

**PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
BIOLOŠKI ODSJEK**

**Ivana Lozi**

**UČINKOVITOST RAZLIČITIH OSVJETLJENJA NA RAST I  
FOTOSINTEZU VODENE LEŠE (Lemna minor L.)**

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, 2010. godina

Ovaj rad izrađen u Botaničkom zavodu, pod vodstvom doc. dr. sc. Mirte  
Tkalec, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi  
stjecanja zvanja prof. biologije i kemije.

## Zahvala

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Mirti Tkalec, na povjerenju, brojnim stručnim savjetima te strpljenju i vremenu uloženom u izradu ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem svim članovima Laboratorija za fiziologiju bilja, posebice dr.sc. Mariji Babić na svakom savjetu i pomoći.

Zahvaljujem roditeljima, obitelji i prijateljima koji su bili uz mene tijekom teškog mog studija, koji su me podržavali i usmjeravali.

I na kraju, hvala Nikoli na pomoći i podršci.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

### UPODUBA RAZLIČITIH OSVJETLJENJA NA RAST I FOTOSINTEZU VODENE LENE (*Lemna minor* L.)

IVANA LOZI

Botanički zavod Biološkog odsjeka  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta  
Rooseveltova trg 6, Zagreb

U ovom radu je istraživana upoduba različitih uvjeta osvjetljenja na rast i fotosintezu vodene lene (*Lemna minor* L.). Biljke su bile uzgajane u kulturi *in vitro* na dva intenziteta osvjetljenja (40 i 80  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) različitih tipova žarulja. Osim uobičajenom fluorescentnom hladnom bijelom svjetlošću u žarulja „Cool White“, biljke su bile osvjetljene i fluorescentnom svjetlošću u sivoj udjelom crvenog i plavog dijela spektra žarulja „GroLux“. Rast vodene lene bio je nešto uspješniji pri višem intenzitetu svjetlosti dok razlike u rastu nisu zabilježene pri uvjetima osvjetljenja različitim žaruljama. Sadržaj pigmenta općenito je bio viši pri nižem intenzitetu hladne bijele svjetlosti „Cool White“ žarulja, međutim, te promjene nisu bile statistički značajne. Viši intenzitet osvjetljenja (80  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) smanjio je optimalni prinos fotosistema II osobito u biljaka izloženih crvenoj svjetlosti „GroLux“ žarulja. U inkovitost fotosistema II na svijetlu nije se značajno razlikovala pri različitim uvjetima osvjetljenja kao ni fotokemijsko gašenje iako su male vrijednosti fotokemijskog gašenja uopće pri izlaganju biljaka hladnoj bijeloj svjetlosti „Cool White“ žarulja. S druge strane nešto veće vrijednosti nefotokemijskog gašenja primijećene su pri izlaganju biljaka crvenoj svjetlosti „GroLux“ žarulja. Dobiveni rezultati pokazuju da nema značajnijih razlika u rastu i procesu fotosinteze između biljaka osvjetljivanih fluorescentnom svjetlošću u sivoj udjelom crvenog i plavog dijela u odnosu na hladnu bijelu svjetlost kao niti između dva primijenjena intenziteta osvjetljenja.

(55 stranica, 18 slika, 2 tablice, 51 literaturnih navoda, hrvatski jezik)

**Rad je pohranjen u:** Središnjoj biološkoj knjižnici

**Glavne riječi:** svjetlost, rast, fotosinteza, vodena lena (*Lemna minor* L.)

**Voditelj:** Dr. sc. Mirta Tkalec, doc.

**Ocjenitelji:** Dr. sc. Iva Juranović Cindrić, doc.

Dr. sc. Dubravka Matković - Allogovi, redovni profesor

Dr. sc. Ines Radanović, izvanredan profesor

**Rad prihvaćen:** 10.02. 2010.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### EFFECTS OF DIFFERENT LIGHT CONDITIONS ON GROWTH AND PHOTOSYNTHESIS IN DUCKWEED (*Lemna minor* L.)

IVANA LOZI

Department of Biology  
Faculty of Science  
University of Zagreb  
Rooseveltova trg 6, Zagreb

In this work the effect of different light conditions on growth and photosynthesis in duckweed (*Lemna minor* L.) was studied. Plants were grown *in vitro* under two light intensities (40 and 80  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) of different lamp types. Plants were exposed to a standard fluorescent (Cool White) lamp and GroLux lamp with higher emissions in red and blue part of the spectrum. Growth of duckweed plants was somewhat better in higher intensity conditions while no difference in growth was noted under different types of lamps. Pigment content was generally higher at lower intensities of cool white light but the difference was not statistically significant. Higher light intensity (80  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) reduced the optimal yield of photosystem II especially in plants exposed to red light of GroLux lamps. Efficiency of photosystem II under different lighting conditions was not significantly different. Differences in photochemical quenching under different lighting conditions were also nonsignificant, although somewhat higher values of photochemical quenching were noticed in plants exposed to Cool White lamps. On the other hand, higher values of nonphotochemical quenching were observed in plants exposed to red GroLux lamp. In conclusion, obtained results show no significant difference in growth and photosynthesis between plants grown under fluorescent light with higher red and blue content in comparison to cool white light, nor between two applied light intensities.

(55 pages, 18 figures, 2 tables, 51 references, original in Croatian)

**Thesis deposited** in Central biological library

**Key words:** Light, growth, photosynthesis, duckweed (*Lemna minor* L.)

**Supervisor:** Dr. Mirta Tkalec, Asst. Prof.

**Reviewers:** Dr. Iva Juranovi Cindri , Asst. Prof.  
Dr. Dubravka Matkovi - alogovi , Prof.  
Dr. Ines Radanovi , Assoc. Prof.

**Thesis accepted:** 10<sup>th</sup> February 2010

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	.....	<b>1</b>
1.1. Svjetlost	.....	2
1.2. Fotosinteza	.....	3
1.2.1. Fotosintetski pigmenti	.....	4
1.2.2. Utjecaj svjetlosti na stopu fotosinteze	.....	8
1.3. Fluorescencija klorofila <i>a</i>	.....	10
1.4. Vodena le a ( <i>Lemna minor</i> L.)	.....	12
1.5. Lemna - test	.....	12
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b>	.....	<b>14</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b>	.....	<b>16</b>
3.1. Materijal	.....	17
3.1.1. Kultura vodene le e ( <i>Lemna minor</i> L.) u uvjetima <i>in vitro</i>	.....	17
3.1.2. Uvjeti osvjetljenja	.....	18
3.2. Metode	.....	20
3.2.1. Lemna - test	.....	20
3.2.2. Sadržaj pigmenata	.....	21
3.2.3. Mjerenje fluorescencije klorofila <i>a in vivo</i>	.....	22
3.3. Statisti ka obrada	.....	25
<b>4. REZULTATI</b>	.....	<b>26</b>
4.1. U inak razli itih uvjeta osvjetljenja na stopu rasta vodene le e	.....	27
4.2. U inak razli itih uvjeta osvjetljenja na sadržaj fotosintetskih pigmenata	....	31
4.3. U inak razli itih uvjeta osvjetljenja na fotosintezu	.....	33
<b>5. RASPRAVA</b>	.....	<b>38</b>
5.1. U inak razli itih uvjeta osvjetljenja na rast vodene le e	.....	39
5.2. U inak razli itih uvjeta osvjetljenja na pigmente vodene le e	.....	42
5.3. Utjecaj razli itih uvjeta osvjetljenja na fotosintezu vodene le e	.....	43
<b>6. ZAKLJU AK</b>	.....	<b>48</b>
<b>7. LITERATURA</b>	.....	<b>50</b>

## **POPIS KRATICA**

**CW** - CoolWhite žarulja

**ETR** („electron transport rate, ETR“) - stopa prijenosa elektrona

**GL** - GroLux žarulja

**NADP<sup>+</sup>** - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

**NPQ** - nefotokemijsko gašenje

**PFD** (photon flux density) - intenzitet apsorbirane svjetlosti ( $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )

**PS** - Pirson i Seidel

**PSI** - fotositem I

**PSII** - fotositem II

**qP** - fotokemijsko gašenje

Vodene i kopnene biljke su neizostavni dijelovi zdravih ekoloških sustava. One su primarni producenti energije potrebne za gotovo sve ostale oblike života i izvor kisika (Wang, 1991). To su autotrofni organizmi koji mogu iz anorganskih tvari primljenih iz okoliša sintetizirati organske spojeve koriste i svjetlosnu energiju.

Rast biljke obuhvaća kvalitativne promjene koje se zbivaju tijekom razvitka, a mogu se uočiti kao promjene u veličini stanice, organa ili celovitog organizma. U svojem prirodnom okolišu biljke su izložene različitim stresnim čimbenicima (npr. visoke i niske temperature, visoki intenziteti svjetlosti, suše, poplave, itd.) koji utječu na njihov rast i razvoj.

Biljke su statični organizmi kojima je za preživljavanje potrebna prilagodba na uvjete u kojima rastu. Kako se sunčeva svjetlost najviše sastoji od plavog i crvenog djela vidljivog spektra svjetlosti, biljke su se prilagodile na taj način da najefikasnije vrše fotosintezu koriste i upravo taj dio spektra. Evolucija biljaka započela je u vodi kroz koju takva svjetlost najbolje prolazi (Kenrick i Crane, 1997). Kao rezultat, zelena svjetlost nije potrebna niti apsorbirana, pa se reflektira nazad, čineći i biljke zelenima.

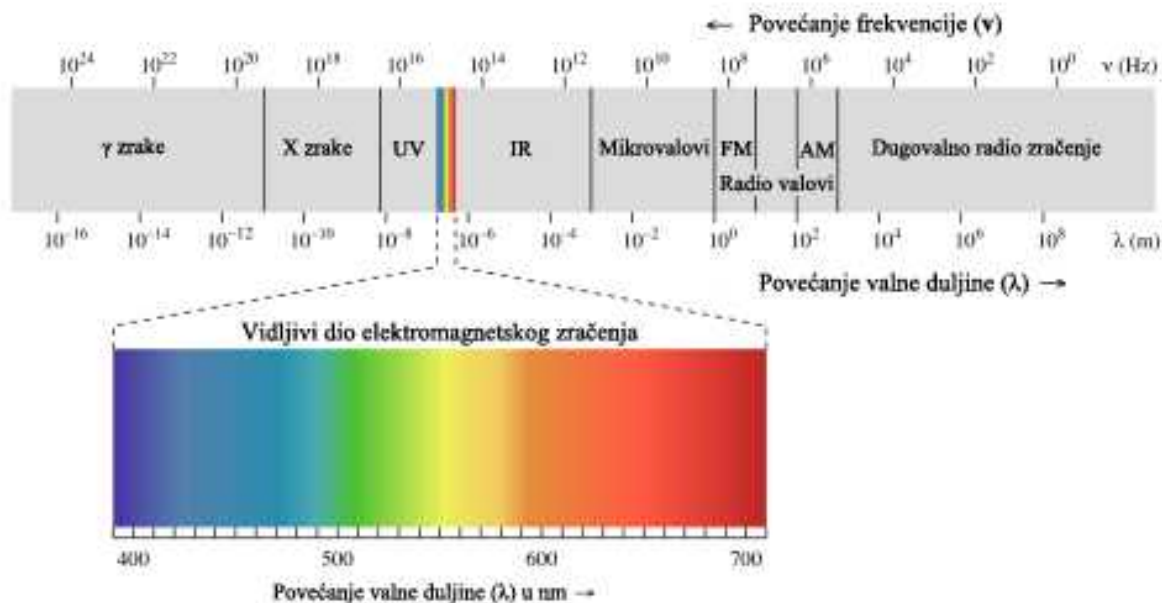
Biljke se uzgajaju u različite svrhe, među ostalim i za istraživanje. Za uspješniji uzgoj biljaka razvijeni su izvori svjetlosti koji daju specifične svjetlosne spektre za najširu moguću uporabu, koji, samostalno ili u kombinaciji, daju najbolje rezultate za kompleksne biološke zahtjeve. Iz tog razloga odlučila sam istražiti njihov utjecaj na rast i fotosintezu vodene i u strogo kontroliranim uvjetima.

## 1. 1. SVJETLOST

Cjelokupni raspon zračenja koje nastaje u svemiru nazivamo elektromagnetski spektar. Ovisno o frekvenciji, elektromagnetsko zračenje dijeli se na gama ( $\gamma$ ), rendgensko (X), ultraljubičasto (UV), vidljivo (VIS), infracrveno (IR), mikrovalno i radiovalno zračenje (Slika 1).

Svjetlost obuhvaća transversalno elektromagnetsko zračenje (električno i magnetsko polje mijenjaju se periodički u smjerovima okomitim na smjer gibanja vala) vidljivo ljudskom oku. Uvijek odlikuje vrlo male frekvencijske razlike (boje) u području vidljive svjetlosti. Najkraća valna duljina imaju ljubičasta i plava svjetlost, a najdulja crvena svjetlost. Bijela svjetlost sastavljena je od kontinuiranog niza svih boja vidljivog spektra.





**Slika 1.** Spektar elektromagnetskog zračenja

Fotosinteza koristi energiju crvenog dijela vidljivog spektra koji je zbog toga za biljke najvažniji dio svjetlosnog spektra. Plavi i ljubiasti dio vidljivog spektra se najbolje apsorbira u biljku. Plava i ljubiasta svjetlost potrebne su za vegetativni rast i rast korijena, kao i mali, ali neznačajan, dio fotosinteze. Ubrzava fototropizam, koji daje usmjereni rast biljke prema izvoru svjetlosti. Plava svjetlost igra ulogu u modulaciji otvaranja i zatvaranja puca i, a također je važna u fotoperiodizmu i pokretanju sezonskog cvjetanja. Samo u plavoj svjetlosti, bez crvenog dijela za fotosintezu, biljke otežano rastu dok ne potroše rezerve hrane nakon čega venu unatoč izloženosti plavoj svjetlosti ([www.mobot.org...](http://www.mobot.org...)).

## 1.2. FOTOSINTEZA

Fotosinteza je najvažniji proces koji omogućava život na Zemlji u obliku kojem ga mi poznajemo. Fotoautotrofne biljke u procesu fotosinteze pretvaraju energiju Sunčeva zračenja u kemijsku energiju. One sadrže biljna bojila, pigmente, koji apsorbiraju svjetlosnu energiju i pretvaraju je u kemijsku energiju, koja se zatim pohranjuje u kemijskim vezama šećera i ostalih organskih molekula nastalih iz ugljikova dioksida i vode u procesu fotosinteze.

