλιεργειών.



Σχήμα 16: Μεταβολή στις απώλειες ενέργειας με τη μορφή διάχυσης ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (DI_o/RC) από τις καλλιέργειες A και B σε συνάρτηση με το χρόνο. Το χρονικό σημείο των 24h αντιστοιχεί στο σημείο αλλαγής των συνθηκών των δύο καλλιεργειών.



Σχήμα 17: Μεταβολή στην πυκνότητα των “ ανοικτών ” ενεργών κέντρων αντίδρασης (D_o) σε συνάρτηση με το χρόνο για τις καλλιέργειες A και B. Το χρονικό σημείο των 24h αντιστοιχεί στο σημείο αλλαγής των συνθηκών των δύο καλλιεργειών.

Από τη μελέτη της μεταβολής του λόγου chl_a/chl_b για τις δύο καλλιέργειες διαπιστώθηκε πως από τις 12h μέχρι και τις 24h η τιμή του για την καλλιέργεια που αναπτυσσόταν στο 10% CO_2 ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη για την καλλιέργεια που αναπτυσσόταν στο 0,03% CO_2 . Το γεγονός αυτό βρισκόταν σε συμφωνία με τις μέχρι τη στιγμή εκείνη παρατηρήσεις του λόγου chl_a/chl_b για τις καλλιέργειες που αναπτύσσονταν σε ατμόσφαιρα με φυσιολογική συγκέντρωση CO_2 και σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με CO_2 . Η διαφορά της τιμής του λόγου ανάμεσα στις δύο καλλιέργειες προέκυψε εξαιτίας της αύξησης της chl_b στα κύτταρα της πρώτης καλλιέργειας, αύξηση η οποία οφειλόταν στην κατ' ανάλογο τρόπο μεταβολή του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής κεραίας στα κύτταρα της καλλιέργειας που

αναπτυσσόταν στο 0,03% CO₂. Από τις 24h κι έπειτα οι συνθήκες ανάπτυξης των δύο καλλιεργειών αντιστράφηκαν. Η αλλαγή των συνθηκών ανάπτυξης είχε εμφανείς συνέπειες και στο λόγο chl_a/chl_b, καθώς μεταβλήθηκε η σχέση των τιμών του ανάμεσα στις δύο καλλιέργειες. Έτσι, 12h μετά την αλλαγή (δηλαδή 36h μετά την εκκίνηση του πειράματος) ο λόγος chl_a/chl_b για την καλλιέργεια A ήταν μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο της καλλιέργειας B. Το στοιχείο αυτό συνδέεται αντιστρόφως ανάλογα με τη διαφορά μεγέθους στο LHCII των δύο καλλιεργειών (Walters et al 1994). Αποτελεί, επίσης, σοβαρή ένδειξη πως η επίδραση του CO₂ στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό κατά την προσαρμογή των καλλιεργειών στο 10% CO₂ εκδηλώνεται σε χρόνο περίπου ίδιο με τα αποτελέσματα από την επίδραση του CO₂ κατά την ανάπτυξη των καλλιεργειών.

Ωστόσο, η εκτίμηση για το χρόνο προσαρμογής του *Scenedesmus obliquus* στο 10% CO₂ διαφοροποιήθηκε υπό το πρίσμα των παραμέτρων του επαγωγικού φθορισμού. Συγκεκριμένα, η μελέτη της μεταβολής των παραμέτρων ABS/RC, TR_o/RC, DI_o/RC και D_o έδειξε πως η προσαρμογή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε εμπλουτισμένη σε CO₂ ατμόσφαιρα ολοκληρωνόταν μέσα σε 6h και όχι 12h από την αλλαγή των συνθηκών της ανάπτυξης.

Αναλυτικότερα, από τη μελέτη της ABS/RC για τις δύο καλλιέργειες διαπιστώθηκε πως στις 12h από την εκκίνηση του πειράματος η τιμή της για την καλλιέργεια που αναπτυσσόταν στο 0,03% CO₂ ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη που αναπτυσσόταν στο 10% CO₂. Η διαφορά αυτή διατηρήθηκε μέχρι και τις 24h, οπότε και άλλαξαν οι συνθήκες ανάπτυξης των δύο καλλιεργειών, δηλώνοντας πως μέχρι και εκείνο το χρονικό σημείο το LHCII στα κύτταρα της καλλιέργειας A ήταν μεγαλύτερο από το αντίστοιχο της καλλιέργειας που αναπτυσσόταν στο 10% CO₂ (B). Στις 24h από την εκκίνηση του πειράματος οι συνθήκες ανάπτυξης των δύο καλλιεργειών αντιστράφηκαν. Έτσι, η καλλιέργεια A μεταφέρθηκε από το 0,03% CO₂ στο 10% CO₂, ενώ η καλλιέργεια B μεταφέρθηκε από το 10% CO₂ στο 0,03% CO₂. Το γεγονός αυτό οδήγησε και στην αντιστροφή της σχέσης ανάμεσα στα LHCII των δύο καλλιεργειών, ως αποτέλεσμα της αύξησης του LHCII στην καλλιέργεια B, η οποία πλέον προσαρμοζόταν σε φυσιολογική συγκέντρωση CO₂, και της μείωσής του στην καλλιέργεια A, η οποία πλέον προσαρμοζόταν στην υψηλή

συγκέντρωση CO₂. Όπως, όμως, φαίνεται και στο σχήμα 14, ο χρόνος που απαιτήθηκε για την προσαρμογή στις νέες συνθήκες ήταν μόλις 6h.

Δεν είναι, ωστόσο, μόνο η ABS/RC που οδήγησε στο συγκεκριμένο συμπέρασμα. Την ίδια θέση επιβεβαίωσαν και οι μεταβολές των υπόλοιπων παραμέτρων του επαγωγικού φθορισμού. Η “ παγίδευση “ ενέργειας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης, TR₀/RC, παρουσίαζε μεταβολή παρόμοια με αυτή της ABS/RC. Δηλαδή, ενώ από τις 12h μέχρι και τις 24h η τιμή της ήταν μεγαλύτερη για την πρώτη καλλιέργεια - που αναπτυσσόταν στο 0,03% CO₂ - μετά την αντιστροφή στις συνθήκες των δύο καλλιεργειών η τιμή της έγινε μεγαλύτερη για τη δεύτερη καλλιέργεια, η οποία πλέον προσαρμοζόταν στο 0,03% CO₂. Η αλλαγή αυτή αντικατόπτριζε την αύξηση στο LHCII της καλλιέργειας που προσαρμοζόταν στο 0,03% CO₂ και τη μείωσή του στην πρώτη καλλιέργεια, που από τις 24h κι έπειτα προσαρμοζόταν στο 10%. Και αυτό διότι όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας των κυττάρων, τόσο μεγαλύτερο είναι και το διοχετευόμενο προς τα ενεργά κέντρα αντίδρασης ποσό ενέργειας. Κατά συνέπεια, αυξάνεται και το ποσό της ενέργειας που παγιδεύεται σε αυτά με τη μορφή ηλεκτρονίων.

Η DI₀/RC, η οποία είναι άμεσα εξαρτημένη από το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας αφού όσο μεγαλύτερο το LHCII, τόσο μεγαλύτερο το ποσό της προσλαμβανόμενης από αυτό ηλιακής ακτινοβολίας και κατά συνέπεια τόσο μεγαλύτερες οι απώλειες ενέργειας κυρίως με τη μορφή διάχυσης, παρουσίαζε παρόμοια μεταβολή με τις προηγούμενες δύο παραμέτρους του επαγωγικού φθορισμού. Το χρονικό διάστημα που απαιτήθηκε για την αλλαγή των τιμών και της DI₀/RC ανάμεσα στις δύο καλλιέργειες ήταν ίσο με 6h.

Όσον αφορά στην πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης, D₀, στα κύτταρα των δύο καλλιεργειών, αυτή μεταβλήθηκε ακριβώς αντίθετα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μεγέθη του επαγωγικού φθορισμού. Δηλαδή, από τις 12h μέχρι και τις 24h η τιμή της ήταν υψηλότερη για την καλλιέργεια που αναπτυσσόταν στο 10% CO₂. Ωστόσο, μετά τις 24h, η D₀ έγινε μεγαλύτερη για την πρώτη καλλιέργεια, η οποία πλέον προσαρμοζόταν στο 10% CO₂. Και αυτή η μεταβολή χρειάστηκε μόλις 6h, για να πραγματοποιηθεί. Η αύξηση της πυκνότητας των κέντρων αντίδρασης με την έκθεση των καλλιεργειών σε υψηλή συγκέντρωση CO₂ (10%) σε συνδυασμό με τη μείωση της ποσότητας των αποπρωτεϊνών του LHCII, που όπως αποδείχτηκε προηγουμένως

προκαλείται από την έκθεση στο 10% CO₂, σημαίνει ότι αυξήθηκαν τα ενεργά κέντρα αντίδρασης με μικρές φωτοσυλλεκτικές κεραίες. Αυτό βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με τις μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού όπου το μέγεθος του LHCII ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης παρουσιάζεται πολύ μικρότερο από το αντίστοιχο του μάρτυρα.

