

19^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιχθυολόγων
19th Hellenic Conference of Ichthyologists



ΠΡΑΚΤΙΚΑ
PROCEEDINGS

Υδάτινα Οικοσυστήματα: Σύγχρονες Προσεγγίσεις Διαχείρισης

Συνεδριακό Κέντρο Κάρολος Παπούλιας, Ιωάννινα
30 Οκτωβρίου – 2 Νοεμβρίου 2025

Karolos Papoulias Conference Center, Ioannina
30 October – 2 November 2025

Επίδραση της θερμοκρασίας στο φωτοχρωστικό προφίλ χλωροφυλλών και καροτενοειδών σε στελέχη των ειδών *Cladophora* sp. και *Ulva lacunculata*: Μια συγκριτική μελέτη

Θεόδωρος Γκαδρίς, Λαμπρινή Μαλέα, Κωνσταντινιά Νάκου, Σωτήριος Ορφανίδης
Ινστιτούτο Αλιευτικής Έρευνας (ΙΝΑΛΕ), ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ, Νέα Πέραμος, Καβάλα - theo.gadris@gmail.com

ABSTRACT

Theodoros Gkadrīs, Lamprini Malea, Konstantinia Nakou, Sotirios Orfanidis: Temperature effects on chlorophyll and carotenoid profiles on *Cladophora* sp. and *Ulva lacunculata* strains: A comparative study

This study examines the effects of temperature, from 10°C to 32°C, on the pigment composition of *Cladophora* sp. (BOT:11) and *Ulva lacunculata* (BOT:17) using HPLC. Principal Component Analysis (PCA) confirmed distinct thermal responses between the two strains. *Cladophora* sp. exhibited a high chlorophyll *a/b* ratio at low temperatures, indicating stress and potential photodamage. However, at elevated temperatures, it showed partial acclimation through increased chlorophyll concentrations. In contrast, *Ulva lacunculata* maintained a stable chlorophyll *a/b* ratio across the temperature range, along with increased carotenoid production—particularly lutein and zeaxanthin—suggesting robust photoprotective capacity. Overall, *Ulva lacunculata* demonstrated superior pigment concentrations and acclimation ability under both low and high temperature conditions, highlighting also its potential for biotechnological applications.

Keywords: Chlorophyll *a*, *b*, carotenoids, HPLC, thermal stress, photoprotection

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σύλληψη και αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας, κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης, πραγματοποιείται από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές, τις χλωροφύλλες (Chl) και τα καροτενοειδή, που συναντώνται σε ανωτέρα φυτά, αλλά και χλωροφύκη (Lichtenthaler, 1987). Οι χλωροφύλλες διακρίνονται στην *a* (Chl *a*), την κύρια χρωστική, και τη *b* (Chl *b*), τη βοηθητική χρωστική. Η Chl *a* εντοπίζεται στις φωτοσυνθετικές κεραίες και στα ενεργά κέντρα (RCs) των φωτοσυστημάτων II και I και αποτελεί τον κύριο συλλέκτη ηλιακής ενέργειας (400–450 nm, 660–675 nm), την οποία διοχετεύει προς τα RCs (Chen & Blankenship, 2011). Η Chl *b* (450 nm) εντοπίζεται μόνο στις φωτοσυνθετικές κεραίες και συμβάλλει στη σύλληψη της ενέργειας σε χαμηλές εντάσεις ακτινοβολίας (Tanaka & Tanaka, 2000). Τα καροτενοειδή αποτελούν επίσης βοηθητικές χρωστικές, με διπτό ρόλο: βοηθούν τόσο στην απορρόφηση φωτός στη φωτοσυνθετική κεραία, σε μήκη κύματος (400–500 nm) που δεν απορροφά επαρκώς η χλωροφύλλη, όσο και στην προστασία της Chl *a* από φωτοοξειδωση, η οποία οφείλεται στο σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS; Frank & Cogdell, 1996).

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) παραμένει μια αξιόπιστη μέθοδος για την ποσοτικοποίηση μεμονωμένων φωτοχρωστικών ουσιών με υψηλή ακρίβεια στην έρευνα των μακροφυκών (Jeffrey *et al.* 1997).

Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης της θερμοκρασίας στη συγκέντρωση των χλωροφυλλών (Chl *a*, Chl *b*) και της αναλογίας τους (Chl *a/b*), καθώς και των καροτενοειδών (β-καροτένιο, ανθεραξανθίνη, ασταξανθίνη, βιολαξανθίνη, φουκοξανθίνη και λουτεΐνη + ζεαξανθίνη) δύο στελεχών των χλωροφυκών *Cladophora* sp. και *Ulva lacunculata* αντίστοιχα, που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα στελέχη (*Cladophora* sp. BOT:11 και *U. lacunculata* BOT:17, Τράπεζα Γενετικού Υλικού ΙΝΑΛΕ) καλλιεργήθηκαν σταδιακά σε αυξανόμενο όγκο κωνικές φιάλες με θαλασσινό νερό, εμπλουτισμένο με θρεπτικό διάλυμα Von Stosch (VSES), στους 20°C και σε ακτινοβολία 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16 ώρες το 24ωρο. Από το υλικό αυτό, όταν βρισκόταν στην εκθετική φάση αύξησης (εμπειρική εκτίμηση), επιλέχθηκαν τυχαία άτομα για κάθε πειραματική συνθήκη.

Πραγματοποιήθηκαν τέσσερα πειράματα καλλιέργειας, συνολικής διάρκειας έξι (6) ημερών, το καθένα, στο εργαστήριο. Δύο πειράματα για το στέλεχος *Cladophora* sp. BOT:11: το πρώτο σε χαμηλές

θερμοκρασίες (10 και 15°C) και το δεύτερο σε υψηλές θερμοκρασίες (20, 25, 30 και 32°C), σε βέλτιστη ακτινοβολία αύξησης (100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Δύο πειράματα πραγματοποιήθηκαν για το στέλεχος *U. lacinulata* BOT:17: το πρώτο πείραμα σε χαμηλές θερμοκρασίες (10 και 15°C) και το δεύτερο (20, 25, 28, 30 και 32°C) σε υψηλές θερμοκρασίες. Και τα δύο πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε βέλτιστη ακτινοβολία αύξησης (150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) για το στέλεχος BOT:17. Για τη διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας σε όλα τα πειράματα, έγινε χρήση κρουθερμοστατών (Haake $\pm 0.2^\circ\text{C}$), ενώ το θρεπτικό μέσο (VSES) ανακινούνταν μέσω αερισμού και ανανεωνόταν κάθε 2^η ημέρα, για τη διατήρηση σταθερής αλατότητας (34-36) και θρεπτικών αλάτων. Ο φωτισμός πραγματοποιούνταν με λάμπες LEDs (Phyto-Panels PSI, Czech Republic). Μετά το πέρας των πειραμάτων ελήφθησαν δείγματα υλικού, τρία άτομα ανά συνθήκη (n=3) για το στέλεχος *Cladophora* sp. σε όλες τις θερμοκρασίες. Για το στέλεχος *U. lacinulata* αναλύθηκαν τρία άτομα (n=3) ανά συνθήκη σε όλες τις θερμοκρασίες, εκτός από τους 25 και 28°C, όπου λόγω αναπαραγωγής του στελέχους, αναλύθηκαν μόνο δύο άτομα ανά συνθήκη. Τα δείγματα υπέστησαν διαδικασία λυοφιλοποίησης, εκχύλισης, φυγοκέντρωσης και φιλτραρίσματος στο σκοτάδι, για να προετοιμαστούν για χημική ανάλυση (Yalcin *et al.* 2021).

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των φωτοσυνθετικών χρωστικών ολοκληρώθηκε με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Η στήλη διατηρήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 30°C και ο ρυθμός ροής των διαλυτών ρυθμίστηκε σε 1 ml min⁻¹. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με βαθμιαία έκλυση της κινητής φάσης, η οποία αποτελείται από 2 διαλύτες, διαλύτης Α: ακετονιτρίλιο/μεθανόλη/νερό = 45/45/10(v/v/v) και διαλύτης Β: ακετονιτρίλιο/οξικός αιθυλεστέρας = 45/55(v/v). Η εκάστοτε ανάλυση διήρκεσε 36 λεπτά (Woitke *et al.*, 1994). Οι συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν ως mg g⁻¹ ξηρής βιομάζας.

Για τη διερεύνηση των σχέσεων μεταξύ των φωτοχρωστικών και θερμοκρασιών μεταξύ των δύο ειδών πραγματοποιήθηκε Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA), μέσω του λογισμικού CANOCO 5. Επίσης, οι συγκεντρώσεις των φωτοχρωστικών περιγράφηκαν στατιστικά ως μέσος όρος (mean, n=2-3, $\pm 95\%$ confidence intervals) και παρουσιάστηκαν σε γραφήματα, με χρήση του λογισμικού OriginPro 9.