Do Zemlje dopire Sun eva svjetlost razli itih frekvencija, a ljudsko oko vidi samo manji dio (5%), odnosno vidljivo podru je. U podru ju vidljive svjetlosti zbivaju se fotosinteza, fototropizmi (zakrivljenja uzrokovana svjetloš u), fototaksije (slobodna lokomotorna gibanja upravljana svjetloš u) i fotomorfogeneze (promjene oblika potaknute svjetloš u). To se podru je spektra naziva fotobiološkim podru jem (Pevalek-Kozlina, 2003). Ostala svjetlost je ili premale ili prevelike valne duljine da bi ju apsorbirali fotosintetski pigmenti. Osim toga, 95% energije koju apsorbira list gubi se u obliku topline ili se koristi za održavanje metabolizma biljke (McDonald, 2003).

Proces fotosinteze možemo podijeliti na svjetlosne reakcije i reakcije u tami. U svjetlosnim, primarnim reakcijama, se oksidira voda te otpušta kisik, dok se u reakcijama tame, tj. sekundarnim reakcijama reducira ugljikov dioksid. Svjetlosne reakcije odvijaju se u mezofilu lista, u tilakoidnim membranama kloroplasta. Stanice mezofila sadrže veliki broj kloroplasta (30 do više od 100) koji sadrže klorofil (Pevalek- Kozlina, 2003).

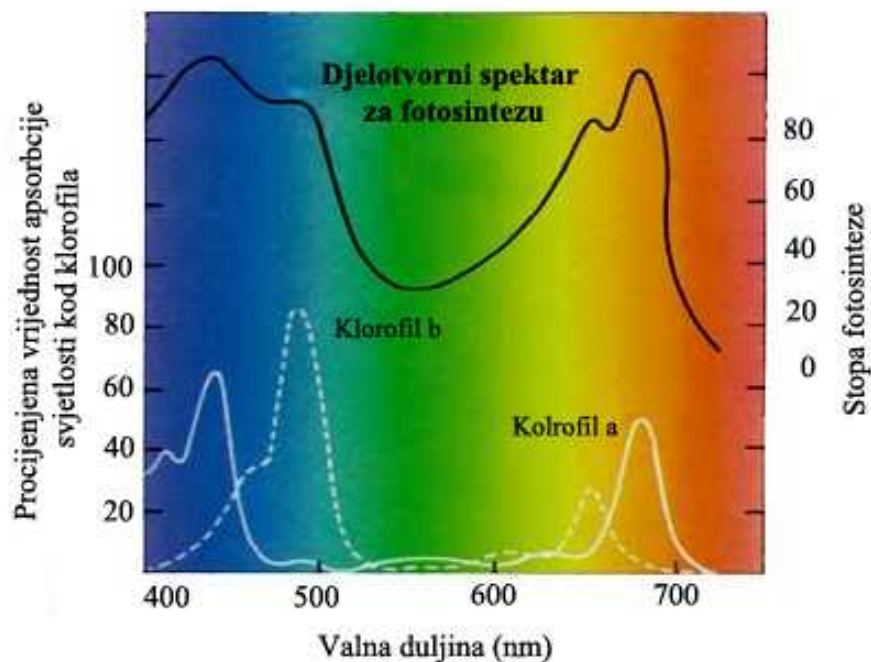
Svjetlost koju apsorbira klorofil pokre e prijenos elektrona od vode do akceptora elektrona  $\text{NADP}^+$  i u tom se procesu cijepa voda te nastaje kisik i ATP. U reakcijama tame ATP se koristiti za redukciju  $\text{CO}_2$  i sintezu še era.

Djelotvoran dio spektra za fotosintezu je u podru ju crvene i plave svjetlosti, dok se središnji dio spektra, koji odgovara zelenoj svjetlosti, ne koristi za fotosintezu. Iz toga se može zaklju iti da u fotosintezi sudjeluju zeleni pigmenti, klorofili, koji apsorbiraju plavu i crvenu svjetlost. Središnji dio spektra, zelena svjetlost, ne koristi se u fotosintezi pa e reflektirana i propuštena svjetlost biti upravo te boje što objašnjava zelenu boju listova.

### **1.2.1. Fotosintetski pigmenti**

Da bi svjetlost bila aktivna u procesu fotosinteze, mora biti apsorbirana. Pri tome imaju najve u ulogu klorofili, zeleni pigmenti u biljci. Razlikujemo etiri tipa klorofila, klorofil *a*, *b*, *c* i *d*.

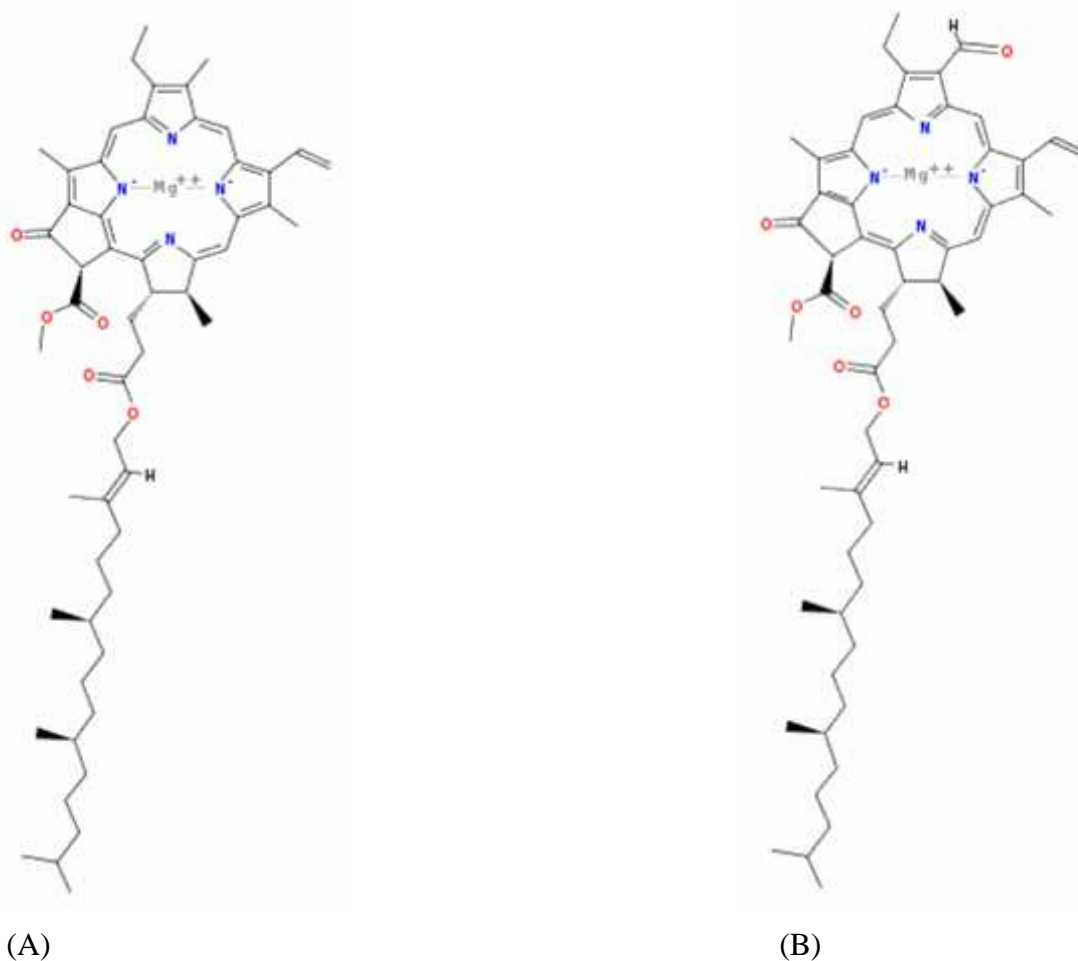
Najve e zna enje u fotosintezi ima klorofil *a* jer jedino on može sudjelovati u svjetlosnim reakcijama koje Sun evu energiju pretvaraju u kemijsku. Me utim, u fotosintezi sudjeluju i ostali pigmenti, zbog ega se djelotvorni spektar fotosinteze ne poklapa u potpunosti s djelotvornim spektrom klorofila *a* (Slika 2). Takvi pomo ni pigmenti su klorofil *b* i karotenoidi. Oni mogu apsorbirati svjetlost i prenositi energiju na klorofil *a*, koji se onda ponaša kao da je sam apsorbirao foton.



**Slika 2.** Apsorpcijski spektar klorofila *a* i *b*

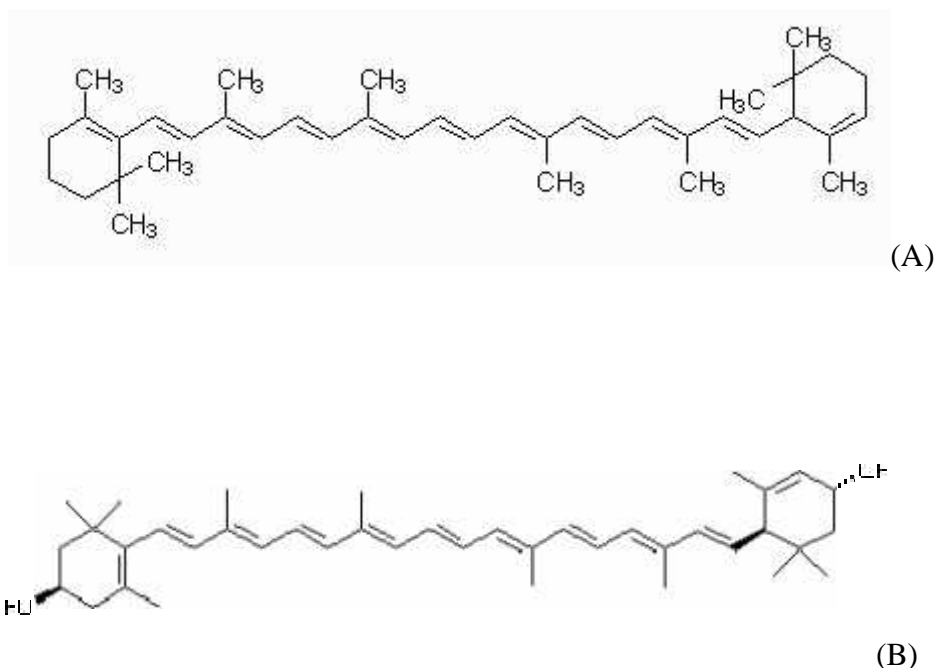
Klorofil *a* je plavozelene boje i maksimalno apsorbira svjetlost valnih duljina 430 nm i 662 nm, dok je klorofil *b* žutozelene boje, a maksimalno apsorbira svjetlost valnih duljina 453 nm i 642 nm. Osnovna struktura klorofila je porfirinski sustav koji ima četiri pirolska prstena međusobno povezana metilnim skupinama u prstenasti sustav. Prstenasta struktura sadrži labavo vezane elektrone i to je dio molekule koji je nužan za prijenos elektrona i redoks-reakcije. Za pirolski prsten br. IV porfirinskog sustava vezan je fitol, terpenoid koji se sastoji od četiri izoprenske jedinice. Fitolni rep je hidrofoban te omogućuje vezanje klorofila na hidrofobne regije klorofil-vezaju ih proteina i na tilakodnu membranu (Pevalek-Kozlina, 2003).

Pojedini se klorofili međusobno razlikuju po bojom lancu. Klorofil *a* na pirolskom prstenu br. II ima metilnu skupinu, a klorofil *b* aldehidnu skupinu (Slika 3).



**Slika 3.** Klorofil *a* (A) i klorofil *b* (B) (Preuzeto sa internetske stranice [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org))

Karotenoide dijelimo u dvije skupine, karotene i ksantofile. To su linearne molekule ugljikovodika s brojnim konjugiranim dvostrukim vezama. Sastoje od izoprenskih jedinica s jednim ili dva ionska prstena. Karoteni se sastoje isključivo od vodika i ugljika dok su ksantofili derivati karotena koji sadrže kisik na kraju molekule kao, hidroksi, metoksi, aldehid ili karboksilna kiselina (Slika 4).



**Slika 4.** - karoten (A) i ksantofil lutein (B)

U prirodi su ksantofili brojniji od karotena te u rastu im listovima njihov odnos može biti 2:1.

Karotenoidi se sintetiziraju isključivo u biljkama i gljivama, a prisutni su u svim fotosintetskim organizmima te imaju važnu ulogu u fotosintezi. Imaju karakterističnu žuto-narančastu boju, a najjače apsorbiraju svjetlost valnih duljina između 380 nm i 550 nm, proširuju i tako spektar boja koje mogu pokretati fotosintezu. Karotenoidi su obično usko povezani sa proteinima antena i reakcijskih središta i integralni su dio tilakoidnih membrana. Svjetlosna energija koju apsorbiraju karotenoidi brzo se prenosi na klorofile. U inkovitost tog prijenosa energije obično je niža nego kad se energija prenosi sa klorofila na klorofil. U većini biljaka, karotenoidi su slabi u inkoviti prenositelji energije.

Karotenoidi imaju i zaštitnu ulogu. Pigmenti apsorbiraju velike količine energije, što može oštetiti fotosintetske membrane ako se ta energija ne pohrani fotokemijski. Ako pobudeno stanje klorofila brzo ne prestane, dolazi do reakcije s molekulom kisika i nastaje singletni kisik koji je vrlo reaktivan i može oštetiti mnoge stanične sastojke, osobito lipide. Karotenoidi djeluju zaštitno tako da brzo „ugase“ pobudeno stanje klorofila. Pobudeno stanje karotenoida nema dovoljno energije za nastanak singletnog kisika te se vraća u osnovno stanje, otpuštajući i višak energije u obliku topline (Pevalek- Kozlina, 2003). Zbog tog svojstva

karotenoida da gase pobu eno stanje klorofila odlučila sam mjeriti njihovu količinu jer se porast količine karotenoida može uzeti kao indikator stresnih uvjeta.

Klorofil *a*, klorofil *b* i karotenoidi se u skupinama od nekoliko stotina nalaze u tilakoidnim membranama. U mjestu koje nazivamo reakcijsko središte nalazi se jedna, ili par molekula klorofila *a* koje mogu pokretati svjetlosne reakcije tako što predaju svoj pobuđeni elektron primarnom akceptoru elektrona. Ostale molekule klorofila i karotenoidi služe kao antena molekule koje apsorbiraju fotone i prenose energiju do reakcijskog središta. Antenski kompleks zajedno s reakcijskim središtem i primarnim akceptorom elektrona naziva se fotosistemom.