Το σύνολο, λοιπόν, των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα των καλλιεργειών A και B κατά τη διάρκεια της εν λόγω πειραματικής σειράς δεν έδωσε μία ενιαία εικόνα ως προς το χρόνο προσαρμογής του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 10% CO₂. Και αυτό, διότι ενώ οι εκτιμήσεις από την εκχύλιση των ολικών χλωροφυλλών και τον υπολογισμό του λόγου chl_a/chl_b οδηγούσαν στο συμπέρασμα πως η εν λόγω προσαρμογή απαιτούσε 12h, προκειμένου να ολοκληρωθεί, οι μετρήσεις των παραμέτρων του επαγωγικού φθορισμού μείωναν το χρόνο προσαρμογής στις 6h.

Από τις δύο ερευνητικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό των μεταβολών του LHCII η μέτρηση των παραμέτρων του επαγωγικού φθορισμού υπερέχει ως προς την ταχύτητα των αποτελεσμάτων που δίνει, λόγω των φυσικοχημικών αλλαγών που λαμβάνει υπόψιν. Αντίθετα, δομικές αλλαγές ή αλλαγές στη σχέση chl_a/chl_b καθυστερούν χρονικά να γίνουν αντιληπτές, λόγω του μεγάλου ρυθμού μετατροπής των μορίων της χλωροφύλλης.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα της παρούσας σειράς πειραμάτων βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που προσδιορίζουν το χρόνο προσαρμογής των ευκαρυωτικών μικροφυκών στο υψηλό CO₂ σε διάστημα μικρότερο των 12h (Muller et al 1993, Dakanali 1999). Συνεπώς, η μείωση του LHCII στις καλλιέργειες του *Scenedesmus obliquus* εμφανιζόταν γρηγορότερα κατά την προσαρμογή του μικροφύκου στο 10% CO₂, παρά κατά τη διάρκεια ανάπτυξής του στην υψηλή συγκέντρωση του CO₂.

Η αύξηση της βιομάζας αποτελεί ίσως το χαρακτηριστικότερο και πιο εμφανές αποτέλεσμα της επίδρασης αυξημένων συγκεντρώσεων CO₂ πάνω στους φωτοσυνθέτοντες οργανισμούς. Η εν λόγω αύξηση οφείλεται στους μεγάλους ρυθμούς αναπνοής και φωτοσύνθεσης που παρουσιάζουν φυτικοί οργανισμοί αναπτυσσόμενοι σε υψηλό CO₂ σε σύγκριση με φυτικούς οργανισμούς που αναπτύσσονται σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις CO₂ (Stitt

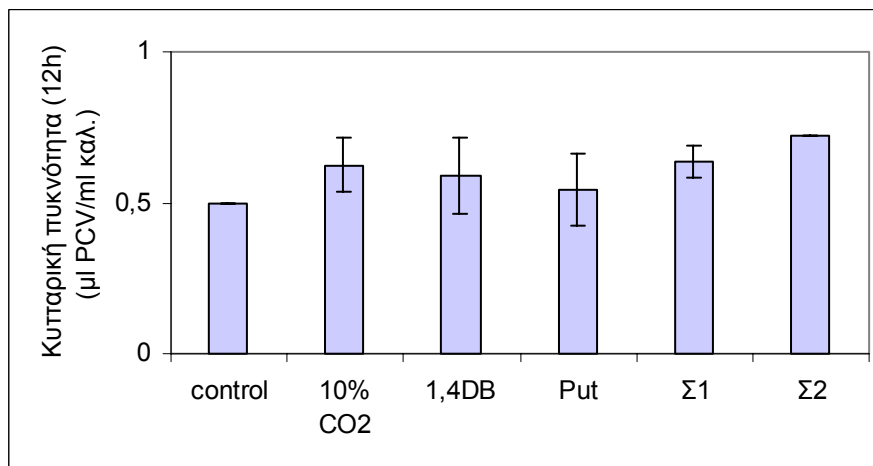
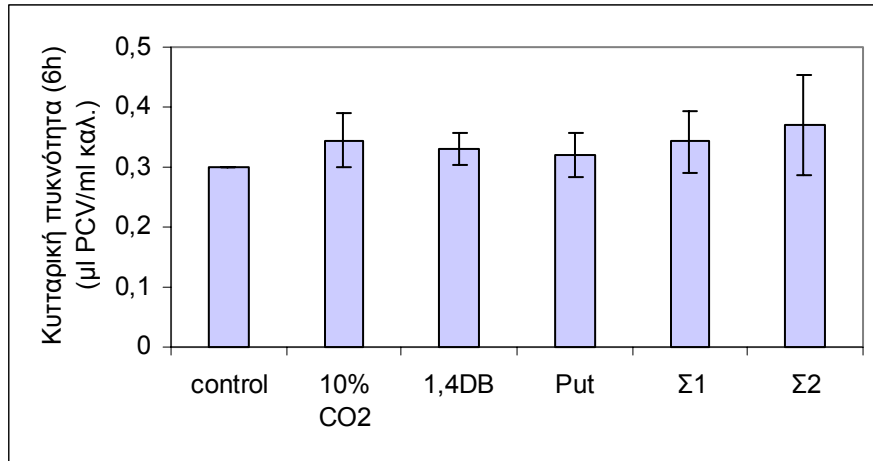
et al 1999). Η φωτοσυνθετική απόδοση από τη μεριά της θα μπορούσε να αναλυθεί σε δύο συνιστώσες: την απόδοση των φωτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης και την απόδοση των σκοτεινών αντιδράσεων. Η αλυσίδα των φωτεινών αντιδράσεων ξεκινά από την πρόσληψη της ηλιακής ενέργειας με τη μορφή φωτονίων από το LHCII και ολοκληρώνεται με την παραγωγή του αναγωγικού παράγοντα NADPH + H. Οι σκοτεινές αντιδράσεις είναι γνωστές και ως κύκλος του Calvin. Εδώ, τα μόρια του αναγωγικού παράγοντα, που προέκυψαν από τις φωτεινές αντιδράσεις, χρησιμοποιούνται μαζί με το προσλαμβανόμενο CO₂ για τη σύνθεση της 6 – φωσφορικής φρουκτόζης, του κύριου προϊόντος της φωτοσύνθεσης και απαραίτητου για τις μεταβολικές ανάγκες του κυττάρου. Για να έχει, συνεπώς, υψηλή απόδοση η φωτοσυνθετική διαδικασία τουλάχιστον τρεις προϋποθέσεις πρέπει να ισχύουν όσον αφορά στα επιμέρους τμήματα αυτής: Πρώτον, να υπάρχει συνεχής και ικανοποιητική ροή ηλεκτρονίων κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (φωτεινές αντιδράσεις), ώστε να παράγεται τελικά επαρκής ποσότητα αναγωγικής δύναμης, δηλαδή NADPH + H. Δεύτερον, η προσλαμβανόμενη ποσότητα CO₂ να είναι τέτοια, ώστε να αξιοποιείται στο έπακρον η αναγωγική δύναμη που προκύπτει από τις φωτεινές αντιδράσεις και να μη συσσωρεύεται. Έτσι, αποφεύγεται η συμφόρηση της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και επιπλέον παράγεται μεγάλος αριθμός μορίων 6 – φωσφορικής φρουκτόζης μέσω των σκοτεινών αντιδράσεων. Τρίτον, ο φωτοσυνθετικός οργανισμός είτε να αξιοποιεί την προκύπτουσα ποσότητα υδατάνθρακα για την αύξησή του είτε να διαθέτει ένα μηχανισμό ικανής και ασφαλούς αποθήκευσής του, ώστε να αποφεύγονται δυσάρεστες συνέπειες από τη συσσώρευση των σακχάρων (Sasek 1985).

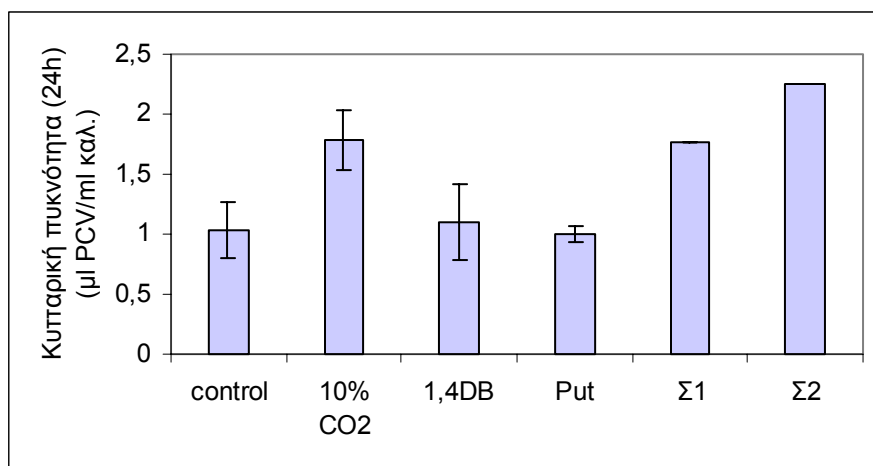
Στην περίπτωση των καλλιεργειών του *Scenedesmus obliquus* οι οποίες αναπτύχθηκαν σε αυξημένη συγκέντρωση CO₂ το μέγεθος του LHCII ήταν πολύ μικρό. Το γεγονός αυτό είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας των κυττάρων του *Scenedesmus obliquus* που αναπτυσσόταν (Fleischacker et al 1978, Senger et al 1987, Dakanali 1999). Η τελευταία έγινε αισθητή ως διαφορά στην αύξηση της βιομάζας της καλλιέργειας του μικροφύκου η οποία αναπτυσσόταν στο 10% CO₂ σε σύγκριση με εκείνη που αναπτυσσόταν στο 0,03% CO₂. Κατά συνέπεια, περαιτέρω μείωση του μεγέθους του LHCII στις καλλιέργειες του

Scenedesmus obliquus, ενδεχομένως να οδηγούσε σε μεγαλύτερη αύξηση της φωτοσυνθετικής απόδοσης και της παραγόμενης βιομάζας.