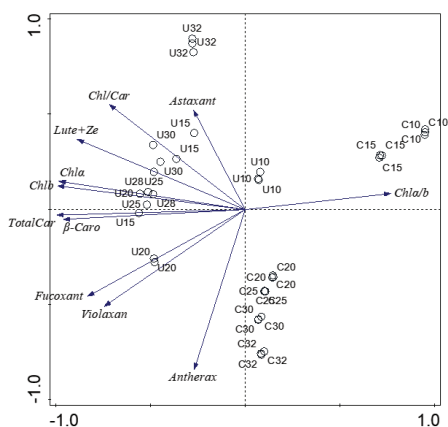
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το αποτέλεσμα της PCA (Εικόνα 1) έδειξε ότι τα δύο στελέχη *U. lacinulata* και *Cladophora* sp. παρουσίασαν διαφορές ως προς την απόκριση των φωτοσυνθετικών χρωστικών τους στις διαφορετικές θερμοκρασίες, με το πρώτο στέλεχος να διαθέτει 3-4 φορές υψηλότερες συγκεντρώσεις.

Εικόνα 1. Η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) έδειξε ότι οι δύο πρώτοι άξονες εξηγούν το μεγαλύτερο μέρος της συνολικής διακύμανσης στα δεδομένα (Άξονας 1: 64,76%, Άξονας 2: 17,64%), στα στελέχη *Cladophora* sp. BOT:11 και *Ulva lacinulata* BOT:17, υπό διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες: C10 = 10°C, C20 = 20°C, C25 = 25°C, C30 = 30°C και C32 = 32°C και U10 = 10°C, U15 = 15°C, U20 = 20°C, U25 = 25°C, U28 = 28°C, U30 = 30°C και U32 = 32°C.

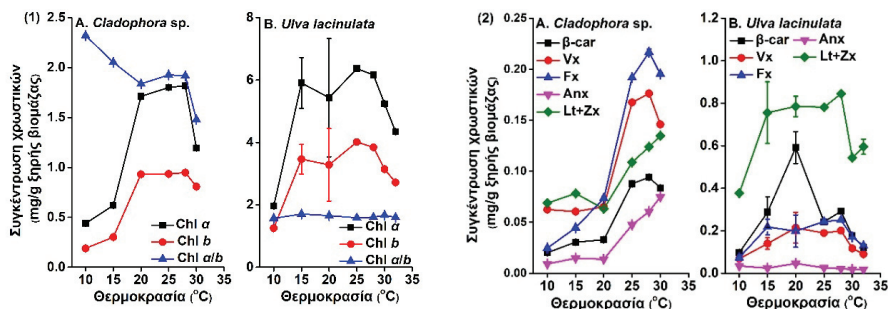
Figure 1. The Principal Component Analysis (PCA) revealed that the first two axes explain most of the total variance in the dataset (Axis 1: 66.57%, Axis 2: 17.57%) for the strains *Cladophora* sp. BOT:11 and *Ulva lacinulata* BOT:17, under different temperature conditions: C10 = 10°C, C20 = 20°C, C25 = 25°C, C30 = 30°C, and C32 = 32°C for *Cladophora*; and U10 = 10°C, U15 = 15°C, U20 = 20°C, U25 = 25°C, U28 = 28°C, U30 = 30°C and U32 = 32°C for *Ulva*.

Στο θετικό ημίαξονα PCA1 περιλαμβάνονται οι υψηλότερες φορτίσεις (loadings) του στελέχους *Cladophora* sp. στους 10 και 15°C, με την αναλογία Chl *a/b* να παρουσιάζει υψηλή θετική συσχέτιση. Η υψηλότερη αναλογία Chl *a/b* παρατηρήθηκε στους 10°C (2.321 ± 0.01), ενώ η χαμηλότερη Chl *a/b* παρατηρήθηκε στους 32°C (1.479 ± 0.003)(Εικόνα 2.1.A). Η αύξηση της αναλογίας Chl *a/b* έδειξε αλλαγές



στο μέγεθος της φωτοσυνθετικής κεραίας υποδεικνύοντας την καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Havaux *et al.* 1991). Με την αύξηση της θερμοκρασίας στους 20, 25 και 30°C παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των Chl *a* και Chl *b*, ενώ υπήρξε μείωση στους 32°C (Εικόνα 2.1.A) με σκοπό τη βέλτιστη συγκομιδή της ακτινοβολίας (Esteban *et al.*, 2015)