U tilakoidnim membranama su prisutna dva tipa fotosistema, fotosistem I (PSI) i fotosistem II (PSII) koji se razlikuju po apsorpcijskom maksimumu specijalizirane molekule klorofila, koja se nalazi u njihovom središtu. Oni su međusobno kemijski i fizički odvojeni, a povezani su transportnim lancem elektrona (Pevalek-Kozlina, 2003). U tilakoidnim membranama se još nalaze i različiti spojevi, prenositelji elektrona tijekom fotosinteze. To su citokromi, plastokinoni, flavoproteini, piridin- nukleotidi, feredoksin i plastocijanin.

Gotovo svi kemijski procesi u svjetlosnim reakcijama odvijaju se preko pet proteinskih kompleksa: PSII, citokroma, PSI, NADP<sup>+</sup>-reduktaze i ATPaze.

Većina apsorbirane energije se koristi u kemijskim reakcijama fotosinteze, dio se oslobađa u obliku topline, a dio kao fluorescencija klorofila kada klorofil pri povratku u osnovno stanje otpušta foton (Roger i Weiss, 2001).

### **1.2.2. Utjecaj svjetlosti na stopu fotosinteze**

Ovisnost fotosinteze o kvaliteti i količini svjetlosti je velika. Povećanjem intenziteta osvijetljenja brzina fotosinteze se u početku linearno povećava, zatim se postupno smanjuje i konačno, kada se fotosintetski aparat zasiti svjetlošću, poprima konstantnu vrijednost. U različitim vrstama to se zasićenje pojavljuje različitim brzinama. Još jače osvijetljenje može uzrokovati svjetlosni stres (Pevalek-Kozlina, 2003).

Obzirom na intenzitet svjetlosti na kojem rastu, biljke možemo podijeliti na biljke sjene koje rastu u zasjenjenom okolišu i biljke sunca koje su prilagođene punoj sunčevoj svjetlosti. Kod biljaka sjene zasićenje se pojavljuje relativno brzo, a kod biljaka sunca tek pri visokom intenzitetu osvijetljenja.

Svjetlosni stres prvo djeluje na fotosintezu što se može uočiti kod neprilagođenih biljaka u kojima dolazi do oštećenja fotosintetskog aparata, uslijed povećanog intenziteta fotosinteze

opada. U biljaka osjetljivih na svjetlost može doći i do fotoinhibicije te do gubitka boje listova, a neki puta i do ugibanja listova. To se uglavnom događa u biljkama sjene, ali može biti prisutno i u biljkama sunca koje su naglo izložene visokim intenzitetima osvjetljenja. U tom slučaju fotoinhibicija je inom reverzibilna, jer se takve biljke mogu zahvaljujući različitim mehanizmima aklimatizirati.

Fotoinhibiciju uzrokuje svjetlost koju apsorbira klorofil. Svi stresni uvjeti koji dovode do inhibicije fotosinteze, npr. zatvaranje pučolice i u uvjetima suše ili inaktivacija enzima uslijed visokih ili niskih temperatura, snažno pojačavaju fotoinhibiciju. Fotoinhibicija je posljedica svjetlosnog prezasićenja fotosintetskog aparata, što može dovesti do stvaranja toksičnih fotoprodukata kao što su singletni kisik, hidroksilni radikali i superoksidni anion.

Najvažniji izvori radikala kisika tijekom fotosinteze su reducirani akceptori elektrona PSI (npr. ferredoksin) koji prenose elektrone na kisik ukoliko se redoks-lanac koji dovodi do nastanka  $\text{NADP}^+$  reducira zbog nakupljanja elektrona. Prvo se nastaje radikal superoksida, zatim vodikov peroksid te konačno hidroksilni radikal. Singletni kisik može nastati tijekom fotosinteze ako se ekscitacijska energija s tripletnog klorofila prenese izravno na kisik. Ovi spojevi nespecifično reagiraju s lipidima, proteinima, nukleinskim kiselinama, pigmentima i drugim molekulama, uzrokujući njihovu fotooksidacijsku razgradnju (Pevalek-Kozlina, 2003).

Fotooksidacija se može spriječiti tako da se ukloni superoksid ili spriječi njegov nastanak. Uklanjanje vrši superoksid dismutaza (SOD) dok se nastajanje superoksida može spriječiti sakupljanjem i rasipanjem viška energije prije nego dođe do reakcijskog centra. Zato su zaslužni karotenoidi iz ksantofilnog ciklusa, zeaksantin, violaksantin i anteraksantin. No, ovi mehanizmi ne mogu u potpunosti zaštititi biljke od fotooksidacijskog oštećenja. Dodatnu zaštitu pruža gibanje kloroplasta i listova tijekom se promjenom položaja može znatno smanjiti izlaganje fotosintetskih pigmenta visokom intenzitetu osvjetljenja (Pevalek-Kozlina, 2003).

U biljaka koje su bile izložene višem intenzitetu osvjetljenja uočeno je sniženje stope fotosinteze, smanjuje se prijenos elektrona i fotofosforilacija. Biljka se pokušava zaštititi tako da povećava količinu pigmenta koji su zaduženi za preuzimanje viška energije i zaštitu biljke kao što su karotenoidi i flavonoidi (Mahdavian i sur., 2008). Različite biljke imaju različite prilagodbe na promjene intenziteta svjetlosti.

Premali intenzitet svjetlosti također može biti štetan za biljke sunca koje onda ne mogu vršiti fotosintezu, ali i za biljke sjene kada apsorbirana svjetlost prevrši kapacitet

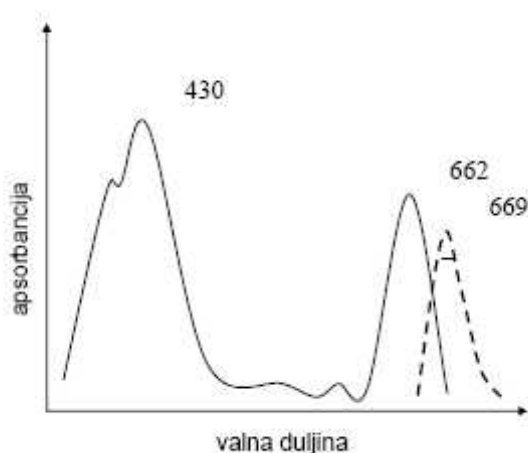
fotosintetskog aparata za pretvorbu svjetlosne energije u kemijsku (Osmond, 1994; Valladares i Pearcy, 1997).

### 1.3. FLUORESCENCIJA Klorofila A

Za istraživanje utjecaja različitih uvjeta osvjetljenja na fotosintezu izabrala sam analizu fluorescencije klorofila *a in vivo*, jednostavnu tehniku za proučavanje u inakim različitim ekološkim imbenicima na učinkovitost fotosintetskog aparata (Roger i Weiss, 2001).

Svjetlost emitirana fluorescencijom predstavlja vrlo mali udio u svjetlosti reflektiranoj s listova biljaka pa se može detektirati samo preciznim uređajima, fluorimetrima. U posljednjem desetljeću su mjerenja i analize fluorescencije klorofila postali nezaobilazni u istraživanjima primarnih reakcija fotosinteze. U području fiziologije i ekofiziologije bilja primjenjuje se nekoliko metoda mjerenja fluorescencije, a jedna od njih je metoda saturacijskog pulsa koju sam koristila u svom radu.

U optimalnim okolišnim uvjetima se najveći dio apsorbirane energije (oko 95%) koristi za fotokemijske reakcije fotosinteze, međutim dio se energije gubi u obliku topline i svjetlosti, pri čemu nastaje fenomen koji nazivamo fluorescencija klorofila. Svjetlost emitirana fluorescencijom klorofila uvijek je veće valne duljine i manje energije od one koju su apsorbirali listovi (Roger i Weiss, 2001) što znači da fluorescencijski spektar klorofila ima maksimum u crvenom području, pri nešto većoj valnoj duljini od maksimuma apsorpcijskog spektra (slika 5).



**Slika 5.** Apsorpcijski spektar klorofila *a* (—) i spektar svjetlosti oslobođene fluorescencijom (----).



Glavnina fluorescencije klorofila u intaktnim listovima potječe sa PSII pa se stoga izmjerena fluorescencija smatra odrazom stanja PSII. U lancu prijenosa elektrona, u tilakoidnim membranama kloroplasta, elektroni se prenose s PSII na molekule plastokinona. Intenzitet fluorescencije ( $\Phi_F$ ) u velikoj mjeri ovisi o redoks-stanju plastokinona.

Pri niskom intenzitetu svjetlosti, molekule plastokinona su oksidirane, tj. mogu primiti elektrone. U takvim uvjetima se ekscitacijska energija s velikom učinkovitošću (većinom od 95%) troši na fotokemijske reakcije te je intenzitet fluorescencije vrlo nizak. Međutim, pri jačem intenzitetu svjetlosti ne može se iskoristiti sva apsorbirana svjetlosna energija zbog nedostatka oksidiranih plastokinona koji bi mogli primiti elektrone s PSII pa se u takvim uvjetima već i dio apsorbirane svjetlosne energije oslobađa u obliku fluorescencije (Quibit, 2006).

Ukoliko se nakon početnog porasta intenziteta fluorescencije ustali određena stopa prijenosa elektrona i dinamika odvijanja Calvinovog ciklusa, dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije, tzv. gašenja fluorescencije („quenching“). Razlikuju se dva tipa gašenja fluorescencije. Prvi tip naziva se fotokemijsko gašenje („photochemical quenching“, qP) u kojem se svjetlosna energija pretvara u kemijsku energiju, koja se kasnije koristi za pokretanje fotosinteze. Većina akceptora elektrona u lancu prijenosa elektrona je oksidirana, tj. raspoloživa za primanje elektrona. Zbog toga što je svjetlost, potrebna biljci za fotosintezu, često mala u usporedbi sa apsorbiranom svjetlošću, mnogo se tog viška energije oslobađa kao toplina. To se naziva nefotokemijsko gašenje („nonphotochemical quenching“, NPQ) (Ritchie, 2006).

Promatranja fluorescencije su prvi objavili Kautsky i Hirsch (1931) i pokazali da fluorescencija klorofila *a* ima brzi rast do maksimalne vrijednosti. Zatim slijedi polagani pad dok se nakon nekoliko minuta ne postigne stabilna razina. Također su pokazali da je polagani pad fluorescencije povezan s povećanjem asimilacije CO<sub>2</sub>. Otkriće „Kautsky efekta“ mjerenje fluorescencije klorofila razvijeno je kao jedna od najčešće korištenih metoda u istraživanju fotosinteze te fizičkog stanja fotosintetskog aparata u biljci. Danas se brojni pokazatelji fluorescencije klorofila koriste za određivanje fotosintetskog kapaciteta lista i funkcije fotosintetskog aparata, a promjena krivulje fluorescencije kod listova adaptiranih na mrak daje važne informacije o sakupljanju svjetlosne energije, transportu elektrona, energetici tilakoidne membrane i procesima CO<sub>2</sub> fiksacije (Babani i Lichtenthaler, 1996).

#### 1.4. VODENA LE A (*Lemna minor* L.)

Vodene le e su kozmopolitske biljke iz porodice *Lemnaceae*. To su male vodene biljke koje rastu slobodno plivaju i na površini vode ili neposredno ispod nje, ali nisu nikada pri vrš ene za podlogu (Huebert i Shay, 1993). Rasprostranjene su u svim klimatskim zonama osim u pustinjama i tundrama. Filogenetski, one su monokotiledone (jednosupnice). Porodica broji oko 40 kozmopolitski rasprostranjenih vrsta (Hillman i Culley, 1978), a unutar porodice razlikujemo etiri roda: *Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia* i *Wolffiella* (Boniardi i sur., 1994).

Biljke iz porodice *Lemnaceae* imaju tri važne karakteristike. Prva je poseban na in njihovog vegetativnog razmnožavanja. Svaki listi ima dvije meristemske regije koje stvaraju nove listi e. Svaki listi može stvoriti 10-20 novih biljaka nakon ega tkivo mati ne biljke propada. Druga karakteristika je ta što listi i ne ostaju trajno povezani sa maj inskom biljkom ine i kompleksne strukture, ve se odvajaju u kolonije koje predstavljaju svega nekoliko vegetativnih generacija. Tre a karakteristika je zna ajna progresivna redukcija svih struktura koje nisu esencijalne za život na površini ili neposredno ispod površine staja ih voda te gotovo potpuno odsustvo drvenastog tkiva (Hillman i Culley, 1978).

Vodena le a se sastoji od dva dijela, listi a („frond“) i korijena. Biljke tvore kolonije koje se sastoje od dva ili više listi a (Wang, 1990).

*Lemna minor* ima samo jedan korijen koji vjerojatno služi za održavanje ravnoteže pri blagim strujanjima vode te sprje ava sljepljivanje i preklapanje listi a što bi smanjilo koli inu svjetlosti u koloniji (Landolt, 1986).

#### 1.5. LEMNA -TEST

Kao pokazatelj u inka razli itih uvjeta osvjetljenja, u ovom istraživanju sam koristila Lemna-test koji se esto koristi za procjenu stresnih u inaka (Wang, 1991).

Od viših biljaka se kao testni organizmi esto koriste vodene biljke, i to osobito iz porodice vodenih le a, *Lemnaceae*. Razlog tome je što su vodene le e vrlo prikladne za rad u laboratorijskim uvjetima. Lako se uzgajaju i održavaju u kulturi *in vitro*, malih su dimenzija i brzo se razmnožavaju. Jednostavne su gra e i imaju vegetativan na in razmnožavanja kojim nastaju geneti ki identi ne biljke (klonovi). Tako er, sterilni i dobro definirani uvjeti

kultivacije, te neovisnost o godišnjem dobu, klimi i temperaturi su prednosti testova koji se izvode na biljkama koje rastu u kulturi (Lewis, 1995; Wang, 1991).

Pokazatelji utjecaja različitih osvjetljenja na vodenu leću, koji se mogu pratiti Lemna-testom, su prirast broja listića, prirast mase suhe i svježe tvari, ukupna površina biljke, duljina korjen i a, koncentracija fotosintetskih pigmenta, intenzitet disanja, fotosintetska aktivnost i ultrastrukturne promjene. Najčešće mjereni parametri u Lemna-testu su prirast broja listića, gdje se u određenim vremenskim razmacima broji svaki vidljivi listić (Wang, 1991), masa biljaka i količina klorofila *a* (Lakatos i sur., 1993).

Po ISO standardu (ISO/CD 20079) vrijeme trajanja testa je 7 dana. Kao osnovni parametar mjeri se broj listića, uz što je obavezno mjeriti drugi parametar koji može biti površina listića, masa suhe tvari ili klorofil po ISO 10260. Vrijednosti pH po standardu moraju se kretati između 5 i 8, a temperatura  $24 \pm 2$  °C.