Πρόσφατες μελέτες (Andreadakis et al 1996, Doernemann et al 1996, Kotzabasis 1996) έχουν αποδείξει την εξάρτηση του μεγέθους του LHCII από το λόγο των ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων των πολυαμινών πουτρεσκίνης και σπερμίνης. Μάλιστα, έχει προταθεί πως ο λόγος των ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων της πουτρεσκίνης και της σπερμίνης (Put/Spm) συνδέεται με το μέγεθος του LHCII με σχέση αντίστροφα ανάλογη (Kotzabasis et al 1999b). Συνεπώς, εξωγενής επέμβαση στη σχέση Put/Spm με τη χορήγηση Put στο υγρό θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, θα έπρεπε να προκαλέσει μείωση στο μέγεθος του LHCII. Με τη βοήθεια της παραπάνω σχέσης " αντίστροφης " αναλογίας ανάμεσα στο λόγο Put/Spm και το μέγεθος του LHCII σχεδιάστηκε η ακόλουθη σειρά πειραμάτων, προκειμένου να διερευνηθεί η σχέση μεταξύ μίας περαιτέρω μείωσης του LHCII παρουσία υψηλής συγκέντρωσης CO₂ και της αύξησης στη βιομάζα του *Scenedesmus obliquus*: Έξι καλλιέργειες *Scenedesmus obliquus* τοποθετήθηκαν στους 28°C. Οι πρώτες τρεις καλλιέργειες συνδέθηκαν με σταθερή παροχή μίγματος αέρα περιεκτικότητας 0,03% σε CO₂. Στην πρώτη καλλιέργεια δεν προστέθηκε καμία άλλη ουσία πλην του αερίου μίγματος. Η συγκεκριμένη καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας (control) για τις περαιτέρω μελέτες. Στη δεύτερη καλλιέργεια χορηγήθηκε 1,4 DB (1,4 – διαμινο – 2 – βουτανόνη) σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Η εν λόγω ουσία λειτουργεί ως αναστολέας της βιοσύνθεσης της Put. Στην τρίτη καλλιέργεια χορηγήθηκε Put σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Οι υπόλοιπες τρεις καλλιέργειες συνδέθηκαν με σταθερή παροχή αερίου μίγματος εμπλουτισμένου με 10% CO₂. Στην τέταρτη καλλιέργεια δε χορηγήθηκε καμία ουσία, στην πέμπτη (καλλιέργεια Σ1) χορηγήθηκε 1,4 DB σε τελική συγκέντρωση 1 mM, ενώ στην έκτη (καλλιέργεια Σ2) χορηγήθηκε και Put σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Η αρχική συγκέντρωση κυττάρων σε κάθε καλλιέργεια ήταν ίση με 0,3μl PCV / ml καλλιέργειας, ενώ η επώαση διήρκεσε 24h. Από τις έξι καλλιέργειες ελήφθησαν δείγματα στις 6, 12 και 24h. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του PCV, την εκτίμηση του λόγου chl_a/chl_b και τον υπολογισμό των παραμέτρων του επαγωγικού φθορισμού για την κάθε καλλιέργεια σε καθένα από τα προκαθορισμένα χρονικά σημεία.

Η αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας για όλες τις καλλιέργειες σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσιάζεται στο σχήμα 18. Στον πίνακα 10 παρουσιάζεται η ποσοστιαία διαφορά στη βιομάζα καθεμίας από τις τρεις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν στο 10% CO₂ σε σύγκριση με το μάρτυρα στο τέλος της επώασης.





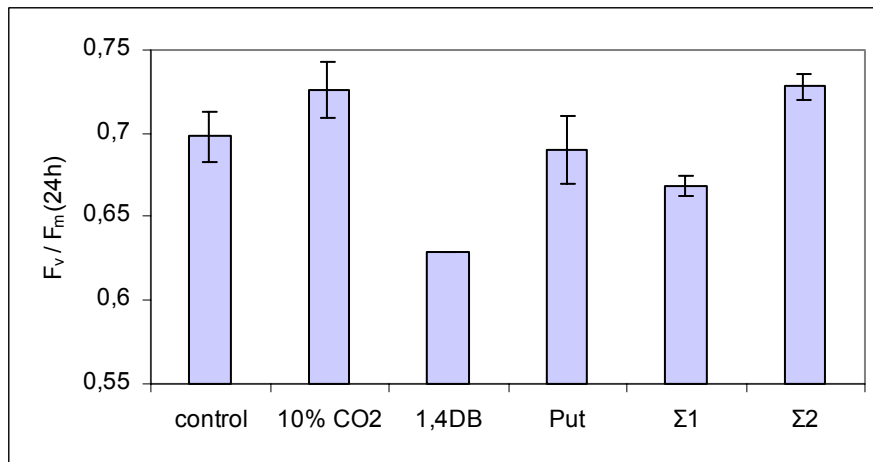
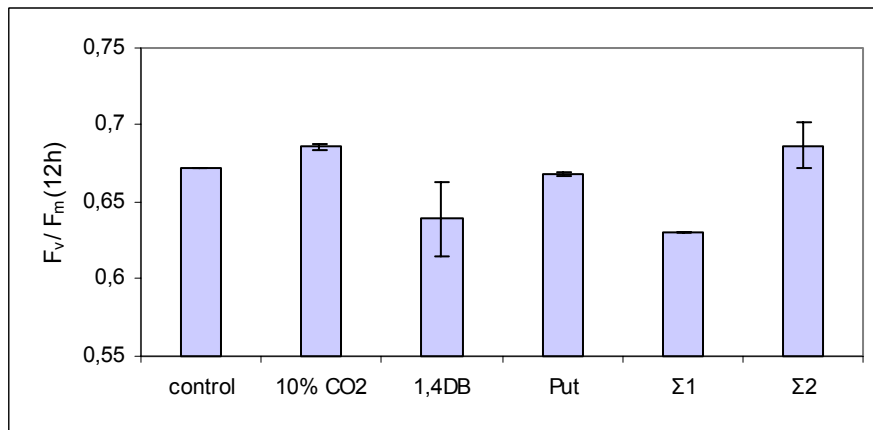
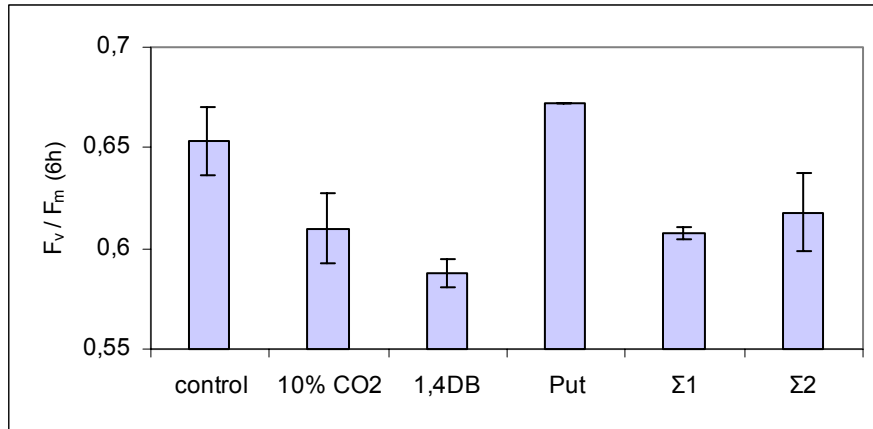
Σχήμα 18: Κυτταρική πυκνότητα των καλλιεργειών control, 10% CO₂, 1 mM 1,4DB, 1 mM Put, Σ1 (10% CO₂ / 1 mM 1,4DB) και Σ2 (10% CO₂ / 1 mM Put) στις 6, 12 και 24h από την εκκίνηση του πειράματος.

Πίνακας 10: Ποσοστιαία διαφορά στη βιομάζα των καλλιεργειών 10% CO₂, Σ1 και Σ2 σε σύγκριση με το control στο τέλος της επώασης.