Στον αρνητικό ημίαξονα PCA1 οι υψηλότερες φορτίσεις (loadings) του στελέχους *U. lacinulata*, μετρήθηκαν στους 25, 28 και 30°C, με τη Chl *a* και Chl *b* να παρουσιάζουν υψηλή αρνητική συσχέτιση (Εικόνα 1). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της Chl *a* (6.367) και Chl *b* (4.016) παρατηρήθηκαν στους 25°C (Εικόνα 2.1.B), ενώ οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις της Chl *a* (1.963 ± 0.005) και Chl *b* (1.252 ± 0.002) παρατηρήθηκαν στους 10°C (Εικόνα 2.1.B). Η αύξηση της συγκέντρωσης της Chl *a* στους 25 και 28°C στο στέλεχος *U. lacinulata* (Εικόνα 2.1.B) έδειξε την υψηλή παραγωγή ενεργών κέντρων, η οποία συμβάλλει και στην ενίσχυση της φωτοσυνθετικής ικανότητας (Machalek *et al.*, 1996). Συνεπώς, μείωση της συγκέντρωσης της Chl *a* και Chl *b* οδήγησε και σε μείωση της φωτοσυνθετικής ικανότητας στις χαμηλές (10°C) και υψηλές θερμοκρασιακές συνθήκες (30 και 32°C). Τα αποτελέσματα έδειξαν σταθερές τιμές της αναλογίας Chl *a/b* σε όλο το θερμοκρασιακό εύρος (10 - 32°C), χωρίς διαφοροποίηση στο στέλεχος *U. lacinulata* (Εικόνα 2.1.B). Η αναλογία Chl *a/b* σχετίζεται με το μέγεθος της φωτοσυνθετικής κεραίας της φωτοσυνθετικής μηχανής με σκοπό τη βελτιστοποίηση της συγκομιδής ακτινοβολίας (Esteban *et al.* 2015). Συνεπώς, η σταθερότητα των τιμών της αναλογίας Chl *a/b* έδειξε την απουσία καταπόνησης της φωτοσυνθετικής μηχανής του στελέχους στις θερμοκρασίες μελέτης (Walters, 2005).



Εικόνα 2. Διαγράμματα (1) της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης *a* (Chl *a*) και *b* (Chl *b*), καθώς και της αναλογίας αυτών (Chl *a/b*) και (2) του β-καροτένιου (β-car), της βιολαξανθίνης (Vx), της φουκοξανθίνης (Fx), της ανθεραξανθίνης (Anx) και του συμπλόκου λουτεΐνης και ζεαξανθίνης, σε στελέχη των ειδών (A) *Cladophora sp.* και (B) *Ulva lacinulata* στο θερμοκρασιακό εύρος των 10–32°C (mean, n=2-3, ±95% confidence intervals).

Figure 2. Graphs showing (1) the concentrations of chlorophyll *a* (Chl *a*) and *b* (Chl *b*), as well as their ratio (Chl *a/b*) and (2) the concentrations of β-carotene (β-car), violaxanthin (Vx), fucoxanthin (Fx), antheraxanthin (Anx), and the lutein-zeaxanthin complex, of (A) *Cladophora sp.* and (B) *Ulva lacinulata* strains across the temperature range of 10–32°C (mean, n=2-3, ±95% confidence intervals).

Ως προς τον αρνητικό ημίαξονα PCA1 του στελέχους *U. lacinulata* έδειξαν υψηλή συσχέτιση και τα καροτενοειδή β-καροτένιο, βιολαξανθίνη, φουκοξανθίνη και λουτεΐνη και ζεαξανθίνη (Εικόνα 1). Ειδικότερα, το β-καροτένιο και η λουτεΐνη και ζεαξανθίνη παρουσίασαν υψηλότερες συγκεντρώσεις στο στέλεχος *U. lacinulata*, με την υψηλότερη συγκέντρωση λουτεΐνης και ζεαξανθίνης στους 28°C (0.845 mg g⁻¹ ξηρής βιομάζας)(Εικόνα 2.2.B). Η αύξηση του β-καροτένιου και της λουτεΐνης και ζεαξανθίνης συμβάλλει στην προστασία των φωτοσυστημάτων με την αποφυγή του οξειδωτικής καταπόνησης, υπό συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (Frank & Cogdell, 1996). Επιπρόσθετα, αύξηση της βιολαξανθίνης στους 20, 25 και 28°C (Εικόνα 2.2.B) επάγει την ενεργοποίηση των μη-φωτοχημικών μηχανισμών απόσβεσης (NPQ) για την προστασία της φωτοσυνθετικής μηχανής (Havaux, 1998).