Testovi se mogu izvoditi na dva načina, kao statični ili kao protočni. Statični eksperimenti su jednostavniji i ekonomičniji (Wang, 1990). Provode se bez izmjene hranjivog medija, za razliku od protočnih, u kojima se hranjivi medij nadopunjava za vrijeme izlijevanja starog medija ([www.meti.go.jp...](http://www.meti.go.jp...)).

Fotosinteza je biološki važan proces u kojem fotoautotrofni organizmi koriste energiju Sun evog zra enja za sintezu organskih spojeva koji se bez te energije ne bi mogli sintetizirati. Energija, pohranjena u molekulama organskih spojeva, koristi se za brojne procese u stanicama biljaka. Iz tog razloga, svjetlost je neophodna za njihov život.

S obzirom da na fotosintezu utje u brojni vanjski imbenici, me u kojima su kvaliteta i intenzitet osvjetljenja, odlu ila sam istražiti kakav e u inak na fotosintezu imati izlaganje biljke razli itim svjetlosnim uvjetima.

Biljkama najviše pogoduju crveni i plavi dio spektra pa sam u svom radu istražila rast i fotosintezu vodenih le a u uvjetima osvjetljenja s ve im udjelom crvenog i plavog dijela spektra u odnosu na osvjetljenje hladnom bijelom svjetloš u. Kako bih utvrdila ovisnost kvalitete i intenziteta svjetlosti, pri svakom od dvaju analiziranih djelotvornih spektara biljke sam izložila uvjetima nižeg ( $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) i višeg ( $80 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) intenziteta osvjetljenja.

Kako bih istražila u inak razli itih uvjeta osvjetljenja na rast vodene le e provela sam standardizirani Lemna-test u sklopu kojeg sam pratila prirast broja listi a te biomase vodene le e *Lemna minor* L. U inak svjetlosti na fotosintezu pratila sam odre uju i koncentraciju fotosintetskih pigmenata te pokazatelje fluorescencije klorofila *a in vivo*, koji govore o funkciji fotosintetskog aparata.

## 3.1. MATERIJAL

3.1.1. Kultura vodene le e (*Lemna minor* L.) u uvjetima in vitro

*Lemna minor* je sakupljena u Botani kom vrtu Prirodoslovno–matemati kog fakulteta Sveu ilišta u Zagrebu. Prilikom uvo enja vodene le e u kulturu *in vitro* biljke su sterilizirane etanolom i živinim kloridom (Krajn i i Devidé, 1980) i dalje uzgajane u sterilnim uvjetima. Za dugotrajnu kultivaciju vodene le e korištena je Pirson i Seidel (PS) hranjiva podloga (Pirson i Seidel, 1950), a za eksperimentalnu analizu hranjiva podloga po Steinbergu (ISO/CD 20079). Sastav hranjivih podloga prikazuje Tablica 1.

**Tablica 1.** Sastav hranjivih podloga po Pirson i Seidelu (1950) – A i Steinbergu (ISO/CD 20079) – B.

A			B		
MAKROELEMENTI	mg/L	mmol/L	MAKROELEMENTI	mg/L	mmol/L
KNO <sub>3</sub>	400	3,95	KNO <sub>3</sub>	350	3,46
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200	1,47	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	90	0,66
			K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,6	0,072
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	300	1,21	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	100	0,41
CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O	804	5,46	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ×4H <sub>2</sub> O	295	1,25
MIKROELEMENTI	µg/L	µmol/L	MIKROELEMENTI	µg/L	µmol/L
MnCl <sub>2</sub> ×4H <sub>2</sub> O	300	1,5	MnCl <sub>2</sub> ×4H <sub>2</sub> O	180	0,91
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	500	8,1	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	120	1,94
Na <sub>2</sub> -EDTA×2H <sub>2</sub> O	1860	4,99	Na <sub>2</sub> -EDTA×2H <sub>2</sub> O	1500	4,03
željezni citrat	5000	20	FeCl <sub>3</sub> ×6H <sub>2</sub> O	760	2,81
			Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O	44	0,18
			ZnSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	180	0,63
ORGANSKI DODACI	g/L	mmol/L			
saharoza	10	29,2			
asparagin	0,1	0,66			

S obzirom da su biljke bile uzgajane na hranjivoj podlozi PS, prije samog pokusa biljke su prilagođene na hranjivu podlogu po Steinbergu u trajanju od 7-10 dana. Nakon prilagodbe, biljke sam nasadila na hranjivu podlogu po Steinbergu (pH = 5,5) te izložila različitim uvjetima osvjetljenja.

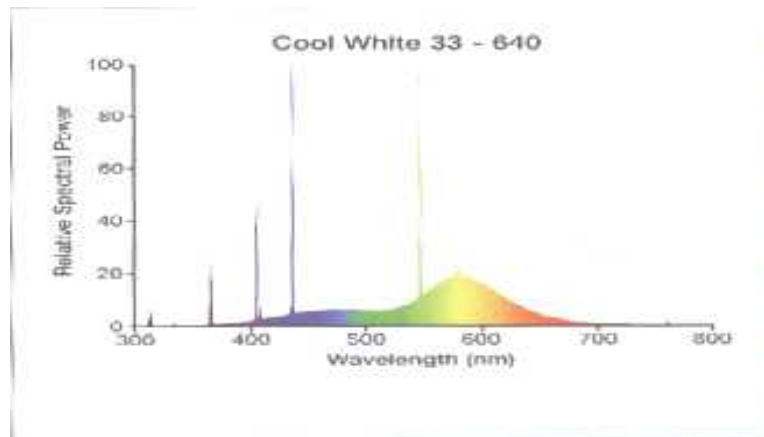
U pokusima sam koristila Erlenmeyerove tikvice od 100 ml koje sam punila s oko 60 ml hranjive podloge, za epila vatom i aluminijskom folijom te sterilizirala autoklaviranjem pri temperaturi od 120 °C i tlaku od 0,15 MPa u trajanju od 18 minuta. Metalni i ostali pribor sterilizirala sam autoklaviranjem u jednakim uvjetima, ali u trajanju od 60 minuta. Pri presaivanju biljaka metalni pribor sam dodatno sterilizirala uranjanjem u 96%-tni etanol i spaljivanjem.

Biljke sam presaivala u laminaru (komori s horizontalnim strujanjem zraka). U svaku Erlenmeyerovu tikvicu sam inokulirala po jednu koloniju vodene lepe (s 3-5 listi a) iz prethodno uzgojene kulture na podlozi za prilagodbu. Biljke sam nakon presaivanja prenijela u klimu komoru gdje su rasle uz fotoperiod od 16 sati svjetla i 8 sati tame. Temperatura u komori iznosila je  $24 \pm 2$  °C.

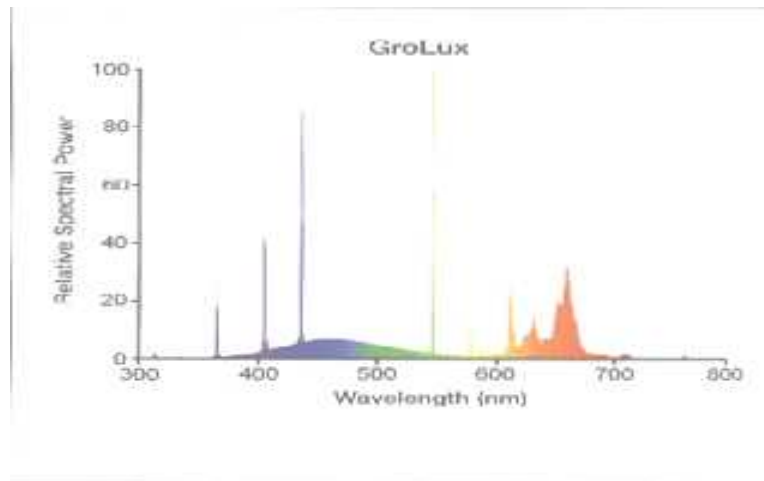
#### 3.1.2. Uvjeti osvjetljenja

Kako bih ispitala u inak različitim intenzitetima fluorescentnog osvjetljenja s različitim djelotvornim spektrom osvjetljenja, biljke su u klimu komori podvrgnute različitim uvjetima osvjetljenja.

Osim uobičajenom fluorescentnom hladnom bijelom svjetlošću u žarulja „Cool White“ (Osram, Njemačka), čiji je djelotvorni spektar prikazan na Slici 6., biljke su osvjetljene i fluorescentnom svjetlošću u sive udjelom crvenog i plavog dijela spektra žarulja „GroLux“ (Sylvania, SAD), čiji je djelotvorni spektar prikazan na Slici 7.



**Slika 6.** Spektar hladne bijele svjetlosti žarulje „Cool White“ (Preuzeto sa internetske stranice [www.sylvania-lamps.com](http://www.sylvania-lamps.com))



**Slika 7.** Spektar „GroLux“ žarulje s većim udjelom crvenog i plavog dijela spektra (Preuzeto sa internetske stranice [www.sylvania-lamps.com](http://www.sylvania-lamps.com))

Pri svakom od dvaju analiziranih djelotvornih spektara, biljke su uzgajane pri dva različita intenziteta osvjetljenja ( $40$  i  $80 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). U Tablici 2. dan je pregled istraženih uvjeta osvjetljenja uz odgovarajuće oznake tretmana korištenih u istraživanju:

**Tablica 2.** Istraživani uvjeti osvjetljenja

	„Cool White“	„GroLux“
$40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$	CW40	GL40
$80 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$	CW80	GL80

## 3.2. METODE

U inak različitim uvjetima osvjetljenja određivala sam prateći rast biljaka Lemna testom, a u inak na fotosintezu određivala sam mjere i sadržaj fotosintetskih pigmenta i pokazatelje fluorescencije klorofila.

### 3.2.1. LEMNA-TEST

Rast vodenih lea praćen je korištenjem standardiziranog stativnog Lemna testa (ISO/CD 20079). Za razliku od standardiziranog Lemna testa koji prati rast biljaka kroz 7 dana, u ovom istraživanju sam pratila rast vodene lea kroz 14 dana. Stopu prirasta broja biljaka i mase svježe tvari izračunala sam prema spomenutom ISO standardu (ISO/CD 20079). Uz to, odredila sam i omjer mase svježe i suhe tvari.

#### Stopa rasta vodene lea - broj biljaka

U inak različitim uvjetima osvjetljenja na rast vodene lea *Lemna minor* L. procijenjen je određivanjem stope rasta broja listića vodene lea tijekom 14 dana. Stopa rasta broja biljaka određena je brojanjem listića vodene lea tijekom 14 dana rasta, pri čemu je brojana svaka pa i najmanja biljka vidljiva golim okom. Dobiveni podaci uvrštavani su u sljedeći izraz:

$$\text{Stopa rasta broja biljaka} = \frac{\ln(N_n) - \ln(N_0)}{n},$$

$N_0$  = broj biljaka nulti dan (dan nastavljanja)

$N_n$  = broj biljaka n-ti dan

$n = 1, 3, 5, 7, 10, 12$  i  $14$

#### Stopa rasta vodene lea - masa svježe tvari

U inak na rast vodene lea *Lemna minor* L. procijenjen je i određivanjem stope prirasta mase svježe tvari nakon tjedan dana izlaganja različitim uvjetima osvjetljenja. Biljke sam vagala nultog dana te nakon sedam dana pokusa. Dobivene podatke uvrštavala sam u sljedeću formulu:



$$\text{Stopa rasta mase svježe tvari} = \frac{\ln(m_n) - \ln(m_0)}{n}$$

$m_0$  = broj biljaka nulti dan

$m_n$  = broj biljaka n-ti dan

nulti dan = dan nasa ivanja

$n = 7$

### Omjer mase suhe i svježe tvari

Nakon sedam dana uzgoja pri specifičnim uvjetima osvjetljenja, biljke sam isprala destiliranom vodom, posušila me u listovima filter papira, izvagala i dobila masu svježe tvari. Biljke sam potom sušila tijekom 12 h pri 60 °C do konstantne mase, što predstavlja masu suhe tvari. Dijeljenjem ta dva parametra (masa suhe tvari / masa svježe tvari) izračunala sam njihov omjer.

### 3.2.2 SADRŽAJ PIGMENATA

Sadržaj pigmenata određeni je spektrofotometrijski koristeći UV/VIS spektrofotometar Specord (Analytik Jena). Uzorke svježeg tkiva mase 30 mg ekstrahirala sam u 1,5 ml 80%-tnog hladnog acetona na ledu. Nakon 10 minuta centrifugiranja na 5000 g, svakom je uzorku izmjeren volumen dobivenog supernatanta koji je zatim kvantitativno prenesen u kivetu. Sadržaj klorofila *a* odredila sam mjerenjem apsorbanije na valnoj duljini od 663 nm, klorofila *b* na valnoj duljini od 646 nm i karotenoida na valnoj duljini od 470 nm (Arnon, 1949). Sadržaj fotosintetskih pigmenata određeni je prema sljedećim formulama (Lichtenthaler, 1987):

a) za klorofil *a*:

$$c_a = \frac{12,21 \times A_{663} - 2,81 \times A_{646}}{l \times 1000 \times m} \times V$$

$c_a$  = sadržaj klorofila *a* (mg / g svježe tvari)

$A_X$  = apsorbanija uzoraka pri određenim valnim duljinama

$V$  = volumen uzorka (ml)

$l$  = duljina optičkog puta = 1 cm

$m$  = masa uzorka = 0,03 g

b) za klorofil *b*:

$$c_b = \frac{20,13 \times A_{646} - 5,03 \times A_{663}}{l \times 1000 \times m} \times V$$

$c_b$  = sadržaj klorofila *b* (mg / g svježe tvari)

$A_X$  = apsorbancija uzorka pri određenim valnim duljinama

$V$  = volumen uzorka (ml)

$l$  = duljina optičkog puta = 1 cm

$m$  = masa uzorka = 0,03 g

c) za ukupne karotenoide:

$$c_k = \frac{(1000 \times A_{470} - 3,27 \times c_a - 104 \times c_b) / 198}{l \times 1000 \times m} \times V$$

$c_k$  = sadržaj ukupnih karotenoida (mg / g svježe tvari)

$A_X$  = apsorbancija uzorka pri određenim valnim duljinama

$V$  = volumen uzorka (ml)