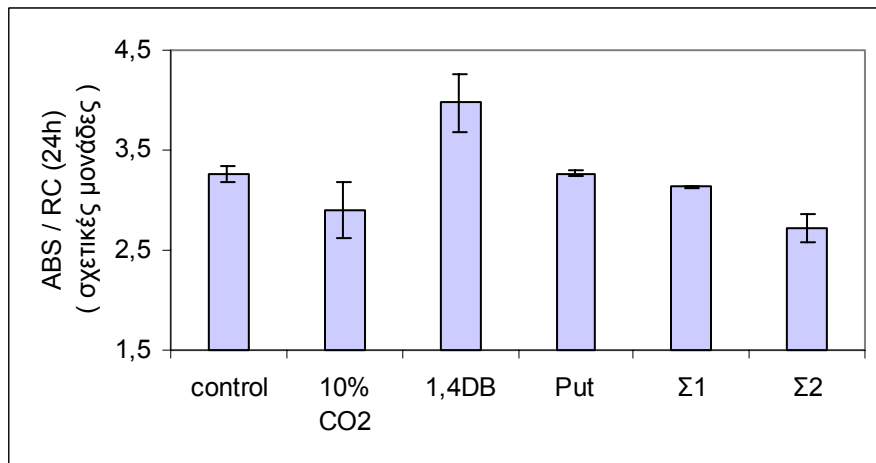
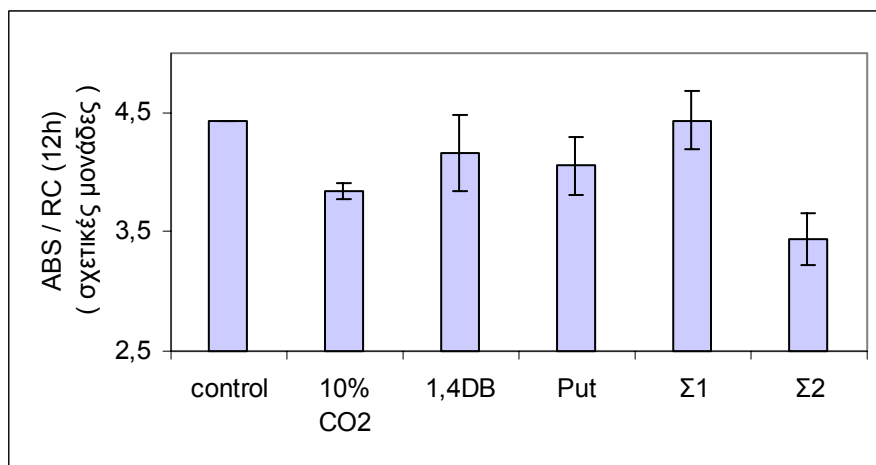
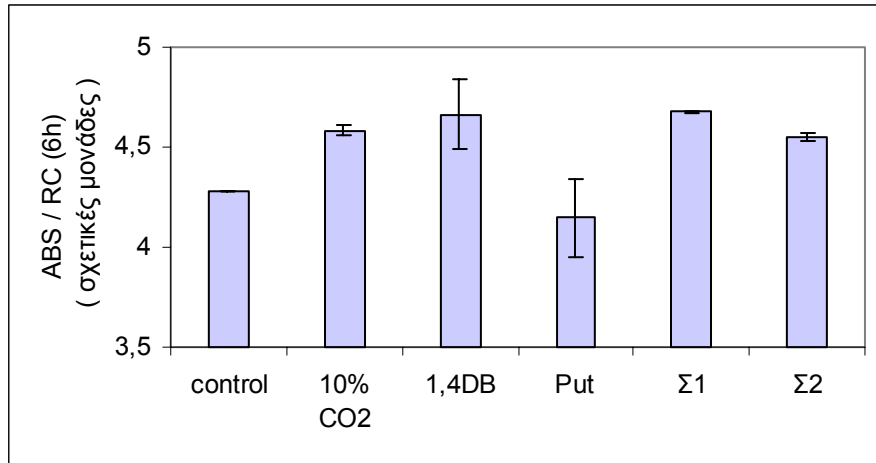
Καλλιέργεια	% διαφορά στη βιομάζα σε σύγκριση με το control
10% CO ₂	73
Σ1 (10% CO ₂ + 1mM 1,4DB)	72
Σ2 (10% CO ₂ + 1mM Put)	118

Από τη μελέτη των ανωτέρω αποτελεσμάτων προέκυψε πως με την πάροδο του χρόνου οι καλλιέργειες που αναπτύσσονταν στο 10% CO₂ παρουσίαζαν κλιμακούμενο ποσοστό αύξησης της βιομάζας τους σε σύγκριση με το μάρτυρα. Από τις τρεις αυτές καλλιέργειες (10% CO₂, Σ1 και Σ2) η καλλιέργεια με την ταυτόχρονη χορήγηση 10% CO₂ και 1mM Put (Σ2) παρουσίαζε τη μεγαλύτερη διαφορά βιομάζας με το μάρτυρα σε σύγκριση με οποιαδήποτε άλλη καλλιέργεια στο τέλος της επώασης.

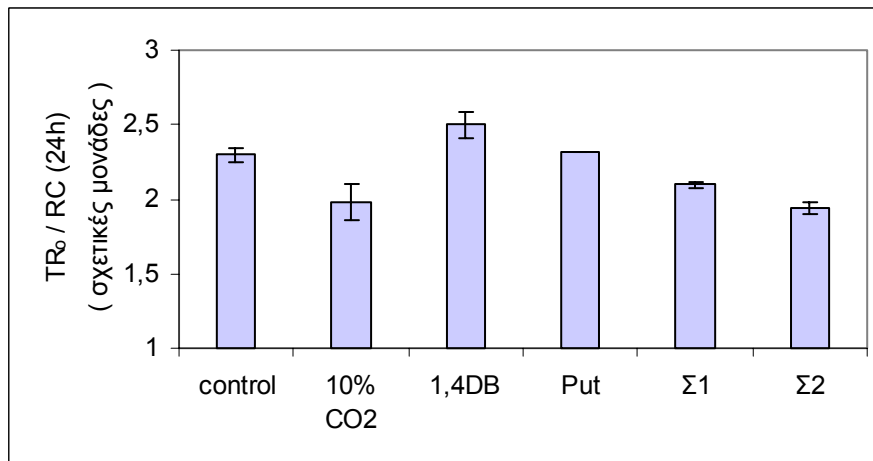
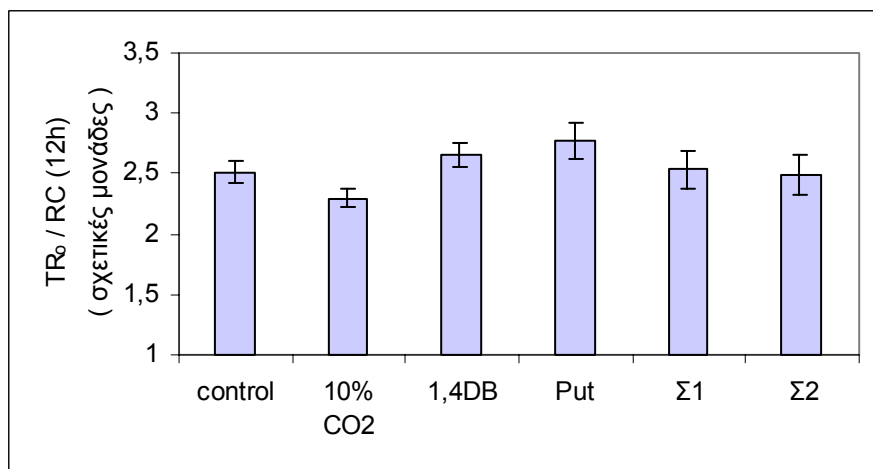
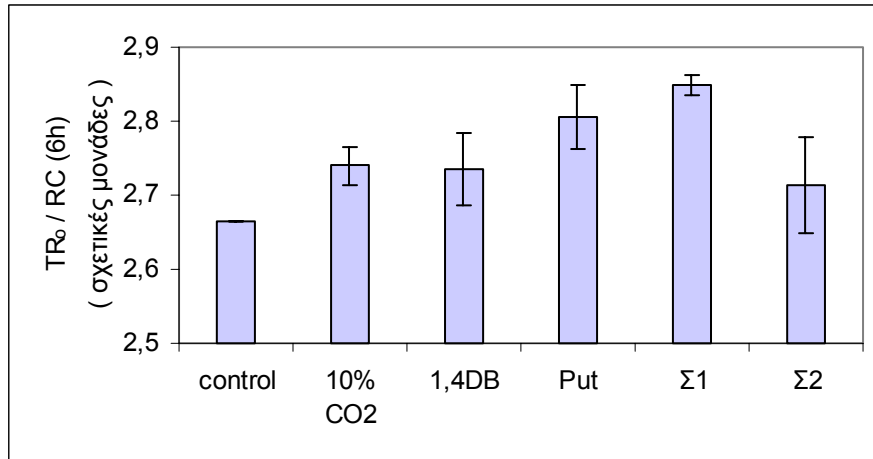
Ακολούθως, ελήφθησα μετρήσεις των παραμέτρων Φ_{po} , ABS/RC, TR_o/RC, DI_o/RC και D_o του επαγωγικού φθορισμού. Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις των παραμέτρων Φ_{po} , ABS/RC, TR_o/RC, DI_o/RC και D_o για τις έξι καλλιέργειες στις χρονικές στιγμές 6, 12 και 24h παρουσιάζονται στα σχήματα 19, 20, 21, 22 και 23, αντίστοιχα.