Στον αρνητικό ημίαξονα PCA2 οι υψηλότερες φορτίσεις (loadings) στο στέλεχος *Cladophora sp.*, μετρήθηκαν στους 25, 30 και 32°C, με τη ανθεραξανθίνη να παρουσιάζει υψηλή θετική συσχέτιση (Εικόνα 1). Η αύξηση της συγκέντρωσης των καροτενοειδών, της λουτεΐνης, της ζεαξανθίνης και της ασαξανθίνης στους 25, 30 και 32°C (Εικόνα 2.2.A) έδειξαν την ενεργοποίηση των φωτο-προστατευτικών μηχανισμών στο στέλεχος *Cladophora sp.*, προς αποφυγή φωτοοξειδωτικής βλάβης στη φωτοσυνθετική μηχανή

(Frank & Cogdell, 1996). Στο στέλεχος *U. lacinulata*, στο θετικό ημίαξονα PCA2 οι υψηλότερες φορτίσεις (loadings) μετρήθηκαν στους 30 και 32°C, με τη ανθεραξανθίνη να παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση (Εικόνα 1). Η ανθεραξανθίνη αποτελεί το ενδιάμεσο στάδιο του κύκλου των ξανθοφυλλών βιολαξανθίνη-ανθεραξανθίνη-ζεαξανθίνη (Havaux 1998). Η αύξηση του συμπλόκου λουτεΐνης και ζεαξανθίνης στους 32°C, που συνοδεύτηκε από μείωση της ανθεραξανθίνης (Εικόνα 2.2.B) έδειξε την ολική μετατροπή της ανθεραξανθίνης σε ζεαξανθίνη για την ενίσχυση του NPQ υπό συνθήκες καταπόνησης (Demmig-Adams & Adams, 1996).

Συμπερασματικά, οι φωτοσυνθετικές χρωστικές των στελεχών *Cladophora* sp. και *U. lacinulata* αποκρίθηκαν διαφορετικά στις θερμοκρασίες, με το στέλεχος *U. lacinulata* να δείχνει υψηλή ικανότητα εγκλιματισμού σε όλες τις θερμοκρασίες, ενισχυμένη από την παραγωγή καροτενοειδών, για την προστασία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού από φωτοοξειδωτική βλάβη. Αντίθετα, το στέλεχος *Cladophora* sp. έδειξε υψηλές τιμές του λόγου Chl *a/b* και συνεπώς καταπόνηση και φωτοοξειδωτική βλάβη στις χαμηλές θερμοκρασίες, αλλά και δυνατότητα εγκλιματισμού, με σκοπό τη βέλτιστη συλλογή της ακτινοβολίας, στις υψηλές θερμοκρασίες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Chen M, Blankenship RE (2011) Expanding the solar spectrum used by photosynthesis. *Trends Plant Science* 16(8): 427–431
- Demmig-Adams B, Adams III WW (1996) Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta*, 198(3), 460-470
- Esteban R, Barrutia O, Artetxe U, Fernández-Marín B, Hernández A, García-Plazaola JI (2015) Internal and external factors affecting photosynthetic pigment composition in plants: a meta-analytical approach. *New Phytologist*, 206(1): 268-280
- Frank HA, Cogdell RJ (1996) Carotenoids in photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* 63(3): 257–264
- Havaux M, Greppin H, Strasser RJ (1991) Functioning of photosystems I and II in pea leaves exposed to heat stress in the presence or absence of light: Analysis using in-vivo fluorescence, absorbance, oxygen and photoacoustic measurements. *Planta*, 186(1), 88-98
- Havaux M (1998) Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in plant science*, 3(4), 147-151
- Machalek KM, Davison IR, Falkowski PG (1996) Thermal acclimation and photoacclimation of photosynthesis in the brown alga *Laminaria saccharina*. *Plant, Cell & Environment*, 19(9), 1005-1016
- Tanaka R, Tanaka A (2000) Chlorophyll *b* is not just an accessory pigment but a regulator of the photosynthetic antenna. *Porphyrins*, 9(1), 240-245
- Walters RG (2005) Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *Journal of Experimental Botany*, 56(411), 435-447
- Woitke P, et al. (1994) HPLC determination of lipophilic photosynthetic pigments in algal cultures and lake water samples using a non-encapped C18-RP-column. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 348: 762-768
- Yalcin S, et al. (2021) HPLC detection and antioxidant capacity determination of brown, red and green algal pigments in seaweed extracts. *Journal of Chromatographic Science*, 59.4: 325-337
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: *Methods in enzymology*. Academic Press, pp. 350-382
- Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (1997) *Phytoplankton pigments in oceanography*. Paris: UNESCO. ISBN 92-3-103275-5