$l$  = duljina optičkog puta = 1 cm

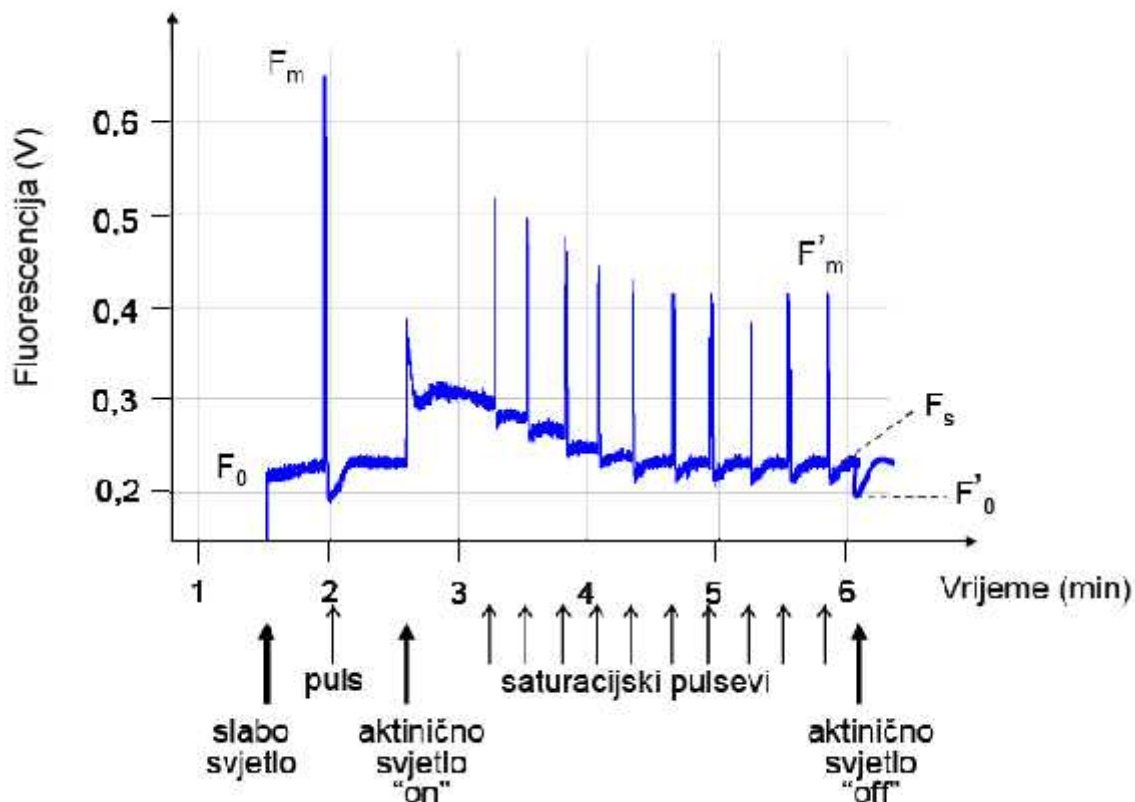
$m$  = masa uzorka = 0,03 g

### 3.2.3. Mjerenje fluorescencije klorofila *a* *in vivo*

Fluorescenciju klorofila *a* *in vivo* mjerila sam metodom saturacijskog pulsa pomoću fluorometra Qubit (Canada). Metoda saturacijskog pulsa (Schreiber i Klughammer, 1994) temelji se na primjeni dovoljno jakog (saturacijskog) svjetlosnog impulsa uslijed kojeg dolazi do potpune redukcije vezanog plastokinona ( $Q_A$ ). Na taj način je fotokemijsko gašenje fluorescencije zaustavljeno, a preostalo gašenje je nefotokemijsko, tj. toplina. Kada su svi plastokinoni potpuno oksidirani, reakcijski centri su potpuno otvoreni pa elektroni sudjeluju u fotokemijskim reakcijama. Ovo se događa u uvjetima slabog osvjetljenja i tada se mjeri minimalni prinos fluorescencije ( $F_0$ ). Maksimalni prinos fluorescencije ( $F_m$ ) mjeri se u

uvjetima jakog osvjetljenja kada su plastokinoni potpuno reducirani i reakcijski centri zatvoreni.

Tijek mjerenja fluorescencije klorofila *a* prikazan je na Slici 8.



**Slika 8.** Mjerenje fluorescencije klorofila metodom saturacijskog pulsa

Prije mjerenja, Erlenmeyerove tikvice s vodenom le om držala sam 30 minuta u potpunoj tami da bi se molekule plastokinona u potpunosti oksidirale. List prilagođen uvjetima tame koristila sam za mjerenje vrijednosti  $F_0$  i  $F_m$ . Da bi započelo mjerenje list se obasjava crvenom svjetlošću u vrlo niskog intenziteta (oko  $1 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), što je nedovoljno za odvajanje naboja i pokretanje fotokemijskih reakcija. Izvor crvene svjetlosti niskog intenziteta je luminiscentna žarulja (LED – eng. light emitting diode) čiji je intenzitet osvjetljenja moguće podesiti odgovarajućim potenciometrom. U takvim uvjetima se mjeri minimalna razina fluorescencije klorofila u listu koji je prilagođen na uvjete tame ( $F_0$ ). Nakon toga se primjeni saturacijski puls, tj. kratkotrajna svjetlost vrlo visokog intenziteta ( $3000 - 5000 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) koja uzrokuje redukciju svih akceptora elektrona s reducirajuće

strane PSII i rezultat koje je maksimalna vrijednost fluorescencije,  $F_m$ . U tom trenutku nije prisutno fotokemijsko gašenje fluorescencije. Iz izmjerenih vrijednosti  $F_0$  i  $F_m$  izra unava se optimalna u inkovitost PSII.

Zatim slijedi uklju ivanje bijelog aktini nog svjetla koje je dovoljno jakog intenziteta ( $90 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) da može pokrenuti fotosintezu.

Aktini no svjetlo ostaje uklju eno do kraja pokusa, tijekom kojeg se u odre enim intervalima primjenjuju saturacijski pulsevi, pri emu se bilježe vrijednosti maksimalne fluorescencije ( $F'_m$ ) te fluorescencije ravnotežnog stanja ( $F_s$ ) u listu prilago enome na uvjete svjetla. Kao izvor bijele aktini ne svjetlosti te saturacijskih pulseva koristi se halogena lampa, iji je intenzitet osvjetljenja mogu e podesiti pomo u odgovaraju eg potencijometra. Mjerenje traje 10 minuta, odnosno dok se vrijednosti  $F_s$  i  $F'_m$  ne ustale. Nakon toga opet slijedi obasjavanje lista crvenom svjetloš u vrlo niskog intenziteta kako bi se dobila vrijednost  $F'_0$ .

Ista mjerenja sam izvela pri aktini kom svjetlu intenziteta 300 i 600  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Posljednje mjerenje za svaku koli inu aplicirane svjetlosti uzela sam kao relevantno za izra un vrijednosti  $\Phi_{\text{PSII}}$ , rel. ETR i NPQ.

Pokazatelji fluorescencije klorofila *a* odre eni su prema sljede im izrazima:

#### 1. Optimalni prinos PSII (maksimalna u inkovitost PSII):

$$(F_m - F_0) / F_m = F_v / F_m$$

Razlika izme u maksimalne i minimalne fluorescencije naziva se varijabilnom fluorescencijom ( $F_v$ ). Omjer varijabilne i maksimalne fluorescencije u listu prilago enom na uvjete tame je mjera optimalnog prinosa PSII, tj. njegove u inkovitosti u uvjetima kada su svi reakcijski centri oksidirani. Za ve inu biljnih vrsta optimalna vrijednost iznosi  $\approx 0,83$ .

#### 2. Efektivna u inkovitost PSII ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ):

$$\Phi_{\text{PSII}} = (F'_m - F_s) / F'_m$$

$F_s$  (fluorescencija ravnotežnog stanja) je prinos fluorescencije lista prilago enog odre enoj koli ini svjetlosti.  $F'_m$  (maksimalna fluorescencija) mjeri se nakon primjene impulsa saturacijske svjetlosti u listu prilago enom uvjetima svjetla. Iz ovih podataka ra unava se efektivna u inkovitost PSII ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ), koji je mjera udjela svjetlosti apsorbirane klorofilom

vezanim uz PSII i energije iskorištene u fotokemijskim reakcijama (Maxwell i Johnson, 2000)

3. Stopa prijenosa elektrona (ETR):

$$ETR = \Phi_{PSII} \times PFD \times 0,5$$

Budu i da  $\Phi_{PSII}$  predstavlja efektivnu uinkovitost fotokemijske reakcije na PSII, ta se vrijednost može koristiti za izračun stope neto prijenosa elektrona. PFD (photon flux density) je intenzitet apsorbirane svjetlosti ( $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a faktor 0,5 uzima se zbog pretpostavke o podjednakoj eksitaciji PSI i PSII.

4. Fotokemijsko gašenje (qP):

$$qP = (F'_m - F_s) / (F'_m - F'_0)$$

qP odražava redoks-stanje primarnog akceptora elektrona PSII (plastokinona), tj. pokazatelj je udjela oksidiranih reakcijskih centara na PSII.

5. Nefotokemijsko gašenje (NPQ):

$$NPQ = (F_m - F'_m) / F'_m$$

NPQ odražava gubitak energije u obliku topline, povezano s promjenom pH vrijednosti lumena tilakoida.

### 3.3. Statistička obrada podataka

Svaki prikazani rezultat aritmetička je sredina određenog broja replika dobivenih iz tri nezavisna pokusa. Za određivanje prirasta broja biljaka imala sam 20 replika, za određivanje prirasta mase svježe tvari te omjera mase suhe i svježe tvari 12 replika, za određivanje sadržaja pigmenta 6 replika, a za određivanje fluorescencije klorofila koristila sam 8 replika. Odstupanje od aritmetičke sredine izraženo je kao standardna pogreška. Usporedba dobivenih rezultata provedena je analizom varijance (one-way ANOVA) te uporabom Newman-Keuls testa pomoću računalnog programa STATISTICA 8.0 (Stat Soft Inc., SAD).

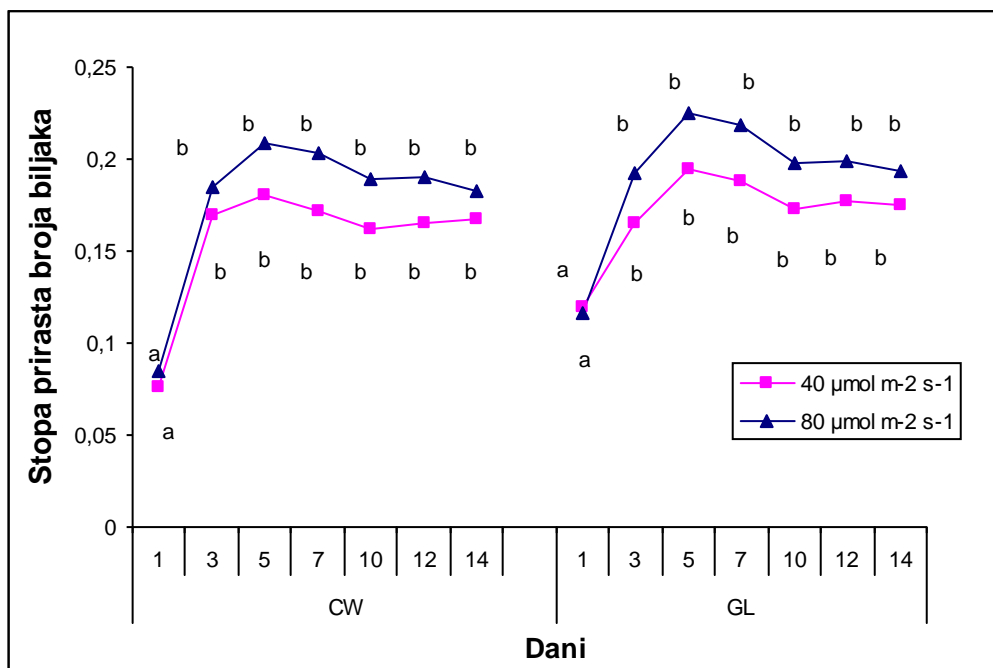
#### 4.1. U INAK RAZLI ITIH UVJETA OSVJETLJENJA NA STOPU RASTA VODENE LE E

U inak razli itih uvjeta osvjetljenja na vodenu le u *Lemna minor* L. istražen je provo enjem stati kog Lemna- testa. Biljke su nasa ene na hranjivu podlogu po Steinbergu te inkubirane u klima komori pri 4 razli ita uvjeta osvjetljenja: pri nižem intenzitetu ( $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) osvjetljenja „Cool White“ žaruljom (CW40), višem intenzitetu ( $80 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) osvjetljenja „Cool White“ žaruljom (CW80), nižem intenzitetu ( $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) osvjetljenja „GroLux“ žaruljom (GL40) i višeg intenziteta ( $80 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) osvjetljenja „GroLux“ žaruljom. (GL80). Nakon izlaganja razli itim uvjetima osvjetljenja odredila sam stopu prirasta broja i mase svježe tvari biljaka, te omjer mase suhe i svježe tvari.

##### Stopa prirasta broja listi a

Broj listi a vodene le e eksponencijalno je rastao pri svim istraženim uvjetima osvjetljenja tijekom 14 dana uzgoja.