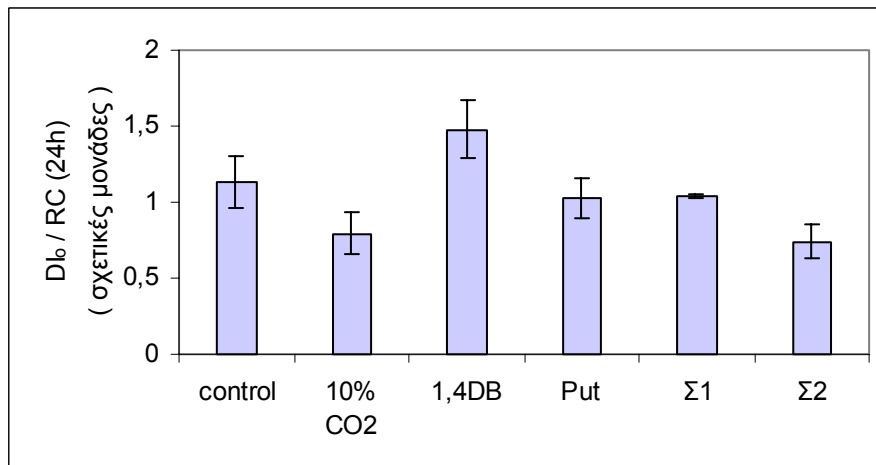
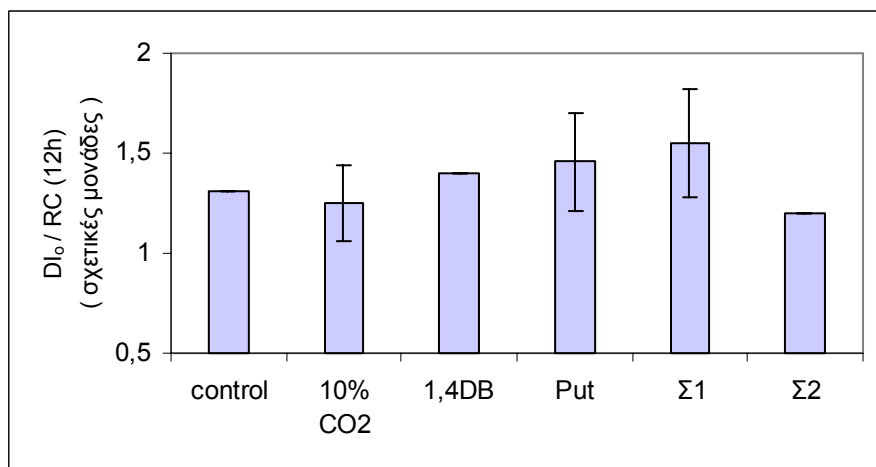
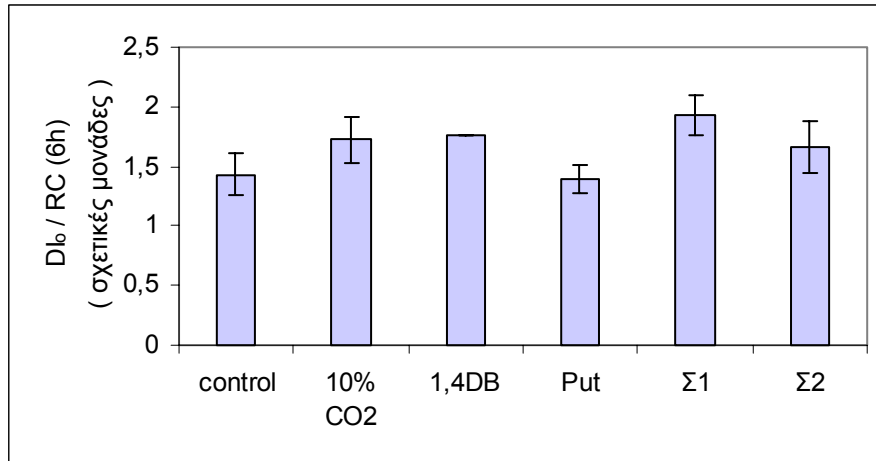
Σχήμα 19: Μέγιστη φωτοχημική απόδοση Φ_{po} (F_v/F_m) των καλλιεργειών control, 10% CO₂, 1 mM 1,4DB, 1 mM Put, Σ1 (10% CO₂/ 1 mM 1,4DB) και Σ2 (10% CO₂/ 1 mM Put) στις 6, 12 και 24h από την εκκίνηση του πειράματος.



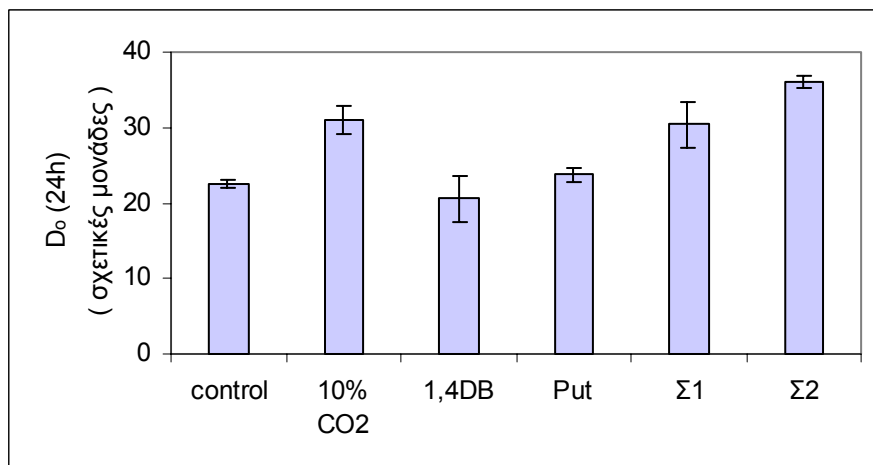
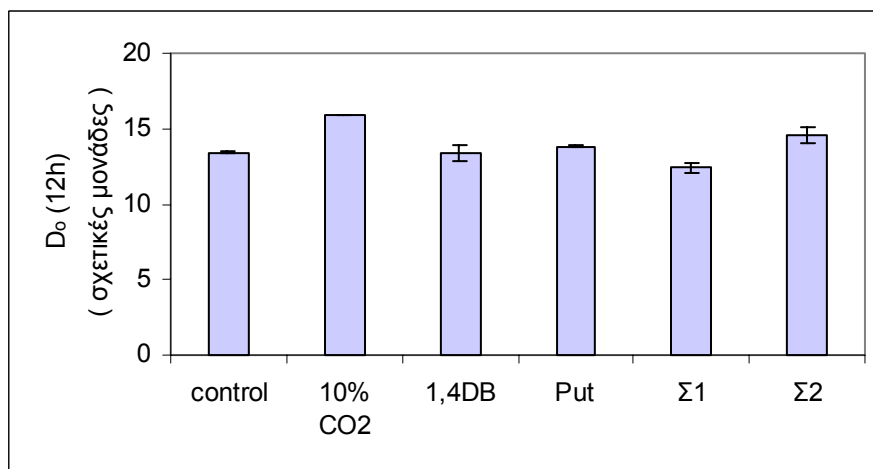
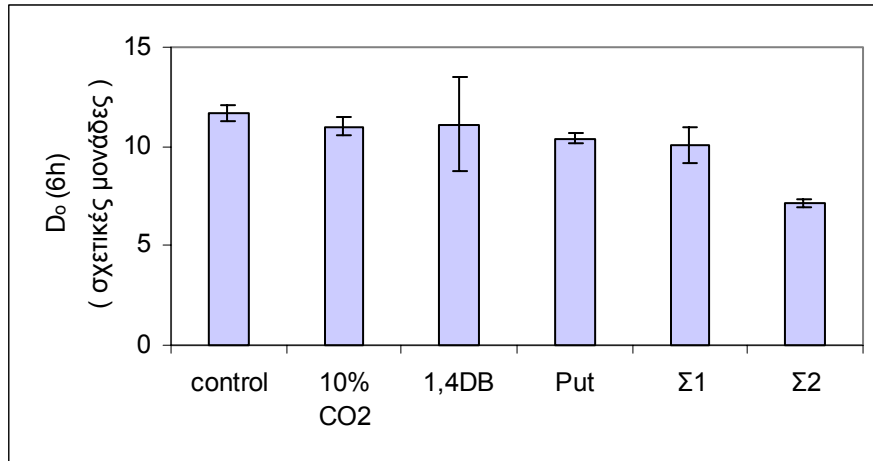
Σχήμα 20: Απορρόφηση ηλιακής ενέργειας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (ABS/RC) των καλλιεργειών control, 10% CO₂, 1 mM 1,4DB, 1 mM Put, Σ1 (10% CO₂ / 1 mM 1,4DB) και Σ2 (10% CO₂ / 1 mM Put) στις 6, 12 και 24h από την εκκίνηση του πειράματος.



Σχήμα 21: Παγίδευση ενέργειας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (TR₀/RC) στις καλλιέργειες control, 10% CO₂, 1 mM 1,4DB, 1 mM Put, Σ1 (10% CO₂ / 1 mM 1,4DB) και Σ2 (10% CO₂ / 1 mM Put) στις 6, 12 και 24h από την εκκίνηση του πειράματος.



Σχήμα 22: Απώλειες ενέργειας με τη μορφή διάχυσης ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (D_{lo}/RC) από τις καλλιέργειες control, 10% CO₂, 1 mM 1,4DB, 1 mM Put, Σ1 (10% CO₂/ 1 mM 1,4DB) και Σ2 (10% CO₂/ 1 mM Put) στις 6, 12 και 24h από την εκκίνηση του πειράματος.



Σχήμα 23: Πυκνότητα των “ ανοικτών ” ενεργών κέντρων αντίδρασης (D₀) στις καλλιέργειες control, 10% CO₂, 1 mM 1,4DB, 1 mM Put, Σ1 (10% CO₂ / 1 mM 1,4DB) και Σ2 (10% CO₂ / 1 mM Put) στις 6, 12, και 24h από την εκκίνηση του πειράματος.

Όπως διαπιστώθηκε από το σχήμα 19, η τιμή της Φ_{po} της καλλιέργειας Σ2 από τις 12h μέχρι και την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας ήταν μεγαλύτερη από κάθε άλλης καλλιέργειας. Αυτό σήμαινε πως χάρη στο συνδυασμό 10% CO_2 και 1 mM Put τα κύτταρα του *Scenedesmus obliquus* παρουσίασαν το μεγαλύτερο βαθμό φωτοχημικής απόδοσης. Δηλαδή εκμεταλλεύτηκαν περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη καλλιέργεια την προσληφθείσα μέσω της φωτοσυλλεκτικής τους κεραίας ηλιακή ενέργεια. Η διαπίστωση αυτή αποτέλεσε μία ένδειξη για τη μείωση του LHCII στην καλλιέργεια Σ2. Όσον αφορά τις φωτοχημικές αποδόσεις των υπόλοιπων καλλιεργειών στο τέλος της επώασης, αμέσως μετά τη Σ2 ακολουθούσαν σε απόδοση η 10% CO_2 και η Σ1. Η παρατήρηση αυτή αποτέλεσε ένδειξη πως το μέγεθος του LHCII της καλλιέργειας Σ2 ήταν μικρότερο τόσο από το αντίστοιχο της Σ1 όσο και από εκείνο της 10% CO_2 .

Περισσότερο διαφωτιστικά, ωστόσο, για τη συγκεκριμένη σχέση ήταν τα αποτελέσματα από τη μέτρηση της παραμέτρου ABS/RC. Όπως διαπιστώθηκε από το σχήμα 20 μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας το μέγεθος του LHCII στις καλλιέργειες 10% CO_2 , Σ1 και Σ2 ήταν μικρότερο από το αντίστοιχο του μάρτυρα. Όσον αφορά στις τρεις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν με χορήγηση μίγματος αέρα περιεκτικότητας 10% σε CO_2 , η καλλιέργεια Σ2 χάρη στην παροχή της Put παρουσίασε το μικρότερο LHCII, ενώ ακολουθούσε η 10% CO_2 . Ελαφρώς μεγαλύτερο ήταν το LHCII της καλλιέργειας Σ1, χάρη στην εξισορροπητική δράση του 1,4 DB. Η παρουσία του αντιμαχόταν τη δράση της υψηλής συγκέντρωσης CO_2 και εμπόδιζε το LHCII να συρρικνωθεί τόσο όσο στις καλλιέργειες 10% CO_2 και Σ2. Άλλωστε, το τελευταίο περιορίζει τη βιοσύνθεση της Put, ελαττώνει την τιμή του λόγου Put/Spm και κατά συνέπεια οδηγεί σε αύξηση του μεγέθους του LHCII (Kotzabasis 1996). Αυτός ήταν και ο λόγος για τον οποίο η καλλιέργεια με το 1 mM 1,4 DB είχε μεγαλύτερο LHCII από το αντίστοιχο του μάρτυρα.

Προς ενίσχυση της συγκεκριμένης διαπίστωσης ήρθαν και οι παρατηρήσεις από τις παραμέτρους TR_0/RC και DI_0/RC . Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, η καλλιέργεια Σ2 παρουσίαζε το χαμηλότερο ποσό ενέργειας που παγιδευόταν από τα ενεργά κέντρα αντίδρασης των κυττάρων της (TR_0/RC), δείγμα της μικρής φωτοσυλλεκτικής κεραίας που διέθεταν τα κύτταρά της. Ωστόσο, τα κύτταρα της καλλιέργειας Σ2 παρουσίαζαν και χαμηλότερη τιμή DI_0/RC , καθώς οι ενεργειακές τους

απώλειες ήταν μειωμένες σε μεγάλο βαθμό. Και αυτό, διότι χάρη στο μικρό μέγεθος του LHCII των κυττάρων της Σ2 η ηλιακή ακτινοβολία που προσλαμβάνονταν από το φωτοσυνθετικό μηχανισμό ήταν πολύ μικρή. Κατά συνέπεια, προωθείτο ομαλά κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, η οποία δεν αντιμετώπιζε προβλήματα συμφόρησης. Ο ομαλός ρυθμός παροχής ηλεκτρονίων και στα ενεργά κέντρα αντίδρασης των κυττάρων της καλλιέργειας Σ2 είχε ως αποτέλεσμα ελάχιστα από αυτά να απενεργοποιούνται. Ως αποτέλεσμα, η καλλιέργεια Σ2 παρουσίαζε και μεγαλύτερη συγκέντρωση ενεργών κέντρων αντίδρασης ανάμεσα στις έξι καλλιέργειες του πειράματος.

Συνολικά, τα αποτελέσματα από τη συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων κατέδειξαν τη συνεργιστική δράση της Put και της παροχής CO₂ στις υγρές καλλιέργειες του *Scenedesmus obliquus*. Η σμίκρυνση του LHCII, η οποία προκλήθηκε στην καλλιέργεια με την ταυτόχρονη χορήγηση CO₂ και Put σε μεγαλύτερο βαθμό από οποιαδήποτε άλλη καλλιέργεια, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της φωτοσυνθετικής και της εν γένει απόδοσης της καλλιέργειας. Η τελευταία αύξηση έγινε εμφανής κυρίως με τη μορφή της αύξησης στη βιομάζα της καλλιέργειας. Αξίζει να αναφερθεί πως ενώ στις 24h η ποσοστιαία διαφορά της βιομάζας της καλλιέργειας 10% CO₂ και του μάρτυρα ήταν 73%, στην περίπτωση που στην καλλιέργεια του *Scenedesmus obliquus* χορηγήθηκαν 10% CO₂ και 1 mM Put η ποσοστιαία διαφορά της βιομάζας ανάμεσα στην καλλιέργεια Σ2 και το control βρισκόταν στο 118%.

Ωστόσο, η συγκεκριμένη διαπίστωση δεν μπορεί ακόμα να τεθεί σε εφαρμογή στα πλαίσια μίας ευρύτερης κλίμακας ανάπτυξης καλλιεργειών μονοκύτταρων ευκαρυωτικών φυκών. Τουλάχιστον όχι πριν εξεταστούν συγκεκριμένες ακόμα παράμετροι. Και αυτό διότι στην αξιοποίηση της παρεχόμενης ποσότητας CO₂ συμμετέχουν ένας αριθμός αλληλοσυνδεόμενων μεταβολικών διαδικασιών οι οποίες πρέπει να βρίσκονται σε διαρκή συνεργασία, ώστε τα ευεργετικά αποτελέσματα από την παροχή υψηλής συγκέντρωσης CO₂ να μην είναι προσωρινά (Stitt et al 1999). Συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί πως φυτικοί ευκαρυωτικοί οργανισμοί εκτεθειμένοι σε υψηλές συγκεντρώσεις CO₂ δεν παρουσιάζουν διάρκεια στην αύξηση της φωτοσυνθετικής τους απόδοσης. Μετά από κάποιο χρονικό διάστημα, μάλιστα, το οποίο κυμαίνεται από μέρες έως εβδομάδες, η

κατάσταση αντιστρέφεται (Bowes 1996), καθώς η φωτοσυνθετική απόδοση πέφτει σε τιμές παρόμοιες με τις αντίστοιχες φυτών που αναπτύσσονται σε κανονικές συγκεντρώσεις CO₂. Τα παραγόμενα από τον κύκλο του Calvin σάκχαρα δεν επενδύονται στην αύξηση της κυτταρικής βιομάζας, αλλά συσσωρεύονται στο εσωτερικό των κυττάρων με τη μορφή αποταμιευτικού αμύλου (Sasek et al 1985) . Το τελευταίο γεγονός μπορεί πολλές φορές να προκαλέσει σοβαρότατες καταπονήσεις στα κύτταρα, καθώς οι ογκώδεις αμυλόκοκκοι είναι υπεύθυνοι για την αποσταθεροποίηση και βλάβη των χλωροπλαστικών δομών. Σημείο – κλειδί για την αποφυγή τέτοιας φύσης προβλημάτων αποτελεί ο έλεγχος του μεταβολισμού άλλων σημαντικών για τη λειτουργία των φυτικών κυττάρων στοιχείων. Αναλυτικότερα, έχει διαπιστωθεί η άμεση αλληλεξάρτηση των μεταβολισμών των στοιχείων C και N (Stitt et al 1999). Η ύπαρξη επαρκούς ποσότητας N στο εσωτερικό του φυτικού κυττάρου συντελεί στην επένδυση των παραγόμενων από τις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης σακχάρων για τη σύνθεση οργανικής ύλης η οποία επενδύεται στην κυτταρική αύξηση και τον πολλαπλασιασμό. Έτσι, αποφεύγεται ο σχηματισμός αμυλόκοκκων και η αναγωγική ενέργεια χρησιμοποιείται για τη δημιουργία βιομάζας.