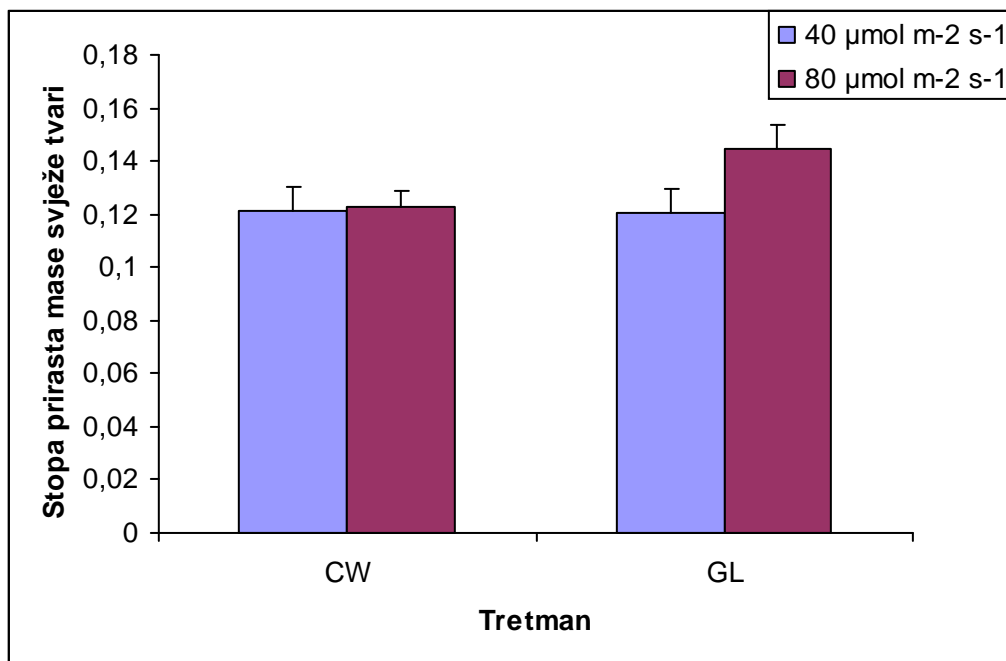
Neovisno o tipu i intenzitetu osvjetljenja, vodene le e su pokazale zna ajan porast broja listi a ve tre eg dana pokusa (pri osvjetljenju CW40 za 123%, CW80 za 118%, GL40 za 38% i GL80 za 65%). Sli na stopa prirasta broja biljaka zadržala se svih 14 dana pokusa, bez zna ajnije razlike izme u pojedinih dana. Vidljiva je blaga tendencija pada stope rasta nakon petog dana pokusa (pri osvjetljenju CW40 za 5-9%, CW80 za 2-14%, GL40 za 3-12%, te GL80 za 3-16%). Pri oba tipa osvjetljenja (CW i GL) zabilježene su više stope prirasta broja biljaka pri višem intenzitetu osvjetljenja iako porast nije bio statisti ki zna ajan (Slika 9).



**Slika 9.** Stopa prirasta biljaka uzgajanih tijekom 14 dana na hranjivoj podlozi po Steinbergu pri intenzitetu 40 i 80  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$  osvjetljenja „Cool White“ (CW) i „GroLux“ (GL) žaruljom. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost 20 replika. Standardne pogreške nisu prikazane, a iznose do 10% srednje vrijednosti. Razlika slova označava statistički značajne rezultate ( $p < 0,05$ , Newman Keuls).

### Stopa prirasta mase svježe tvari

Izlaganje različitim uvjetima osvjetljenja nije značajno utjecalo na stopu prirasta mase svježe tvari. Nakon 7 dana uzgoja uz osvjetljenje „Cool White“ žaruljama prirast mase svježe tvari bio je podjednak pri oba istražena intenziteta osvjetljenja. Uz osvjetljenje „GroLux“ žaruljama s većim udjelom crvenog i plavog dijela spektra, stopa prirasta mase svježe tvari porasla je s povećanjem primijenjenog intenziteta osvjetljenja. Iako je na tretmanu GL80 zabilježen porast od 18% u odnosu na GL40, taj porast nije statistički značajan (Slika 10).

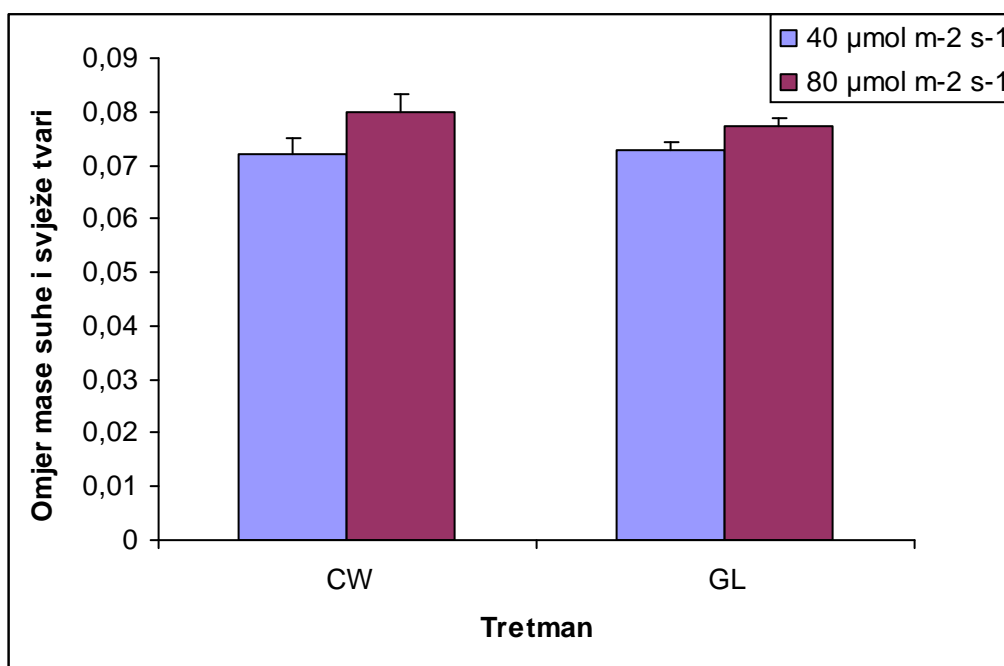


**Slika 10.** Stopa prirasta mase svježe tvari biljaka nakon 7 dana uzgoja na hranjivoj podlozi po Steinbergu pri intenzitetu 40 i 80  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$  osvjetljenja „Cool White“ (CW) i „GroLux“ (GL) žaruljom. Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti od 10 replika  $\pm$  standardna pogreška. Nije bilo statistički značajne razlike između tretmana.

### Omjer mase suhe i svježe tvari

Omjer mase suhe i svježe tvari nakon 7 dana uzgoja pri osvjetljenju GroLux žaruljom nije se značajnije razlikovao od onog u biljkama osvjetljenih „Cool White“ žaruljom (Slika 11). Izlaganje višim intenzitetima (80  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) oba tipa osvjetljenja rezultiralo je jedva primjetnim porastom omjera u odnosu na biljke osvjetljene nižim intenzitetom (11% porast u biljkama osvjetljenim „Cool White“ žaruljom, 7% u biljkama osvjetljenim „GroLux“ žaruljom).

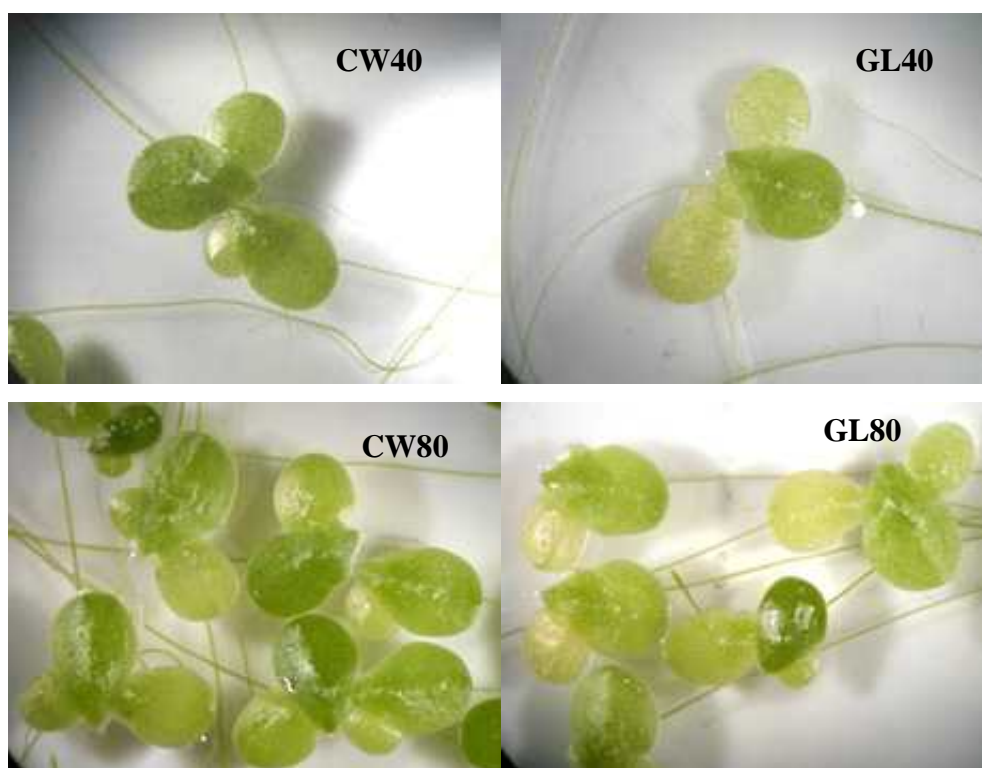




**Slika 11.** Omjer mase suhe i svježe tvari biljaka nakon 7 dana uzgoja na hranjivoj podlozi po Steinbergu pri intenzitetu 40 i 80  $\mu\text{mol fotona m}^{-2}\text{s}^{-1}$  osvjetljenja „Cool White“ (CW) i „GroLux“ (GL) žaruljom. Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti od 10 replika  $\pm$  standardna pogreška. Nije bilo statistički značajne razlike između tretmana.

#### 4.2. U INAK RAZLI ITIH UVJETA OSVJETLJENJA NA SADRŽAJ FOTOSINTETSKIH PIGMENATA

Promatraju i morfološki izgled biljaka primijetila sam da su biljke osvjetljene „GroLux“ žaruljama, koje imaju pove anij udio plavo crvene svjetlosti, bile nešto svjetlije zelene od biljaka koje su rasle pod „Cool White“ žaruljama (slika 12). To se osobito vidi na novonastalim listi ima (Slika 12).



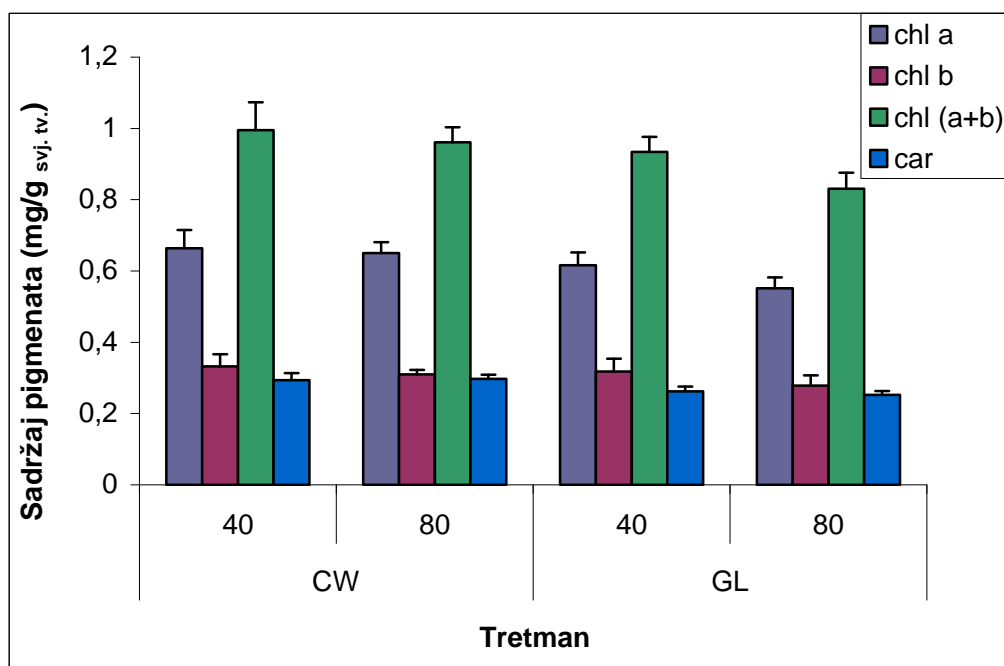
**Slika 12.** Vodene le e nakon 7 dana uzgoja na hranjivoj podlozi po Steinbergu pri uvjetima višeg i nižeg intenziteta (40 i 80  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) bijele svjetlosti „Cool White“ žarulja (CW40 i CW80) te crvene svjetlosti „GroLux“ žarulja (GL40 i GL80).

Makroskopska opažanja su potvrdili rezultati dobiveni analizom pigmenata iako nije bilo statistički značajnih promjena. Pri nižem intenzitetu svjetlosti „Cool White“ žarulja (CW40), sadržaj klorofila *a* i *b* bio je 7%, odnosno 4% primjetno viši nego u biljaka osvjetljenih „GroLux“ žaruljama. U uvjetima višeg intenziteta (CW80) sadržaj klorofila *a* i *b* bio je 15%, odnosno 10% viši nego u biljaka osvjetljenih „GroLux“ žaruljama.

Usporedbom dvaju analiziranih intenziteta svjetlosti, vidljivo je da je sadržaj klorofila viši u biljaka osvjetljenih nižim intenzitetima pri oba tipa osvjetljenja. Pri osvjetljenju „Cool white“ žaruljama, sadržaj klorofila *a* i *b* bio je 2%, odnosno 6% viši u biljaka izloženih nižem intenzitetu osvjetljenja u odnosu na biljke izložene višem intenzitetu osvjetljenja. U biljaka osvjetljenih „GroLux“ žaruljama sadržaj klorofila *a* i *b* bio je 10%, odnosno 12% viši u biljaka izloženih nižem intenzitetu osvjetljenja u odnosu na biljke pri višem intenzitetu osvjetljenja.

Sadržaj ukupnog klorofila je primjetno veći u biljaka osvjetljenim bijelom svjetlošću, i to u uvjetima nižeg intenziteta 3%, a u uvjetima višeg intenziteta 11%, u odnosu na biljke osvjetljene „GroLux“ žaruljama (Slika 13).

Sadržaj karotenoida pokazao je promjenu s obzirom na djelatni spektar odnosno tip korištene žarulje, ali ne i intenzitet osvjetljenja. Sadržaj karotenoida bio je oko 10% viši u biljaka osvjetljenih hladnom bijelom svjetlošću pri nižem intenzitetu svjetla te 15% pri višem intenzitetu svjetla.