Όπως γίνεται αντιληπτό, η εκπόνηση μελετών για τον καθορισμό του ρυθμού παροχής N και του είδους της πηγής N που θα χρησιμοποιηθεί είναι δύο από τα σημαντικά βήματα που απαιτούνται για το σχεδιασμό μίας ικανοποιητικής σε διάρκεια απόδοσης καλλιεργητικής διάταξης, όπου στα καλλιεργούμενα κύτταρα θα παρέχονται σε σταθερή βάση μεγάλη συγκέντρωση CO₂ και συγκεκριμένη ποσότητα N. Προς τη συγκεκριμένη κατεύθυνση η ερευνητική πορεία μόλις πρόσφατα άρχισε να στρέφεται (Giordano 2001). Για τον ίδιο λόγο κρίνεται σκόπιμη και η εκπόνηση μίας παρόμοιου περιεχομένου μελέτης για τον προσδιορισμό του ρυθμού απορρόφησης της παρεχόμενης στις καλλιέργειες ποσότητας Put. Με την όσο το δυνατόν προσεκτικότερη και ακριβέστερη προσέγγιση των συγκεκριμένων παραμέτρων θα καταστεί εφικτός ο σχεδιασμός καλλιεργητικών διατάξεων μονοκύτταρων ευκαρυωτικών φυκών, όπου ο μεγάλος ρυθμός αύξησης των καλλιεργούμενων φυκών χάρη στην επίδραση υψηλής συγκέντρωσης CO₂ θα χαρακτηρίζεται από διάρκεια, αυξάνοντας σημαντικά τη συνολική απόδοση.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης ερευνητικής προσπάθειας θα μπορούσαν να συνοψισθούν στα παρακάτω συμπεράσματα:

(α) Αυξημένες συγκεντρώσεις CO₂ αλλάζουν τη δομή και τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μονοκύτταρου ευκαρυωτικού φύκου *Scenedesmus obliquus* και κατ' επέκταση αυξάνουν κατακόρυφα τη βιομάζα.

(β) Η μείωση του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (LHCII) και η αύξηση της πυκνότητας των ενεργών κέντρων αντίδρασης (RC) στο μονοκύτταρο ευκαρυωτικό φύκος *Scenedesmus obliquus* είναι μία από τις κυριότερες αποκρίσεις του στην πορεία προσαρμογής του φωτοσυνθετικού του μηχανισμού σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη σε CO₂. Η προσαρμογή αυτή φαίνεται να εξυπηρετείται από τη μείωση του αριθμού των τριμερών μορφών και την αύξηση του αριθμού των μονομερών μορφών του LHCII.

(γ) Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός χαρακτηρίζεται από μεγάλη προσαρμοστικότητα απέναντι στις αλλαγές της συγκέντρωσης του CO₂. Η προσαρμογή του σε αυξήσεις ή μειώσεις της συγκέντρωσης CO₂ είναι πολύ γρήγορη (6 – 12h). Το ίδιο ισχύει και σε περιπτώσεις αναστροφής της.

(δ) Ο λόγος των ενδοκυτταρικών ποσοτήτων των πολυαμινών πουτρεσκίνης και σπερμίνης (Put/Spm) αποτελεί σημείο – κλειδί στη ρύθμιση του μεγέθους του LHCII, καθώς οι μεταβολές στη σχέση Put/Spm συνδέονται με αντίστροφα ανάλογες μεταβολές στο μέγεθος του LHCII. Η εξωγενής χορήγηση Put στις καλλιέργειες του *Scenedesmus obliquus* ενισχύει την επίδραση της αυξημένης συγκέντρωσης του CO₂ στη δομή και τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και κατ' επέκταση στην αύξηση της βιομάζας. Με την περαιτέρω μείωση του μεγέθους του LHCII και την αύξηση της πυκνότητας των ενεργών κέντρων αντίδρασης αυξήθηκε η φωτοσυνθετική απόδοση των κυττάρων και πολλαπλασιάστηκε ο ρυθμός αύξησης της βιομάζας τους σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που αναπτύσσονταν μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις CO₂.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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 ".

Argyroudi – Akoyunoglou, J.H., Thomou, H.(1981): " Separation of thylakoid pigment – protein complexes by SDS – sucrose density gradient centrifugation ". FEBS Letters 135: 177 – 181.

Basi, R., Rigoni, F., Giacometti, G.M. (1990): " Chlorophyll binding proteins with antenna function in higher plants and green algae ". Photochemistry and Photobiology 52: 1187 – 1206.

Bassi, R., Sandona, D., Croce, R. (1997): " Novel aspects of chlorophyll a/b – binding proteins ". Physiologia Plantarum "100: 769 – 779.

Besford, R.T. (1990): " The greenhouse effect: Acclimation of tomato plants growing in high CO₂. Relative changes in carbon cycle enzymes ". Plant Physiology vol. 136, pp 458 – 463.

Besford, R.T., Richardson, C., Campos, J., Tiburcio, A.F. (1993): " Effect of polyamines on stabilization complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves ". Planta 189: 201 –206.

Bishop, N.I., Senger, H. (1971): " Preparations and photosynthetic properties of synchronous cultures of *Scenedesmus* ". In Methods in enzymology 23: 53 – 66.

Bjorkman, O. (1972): " Photosynthetic adaptation to contrasting light climates ". Carnegie Institute Year Book 71: 81 – 85.

Bowes, G. (1993): " Facing the inevitable: Plants and increasing atmospheric CO₂ ". Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 44: 309 – 332.

Bowes, G. (1996): " Photosynthetic responses to changing atmospheric carbon dioxide concentration ". In Neil R. Baker (ed): Photosynthesis and the Environment, Kluwer Academic Publishes (NL), pp 387 – 407.

Bradford, M. (1976): " A rapid and sensitive method for the estimation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding ". Analytical Biochemistry 72: 248 – 254.

Brow, J.S. (1988): " Photosynthetic pigment organization in diatoms (Bacillariophyceae) ". Journal of Phycology 24: 96 – 102.

Bulhar – Nordenkampf, H.R. and Oquist, G. (1993): " Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research ". In Photosynthesis and Production in a Changing Environment: a field and laboratory manual. D.O. Hall, J.M.O. Scurlock H.R. Bulhar – Nordenkampf, R.C. Leegood, S.P. Long (ed). Chapman and Hall, London. pp 193 – 206.

Dakanali, S. (1999): " Επίδραση της συγκέντρωσης του ατμοσφαιρικού CO₂ στη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού μικροφυκών – Βιοτεχνολογικές προοπτικές ". Εργασία για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης, Εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Demmig – Adams, B., Adams, W.W. III (1992): " Carotenoid composition in sun and shade leaves of plants with different life forms ". Plant, Cell and Environment 15: 411 – 419.

Doernemann, D., Navakoudis, E. and Kotzabasis, K. (1996): " Changes in the polyamine content of plastidal membranes in light – and dark – grown wild type and pigment mutants of the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus* and their possible role in chloroplast photodevelopment ". *Journal of Photochemistry and Photobiology* 36: 293 – 299.

Dreyfuss, B.W., Thornber, J.P. (1994): " Assembly of the Light - Harvesting Complexes (LHCs) of Photosystem II: Monomeric LHCII_b Complexes are intermediates in the formation of oligomeric LHCII_b Complexes ". *Plant Physiology* 106: 829 – 839.

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.

Furuya, 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.

Gaffron, H. (1939): " Der auffallende Unterschied in den Physiologie nahe verwandter Algenstaemme nebst Berkungen uber die Lichtatmung ". *Biologische Zentralblatt* 59: 302 – 312.

Giordano, M. (2001): " Interactions between C and N metabolism in *Dunaliella salina* cells cultured at elevated CO₂ and high N concentrations". *Journal of Plant Physiology* 158: 577 – 581.

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* Vol 10, n 3, pp 255 – 260.

Harisson, M.A. and Melis. A. (1992): " Organization and stability of polypeptides associated with the chlorophyll a-b light – harvesting complex of photosystem II ". *Plant Cell Physiology* 33(5): 627 – 637.

Hobe, S., Kuttkat, A., Foerster, R., Paulsen, H. (1995): " Assembly of trimeric light – harvesting chlorophyll a/b complex *in vitro* ". *In Photosynthesis: from light to Biosphere*. P. Mathis (ed.), Kluwer Academic Publishes (NL), Vol. I., pp. 27 – 52.

Holden, M. (1995): " Chlorophylls ". *In Chemistry and Biochemistry of plant pigments*. pp. 461 – 488.

Hunt, R., Hand, D.W., Hannah, M.A., Neal, A.M.(1991): " Response to CO₂ enrichment in 27 herbaceous species ". *Functional Ecology* 5: 410 – 421.

Huxman, T.E., Hamerlynck, E.P., Loik, M.E., Smith, S.D. (1998): " Gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of three southwestern *Yucca* species to elevated CO₂ and high temperature ". *Plant Cell and Environment* 21: 1275 – 1283.

Jones, C., Hare, D., Compton,S. (1989): " Measuring plant protein with Bradford assay. Evaluation and standard method ". *Journal of Chemical Ecology* 15 (3): 979 – 992.

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., Philadelphia, Vol V, pp 559 – 580.*

Kasemir, H. (1983): " Light control of chlorophyll accumulation in higher plants ". *In Encyclopedia of Plant Physiology*. W., Jr., Shrophire, H. Mohr, Spinger – Verlang, Berlin, Vol. 16B, pp 662 – 686.

Kautsky, H., Hirsch, A. (1931): " Neue Versuche zur Kohlensauereassimilation ". *Naturwissenschaften* 19: 964.

Kimball, B.A. (1983): " Carbon dioxide and agricultural yield: an assemblage and analysis of 430 prior observations ". *Agronomical Journal* 75: 779 – 788.

Kotzabasis, K. (1996): " A role for chloroplast associated polyamines ". *Botanica Acta* 109: 5 -7.

Kotzabasis, K. and Senger, H. (1994): " Free, conjugated and bound polyamines during the cell cycle in photosynchronized cultures of *Scenedesmus obliquus* ". *Zeitschrift für Naturforschung* 49(c): 181 – 185.

Kotzabasis, K., Fotinou, C., Roumpelakis – Angelakis, K.A., Ghanotakis, D. (1993): " Polyamines in the photosynthetic apparatus. Photosystem II highly resolved subcomplexes are enriched in spermine ". *Photosynthesis Research* 38: 83 – 88.

Kotzabasis, K., Strasser, B., Navakoudis, E., Senger, H., Doernemann, D. (1999): " The regulatory role of polyamines on the structure and functioning of the photosynthetic apparatus during photoadaptation ". *Journal of Photochemistry and Photobiology (B)* 50: 42 – 52.

Kramer, J.P. (1981): " Carbon dioxide concentration, photosynthesis and dry matter production ". *Bioscience* Vol. 31, n 1: 29 – 33.

Kuttkat, A., Edhofer, I., Eichacker, L., Paulsen, H. (1995): " Assembly of light – harvesting chlorophyll a/b protein in isolated thylakoid and prothylakoid membranes ". *In* *Photosynthesis: from Light to Biosphere*. P. Mathis, Kluwer Academic Publishes, Vol. I., pp 47 – 52.

Kühlbrandt, W., Wang, D.N., Fujiyoshi, Y. (1991): " Atomic model of plant light – harvesting complex by electron crystallography ". *Nature* 367: 614 – 621.

Kühlbrandt, W., Wang, D.N., Fujiyoshi, Y. (1994): " Atomic model of plant light – harvesting complex by electron crystallography ". *Nature* 350: 130 – 134.

Lazar, D. (1999): " Chlorophyll a fluorescence induction ". *Biochimica et Biophysica Acta* 1412: 1 – 28.

Lichtenthaler, H.K. (1992): " The Kautsky effect: 60 years of chlorophyll fluorescence induction kinetics ". *Photosynthetica* 27 (1-2): 45 – 55.

Makino, A., Harada, M., Sato, T., Nakano, H., Mae, T. (1997): " Growth and N allocation in Rice plants under CO₂ enrichment ". *Plant Physiology* 115: 199 – 203.

McElroy, M.B. (1994): " Climate of the earth: an overview ". *Environmental pollution* 83: 3 – 21.

Medlyn, B.E., Badeck, E.W., DePury, D.G.G., Barton, C.V.M., Broadmeadow, M., Ceulemans, R., De Angelis, P.D., Forstreuter, M., Jach, M.E., Kellomaki, S., Laitat, E., Marek, M., Philippot, S., Rey, A., Strassemeier, J., Laitinen, K., Liozon, R., Portier, B., Roberntz, P., Wang, K., Jarvis, P.G. (1999): " Effects of elevated [CO₂] on photosynthesis in European forest species: a meta – analysis of model parameters ". *Plant, Cell and Environment* 22: 1475 – 1495.

Moore, B.D., Cheng, S.H., Rice, J., Seeman, R.T. (1998): " Sucrose cycling, RubisCO expression and prediction of the photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂ ". *Plant, Cell and Environment* 21: 905 – 915.

Muller, C., Reuter, W., Wehnemeyer, W., Dan, H., Senger, H. (1993): " Adaptation of the photosynthetic apparatus from *Anacystis nidulam* to irradiance and CO₂ concentration ". *Botanica Acta* Vol 106, n 6, pp 480.

Nie, G.Y., Long, S.P.(1992): " The effect of prolonged growth in elevated CO₂ concentrations in the field on the amounts of different leaf proteins ". *In* Research in photosynthesis IV, N., Murata (ed.) Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, pp 855 – 858.

Nie, G.Y., Long, S.P., Garcia, R.L., Kimball, B.A., Lamorte, R.L., Pinter, P.J., Wall, G.W., Webber, A.N. (1995): " Effects of free – air CO₂ enrichment on the development of the photosynthetic apparatus in wheat, as indicated by changes in leaf proteins ". *Plant, Cell and Environment* 18: 855 – 864.

Nussberger, S., Doerr, K., Wang, D.N., Kühlbrandt, W. (1993): " Lipid – protein interactions in crystals of plant light – harvesting complex". *Journal of Molecular Biology* 234: 347 – 356.

Paulsen, H., Fikenzeller, B., Kuhlein, N. (1993): " Pigments induce folding of light – harvesting chlorophyll a/b – binding protein ". *European Journal of Biochemistry* 215: 809 – 816.

Peter, G.F., Thornber, J.P. (1991a): " Biochemical composition and organization of higher plant Photosystem II light – harvesting pigment – proteins ". *Journal of Biological Chemistry* 266: 16745 – 16754.

Plumley, F.G., Marinson, T.A., Herrin, D.L., Ideuchi, M., Schmidt, G.W. (1993): " Structural relationships of the photosystem I and photosystem II chlorophyll a/b and a/c light – harvesting apoproteins of plants and algae ". *Photochemistry and Photobiology* 57: 143 – 151.

Plumley, F.G., Schmidt, G.W. (1987): " Reconstitution of Chl a/b light harvesting complexes: xanthophylls dependent assembly and energy transfer ". *PNAS USA* 84: 146 – 150.

Raymont, J.E.G. (1980): " Plankton and productivity in the Oceans ". 2nd edition. Volume 1 Phytoplankton. Pergamon International Library. p. 494.

Remy, R., Tremollieres, A., Ambard – Breteville (1984): " Formation of oligomeric light – harvesting chlorophyll a/b protein by interaction between its monomeric form and liposomes ". *Photobiochemistry, Photobiophysics* 7: 267 – 276.

Ross, C.W., Salisbury, F.B.(1992): " Plant Physiology ". 4th edition. Wadsworth Publishing Company, Belmont California.

Sage, R.F. (1994): " Acclimation of photosynthesis to increasing atmospheric CO₂: the gas exchange perspective ". *Photosynthesis Research*.

Sasek, T.W., Delucia, E., Strain, B.R. (1985): " Reversibility of photosynthetic inhibition in Cotton after long - term exposure to elevated CO₂ concentrations ". *Plant Physiology* 78: 619 – 622.

Senger, H., Bauer, B.(1987): " Influence of light quality on adaptation and function of the photosynthetic apparatus ". *Photochemistry and Photobiology* 45: 539 – 545.

Senger, H., Fleischhacker, Ph. (1978): " Adaptation of the photosynthetic apparatus of *Scenedesmus obliquus* to strong and weak light conditions. I. Differences in pigments, photosynthetic capacity, quantum yield and dark reactions ". *Physiologia Plantarum* 43: 35 – 42.

Simidjiev, I. Barzda, V., Must rdy, L., Garab, G. (1998): " Role of thylakoid lipids in the structural flexibility of lamellar aggregates of the isolated light – harvesting Chlorophyll a/b Complex of Photosystem II ". *Biochemistry* 37: 4169 – 4173.

Stitt, M. (1991): " Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells ". *Plant, Cell and Environment* 14: 741 – 762.

Stitt, M., Krapp, A. (1999): " The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiology and molecular background ". *Plant, Cell and Environment* 22: 583 – 621.

Strasser, B.J., Strasser, R.J.(1995): " Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test ". *In* P. Mathis (ed.): *Photosynthesis, from Light to Biosphere*, Vol. V, pp 977 – 980.

Taub, D.R., Seeman, J.R., Coleman, J.S. (2000): " Growth in elevated CO₂ protects photosynthesis against high – temperature damage". *Plant Cell and Environment* 23: 649 – 656.

Thornber, J.P., Morishige, D.T., Anandan, S., Peter, G.F. (1991): " Chlorophyll – carotenoid proteins of higher plant thylakoids ". *In* H. Sheer (ed): *Chlorophylls*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp 550- 585.

Van Oosten, J.-J., Afif, D., Dizengremel, P.(1992): " Long – term effects of CO₂ enriched atmosphere on enzymes of the primary carbon metabolism of spruce trees ". *Plant Physiology and Biochemistry* 30: 541 – 547.

Van Oosten, J.J., Besford, R.T. (1995): " Some relationships between the gas exchange, biochemistry and molecular biology of photosynthesis during leaf development of tomato plants after transfer to different carbon dioxide concentrations ". *Plant, Cell and Environment* 18: 1253 – 1266.

Van Oosten, J.-J., Besford, R.T.(1996): " Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ through feedback regulation of gene expression: Climate of opinion ". *Photosynthesis Research* 48: 353 – 365.

Van Oosten, J.J., Wilkins, D., Besford, R.T. (1994): " Regulation of the expression of photosynthetic nuclear genes by CO₂ is mimicked by regulation by carbohydrates: a mechanism for the acclimation of photosynthesis to high CO₂ ? " *Plant, Cell and Environment* 17: 913 – 923.

Vu, J.C.V., Gesch, R.W., Pennanen, A.H., Allen, L.H.Jr, Bode, K.J., Bowes, G. (2001): " Soybean photosynthesis, RubisCO and carbohydrate enzymes function at supraoptimal temperatures in elevated CO₂ ". *Journal of Plant Physiology* 158: 295 – 307.

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.

Wilkins, D., Van Oosten, J.J., Besford, R.T. (1994): " Effects of elevated CO₂ on chloroplast proteins in *Prunus avium* L. Stella ". *Tree Physiology* 14: 769 – 779.s