**Slika 13.** Sadržaj klorofila *a* (chl *a*) i *b* (chl *b*), ukupnih klorofila (chl (*a* + *b*)) te sadržaj ukupnih karotenoida (car) nakon 7 dana uzgoja na hranjivoj podlozi po Steinbergu pri uvjetima višeg i nižeg intenziteta (40 i 80  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) bijele svjetlosti „Cool White“ žarulja (CW40 i CW80) te crvene svjetlosti „GroLux“ žarulja (GL40 i GL80). Rezultati prikazuju srednju vrijednost od 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Nije bilo statistički značajnih razlika između

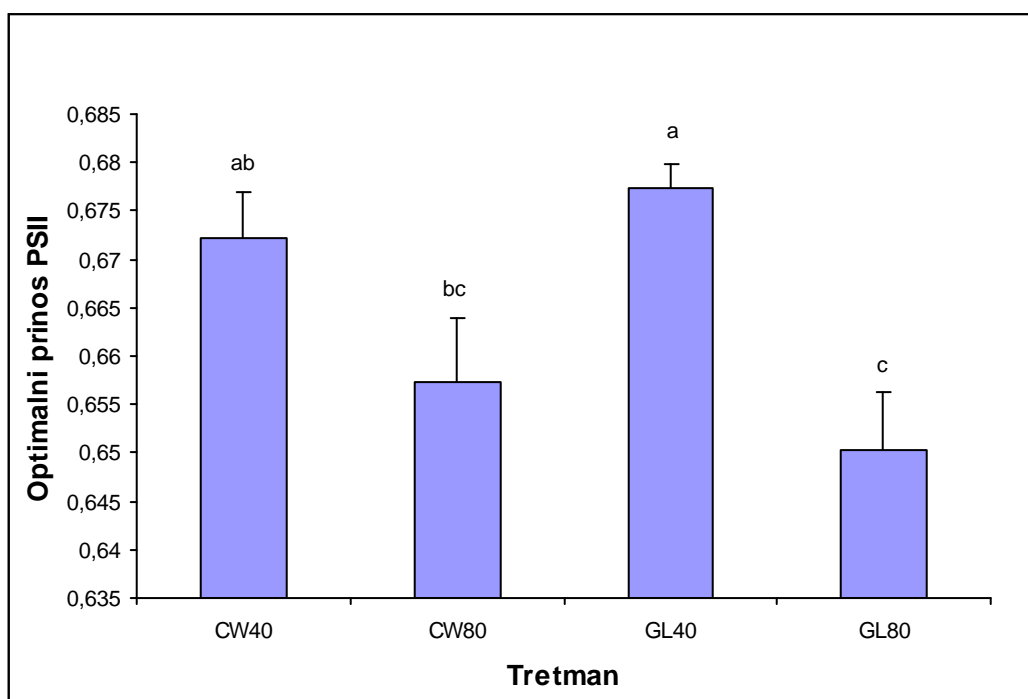
### 4.3. U INAK RAZLI ITIH UVJETA OSVJETLJENJA NA FOTOSINTEZU

Kako bih istražila u inak svjetlosti na fotosintezu, biljke sam izložila razli itim uvjetima osvjetljenja te nakon 7 dana izmjerila fluorescenciju klorofila *a in vivo*. Iz izmjerenih podataka odredila sam u inkovitost PSII na temelju sljede ih fizioloških pokazatelja: optimalnog prinosa PSII, efektivne u inkovitosti PSII, stope prijenosa elektrona te fotokemijskog i nefotokemijskog gašenja fluorescencije.

#### Optimalni prinos PSII (Fv/Fm)

Na temelju podataka dobivenih metodom saturacijskog pulsa izra unala sam da optimalni prinos PSII (Fv/Fm) u vodenoj le i iznosi od 0,65 do 0,67.

Analizom rezultata utvrdila sam da je iznos optimalnog prinosa PSII (Fv/Fm) u biljaka osvjetljenih hladnom bijelom (CW) svjetlosti podjednak pri oba istražena intenziteta osvjetljenja (pri nižem intenzitetu je 2% viši nego pri višem intenzitetu).

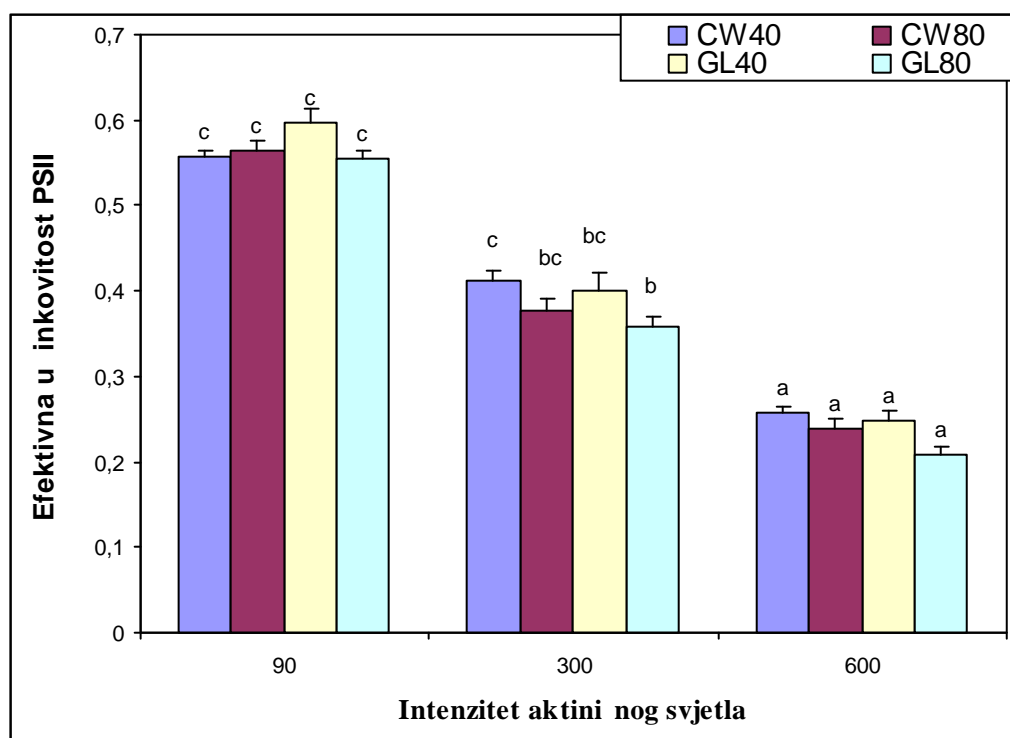


**Slika 14.** Optimalni prinos PSII (Fv/Fm) u biljaka uzgajanih na hranjivoj podlozi po Steinbergu pri intenzitetu 40 i 80  $\mu\text{mol fotona m}^{-2}\text{s}^{-1}$  bijele svjetlosti „Cool White“ žarulja (CW) i crvene svjetlosti „GroLux“ žarulja (GL) tijekom sedam dana. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti od 8 replika  $\pm$  standardna pogreška. Rezultati označeni razli itim slovima međusobno se zna ajno razlikuju ( $p < 0,05$ , Newman Keuls).

Statisti ki zna ajno smanjenje optimalnog prinosa PSII prisutno je samo u biljaka izloženih crvenoj (GL) svjetlosti višeg intenziteta, gdje je optimalni prinos snižen 4% u odnosu na isti tip osvjetljenja nižeg intenziteta (Slika 14).

### Efektivna u inkovitost PSII

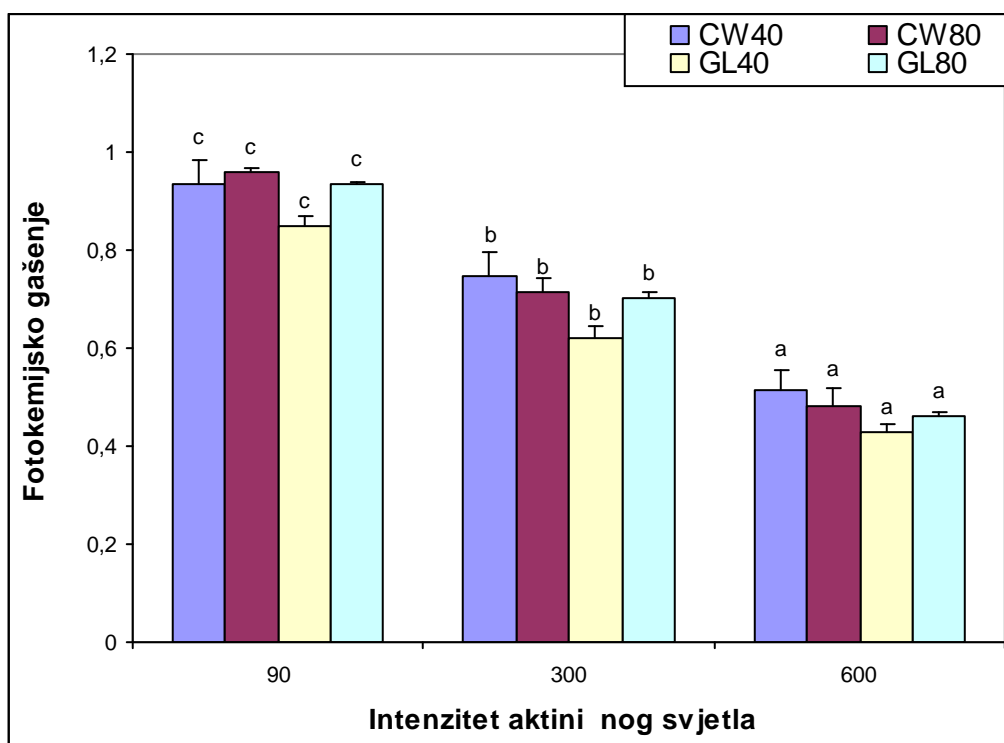
S pove anjem intenziteta aktinog svjetla dolazi do smanjenja efektivne u inkovitosti PSII kod svih tretmana (za 35-118% kod CW40, 50-137% kod CW80, 49-140% kod GL40 te za 55-165% kod GL80). Pri razli itim intenzitetima aktinog svjetla nema statisti ki zna ajne razlike u efektivnoj u inkovitosti PSII izme u pojedinih tretmana. (Slika 15).



**Slika 15.** Efektivni prinos PSII u biljaka uzgajanih na hranjivoj podlozi po Steinbergu tijekom sedam dana pri intenzitetu 40 i 80  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bijele svjetlosti „Cool White“ žarulja (CW) i crvene svjetlosti „GroLux“ žarulja (GL) Rezultati prikazuju srednje vrijednosti od 8 replika  $\pm$  standardna pogreška. Rezultati ozna eni razli itim slovima me usobno se zna ajno razlikuju ( $p < 0,05$ , Newman Keuls).

### Fotokemijsko gašenje

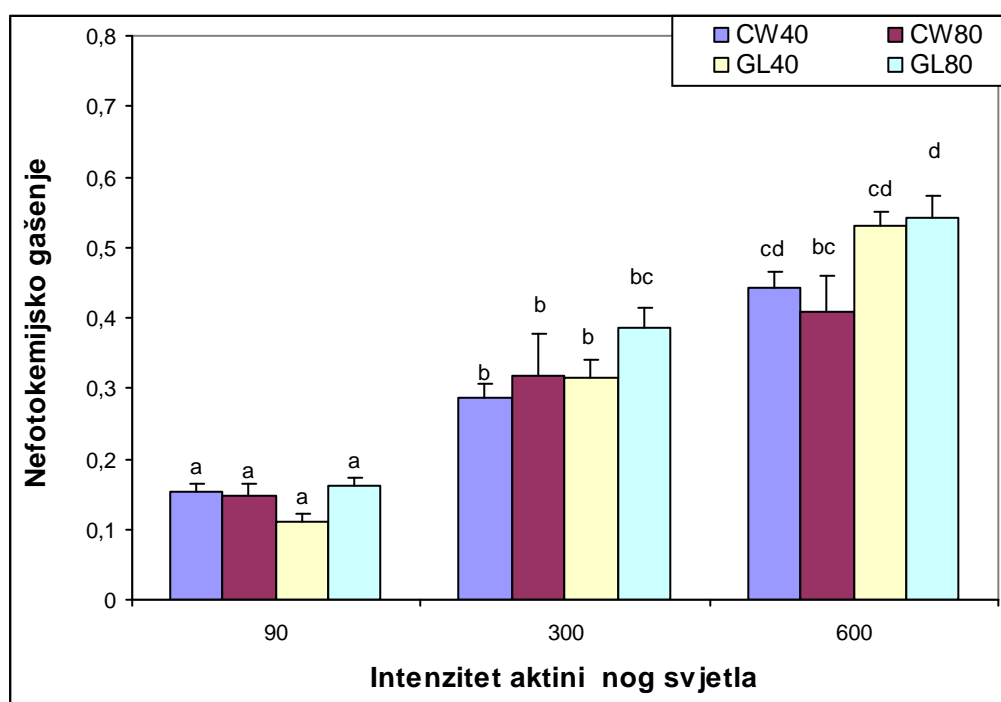
S porastom intenziteta aktini nog svjetla fotokemijsko gašenje (Slika 16) se smanjuje (za 25-81% kod CW40, 34-99% kod CW80, 37-97% kod GL40 i za 33-102% kod GL80) pri emu nema zna ajne razlike izme u pojedinih tretmana pri pojedinom intenzitetu aktini ke svjetlosti. Vrijednosti su nešto malo ve e u biljaka izloženih bijeloj svjetlosti (CW) te ve em intenzitetu crvene svjetlosti (GL80) pri aktini kom svjetlu od 90 i 600  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .



**Slika 16.** Fotokemijsko gašenje fluorescencije (qP) u biljaka uzgajanih na hranjivoj podlozi po Steinbergu tijekom sedam dana pri višem i nižem intenzitetu (40 i 80  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) bijele svjetlosti „Cool White“ žarulja (CW) i crvene svjetlosti „GroLux“ žarulja (GL). Rezultati prikazuju srednje vrijednosti od 8 replika  $\pm$  standardna pogreška. Rezultati ozna eni razli itim slovima me usobno se zna ajno razlikuju ( $p < 0,05$ , Newman Keuls).

### Nefotokemijsko gašenje

S porastom intenziteta aktini nog svjetla zna ajno je poraslo nefotokemijsko gašenje (Slika 17) fluorescencije (za 87-190% kod CW40, 114-176% kod CW80 i 186-382% kod GL40 i za 137-234% kod GL80). Razlika me u pojedinim uvjetima osvjetljenja primije ena je jedino pri najvišem istraženom intenzitetu osvjetljenja ( $600 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) gdje je ve i udio plave i crvene svjetlosti (GL) rezultirao ve im nefotokemijskim gašenjem u odnosu na hladno bijelo osvjetljenje (CW).

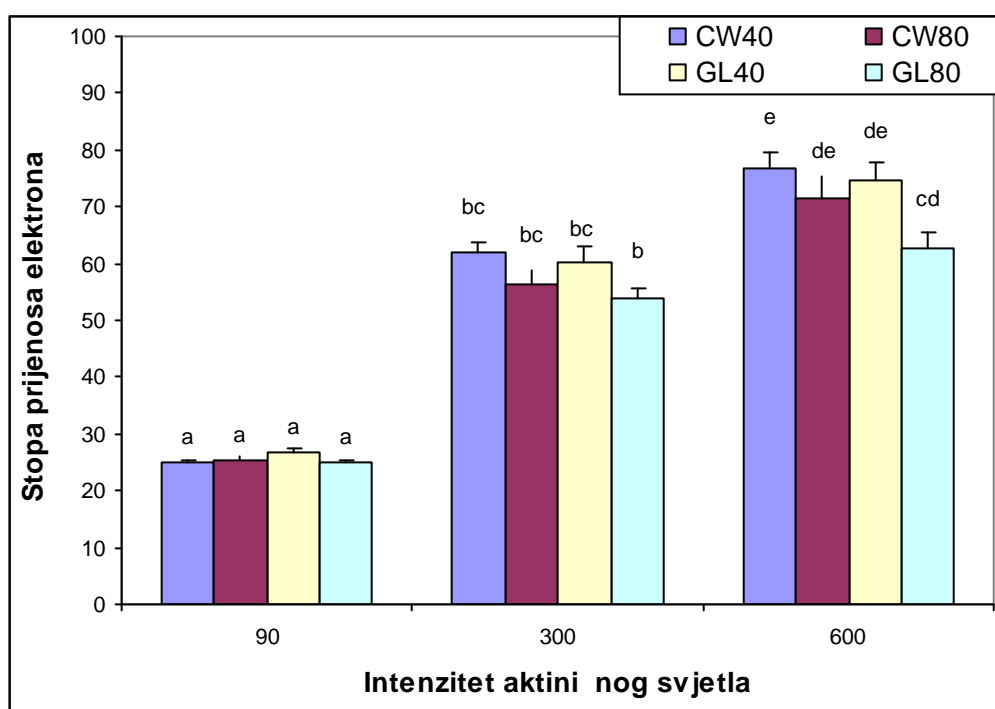


**Slika 17.** Nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ) u biljaka uzgajanih na hranjivoj podlozi po Steinbergu tijekom sedam dana pri razli itim intenzitetima svjetlosti ( $40$  i  $80 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) „Cool White“ (CW) i „GroLux“ (GL) žarulja. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti od 8 replika  $\pm$  standardna pogreška. Rezultati ozna eni razli itim slovima me usobno se zna ajno razlikuju ( $p < 0,05$ , Newman Keuls).

### Stopa prijena elektrona

S pove anjem intenziteta aktini nog svjetla zna ajno se pove ala stopa prijena elektrona; tako se pri osvjetljenju GL40 pove ala za 123-178%, GL80 za 116-151%, CW40 za 147-206% i CW80 za 123-182% (Slika 18).

Primije eno je smanjenje stope prijena elektrona pri uzgoju biljaka kod višeg intenziteta ( $80 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) što je osobito vidljivo kod aktini kog svjetla od  $600 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$  i to u biljaka koje su rasle pod crvenom svjetlosti (GL).



**Slika 18.** Relativna stopa transporta elektrona (ETR) u biljaka uzgajanih na hranjivoj podlozi po Steinbergu tijekom sedam dana pri razli itim intenzitetima svjetlosti ( $40$  i  $80 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) „Cool White“ (CW) i „GroLux“ (GL) žarulja. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti od 8 replika  $\pm$  standardna devijacija. Rezultati ozna eni razli itim slovima me usobno se zna ajno razlikuju ( $p < 0,05$ , Newman Keuls).



### 5.1. U INAK RAZLI ITIH UVJETA OSVJETLJENJA NA RAST VODENE LE E

Rast vodene le e pra en je korištenjem standardiziranog stati nog Lemna testa. Kao osnovni parametar mjeri se broj listi a, uz što je obavezno mjeriti drugi parametar koji može biti površina listi a ili masa suhe tvari (ISO/CD 20079). Po ISO standardu biljke se uzgajaju na podlozi po Steinbergu, a vrijeme trajanja testa je 7 dana tijekom kojeg rast mora biti eksponencijalan. Kultura vodene le e *in vitro* održava se uzgajanjem biljaka na PS podlozi, a zatim se prije eksperimenta prebacuje na podlogu po Steinbergu tijekom dvije subkulture pa iz tog razloga provodim usporedbu rasta biljaka na te dvije podloge. Vrijeme trajanja testa produženo je na 14 dana kako bih ustanovila ho e li rast biljke ostati eksponencijalan i nakon sedmog dana. Vrijednosti pH po standardu kre u se izme u 5 i 8, intenzitet svjetla treba biti u rasponu od 85 do 125  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , a temperatura  $24 \pm 2$  °C. Intenzitet svjetla kojem je vodena le a izlagana tijekom održavanja mati nih kultura bio je 40  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , što je niže od onog navedenog u standardiziranom Lemna testu, pa je to tako er jedan od razloga zašto sam istraživala u inak razli itog osvjetljenja na vodenu le u.

Nakon izlaganja razli itim uvjetima osvjetljenja, broj biljaka je zna ajno porastao tre eg dana pokusa, a zatim je uslijedio daljnji eksponencijalan rast što ukazuje na to da je sastav hranjive podloge po Steinbergu dostatan za rast tijekom 14 dana. Me utim, apsolutni iznosi stope rasta na ovoj hranjivoj podlozi niži su od onih na PS podlozi. Babi i sur. (2009) su na PS podlozi pri intenzitetu svjetlosti 40  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$  izmjerili stopu rasta od 0,26  $\text{d}^{-1}$ , što je za 31% više nego li je postignuto na podlozi po Steinbergu pri istom intenzitetu svjetlosti.

Bolji rast na PS podlozi dobiven je tako er i u istraživanju u inka kadmija na vodenu le u (Šari , 2001). Vodene le e su bile uzgajane na PS podlozi gdje su jako dobro napredovale. Broj biljaka u kulturi se pove ao, a listi i su bili intenzivno zelene boje. U ovom radu listi i biljaka koje su rasle na podlozi po Steinbergu bili su svjetlije zelene boje te slabijeg rasta. To vodi do zaklju ka da podloga koju sam koristila u svom radu nije optimalnog sastava. PS podloga, za razliku od podloge po Steinbergu, sadrži saharozu i neke druge organske dodatke kao što je asparagin, a tako er su i koncentracije makro- i mikro-elemenata više.

Poznato je da *Lemnaceae* mogu rasti u širokom rasponu koncentracija hranjivih tvari, ak i u destiliranoj vodi. Iako mogu preživjeti danima i tjednima, koriste i hranjive tvari akumulirane u starijim listi ima, dugotrajni kontinuirani prirast rasta mogu je samo u otopinama s relativno visokom koncentracijom hranjivih tvari. Tako er, uo eno je da u

otopinama s manje hranjivih tvari vrste iz roda *Lemna* stvaraju dulje korjen i e, a frondovi su ve i i tanji. Sli an u inak primije en je kod niskih koncentracija nitrata i fosfata, a dodatkom saharoze taj se u inak poništava (Landolt i Kandeler, 1987). Hranjiva podoga po Steinbergu u odnosu na PS podlogu ima niže vrijednosti ve ine makro- i mikro-elemenata, a poznato je da subotimalne koncentracije dušika i fosfata te klora mogu dovesti do smanjene stope rasta i nižeg sadržaja klorofila (Landolt i Kandeler, 1987), što je primije eno i u ovom radu u odnosu na biljke koje su rasle na PS podlozi. Tako er, kao što sam ve spomenula, PS podloga ima dodatak saharoze i aminokiseline asparagina za koje je poznato da mogu imati pozitivne u inke na prirast u uvjetima loše opskrbe hranjivim tvarima ili slabog intenziteta svjetlosti. Poznato je da aminokiseline dodane u podlogu u nepovoljnim uvjetima rasta, kao što su niže koncentracije dušika i slabo osvjetljenje, mogu služiti kao izvor dušika (Landolt i Kandeler, 1987).

Svakako, uz mogu u suboptimalnu koli inu hranjivih tvari, manji prirast biljaka može biti i posljedica suboptimalnog intenziteta svjetlosti pri kojem su vodene le e uzgajane. Poznato je da su visoki intenziteti svjetlosti potrebni za fotosintezu, a to e osim o vrsti biljke ovisiti i o temperaturi te koli ini hranjivih tvari i uglji nog dioksida (Pevalek-Kozlina, 2003). Kod niskih intenziteta svjetlosti stopa rasta i fotosinteza proporcionalno rastu s intenzitetom svjetla što se donekle slaže sa mojim rezultatima, barem za prirast jer je viši intenzitet osvjetljenja imao nešto ve i prirast. Poznato je da biljke iz porodice *Lemnaceae* mogu koristiti ugljikohidrate kao izvore energije u nedovoljnim uvjetima osvjetljenja i skoro sve vrste koje rastu u takvim uvjetima osvjetljenja rastu brže ako se u podlogu doda saharoza (Landolt i Kandeler, 1987). To se u potpunosti slaže s mojim rezultatima rasta dobivenim na podlozi po Steinbergu u usporedbi s rastom na PS podlozi u kojoj ima saharoze (Šari , 2001).

O u inku saharoze na otpornost biljke tako er govore istraživanja na duhanu iji rezultati pokazuju da saharoza dodana u podlogu poboljšava otpornost biljaka na stres, ali su u inci saharoze ovisni o njenoj koncentraciji (Kadle ek i sur., 2003).

Stimulacija fotoreceptora za plavu, crvenu i ultraljubi astu svjetlost, bilo pojedina no ili u kombinaciji, uzrokuje fotomorfogeni razvoj (McNellis i Deng, 1995). Kako bih potvrdila tu teoriju, u ovom radu sam vodenu le u, aklimatiziranu na uvjete nižeg intenziteta bijelog svjetla ( $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), osim izlaganja višem intenzitetu ( $80 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) uobi ajene fluorescentne hladne bijele svjetlosti žarulja "Cool White" (CW), izlagala i višem te nižem intenzitetu ( $40$  i  $80 \text{ fotona } \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) fluorescentne svjetlosti s ve im udjelom crvenog i plavog dijela spektra žarulja „GroLux“ (GL). Budu i da je prilikom uzgoja vodene le e na višem intenzitetu ( $80 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) prirast broja biljaka stalno ujedna eno

rastao, možemo govoriti o aklimatizaciji na nove uvjete. Tako er, prirast je bio nešto ve i nego prirast zabilježen pri nižem intenzitetu svjetlosti na kojem su biljke uobi ajeno uzgajane. Sli ni rezultati dobiveni su na crvenim algama (Ritz i sur., 2000). Alge su se potpuno aklimatizirale na tri razli ita svjetlosna intenziteta (niskom od  $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , visokom od  $500 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  i vrlo visokom od  $1000 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) i imale su vrlo razli ite karakteristike. Rasle su razli itim brzinama, s time da je maksimalna brzina na ena za stanice uzgojene pri visokom intenzitetu, dok su stanice uzgojene na niskom intenzitetu bile ograni ene svjetloš u. Uz usporedbu stanica aklimatiziranih na tri svjetlosna režima, cilj tog istraživanja je bio slijediti kinetiku fotoaklimatizacije pa su stanice alge, uzgojene na niskom intenzitetu ( $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), premještene u uvjete visokog i vrlo visokog intenziteta svjetlosti ( $500$  i  $1000 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Na oba intenziteta primije ena je odgoda u po etku rasta premještenih stanica. Zatim je uslijedio rast brzinom kojom su rasle i stanice prvotno uzgajane na tim intenzitetima, što govori o aklimatizaciji na nove uvjete. U mojem istraživanju najviši intenzitet svjetlosti kojem je vodena le a bila izlagana bio je  $80 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , što nije visoki intenzitet svjetlosti. Iz tog razloga nije bila zabilježena odgoda rasta u po etku, kao što je bio slu aj kod crvenih algi. Ta odgoda rasta je mogu i rezultat stresa induciranog pove anjem intenziteta svijetlosti koji je privremeno inhibirao diobu stanica.

S obzirom da su biljkama za rast i fotosintezu najpotrebniji plavi i crveni dio spektra ([www.mobot.org](http://www.mobot.org)...), o ekivala sam višu stopu rasta vodene le e uz osvjetljenje „GroLux“ žaruljama koje sadrže pove ani udio tog djela spektra vidljive svjetlosti. Rezultati istraživanja su pokazali da postoji mali, ali ne i statisti ki zna ajan porast stope prirasta broja vodene le e pri osvjetljenju ovim žaruljama (GL40 od 7% i GL80 od 8%), što je najbolje vidljivo petog dana pokusa, te kod prirasta mase svježe tvari (pove anje od 18% pri GL80).

Istraživanja provedena na raj ici pokazala su tako er bolji rast biljaka osvjetljenih „GroLux“ žaruljom, što je objašnjeno upravo povišenim intenzitetom crvenog i plavog dijela spektra „GroLux“ žarulje. Me utim, još bolji rast dobiven je izlaganjem raj ice lampama sa ve im intenzitetima crvene i daleke crvene svjetlosti. Trajanje testiranja i ukupan intenzitet svjetlosti tako er igraju ulogu u odre ivanju spektralnih karakteristika koje daju najbolji rast. (Thomas i Dunn, 1967).

S obzirom da ponekad samo jedan pokazatelj ne može odrediti to an u inak na rast, pratila sam još dva pokazatelja rasta vodene le e. Osim prirasta broja biljaka, pratila sam prirast mase svježe tvari te omjer mase suhe i svježe tvari. Prirast broja biljaka i mase svježe tvari pokazali su se podjednako osjetljivi u mojem sluaju jer su pokazali sli ne razlike pri

izlaganju različitim uvjetima osvjetljenja, što ne mora uvijek biti slučaj kada se ispituje u inak na rast biljaka. Toth i sur. (2005) su istraživali utjecaj organskih materija na rast salate, a kao najosjetljiviji pokazatelj rasta dobili su masu svježe tvari nadzemnog i podzemnog dijela biljke. Na broj listova po biljci materije nisu značajno utjecali, a porast tijekom vegetacije je bio linearan.

## 5.2. U INAK RAZLIČITIH UVJETA OSVJETLJENJA NA PIGMENTE VODENIH LEA

Ako usporedimo koncentracije pigmenta vodenih lea, uzgajane na PS podlozi (Šarić, 2001) i podlozi po Steinbergu, možemo uočiti tendenciju pada koncentracije klorofila *a* i *b* za oko 15- 20% te porast sadržaja karotenoida za oko 40% na podlozi po Steinbergu u odnosu na PS podlogu. Pad koncentracije klorofila se također može uočiti i makroskopskim promatranjima jer su listovi biljaka uzgajanih na podlozi po Steinbergu bili svjetlije zelene boje te su pokazivali blagu klorotičnost, osobito pri višem intenzitetu osvjetljenja (slika 12).

Osim razlike u sadržaju saharoze te aminokiseline asparagina, važna razlika između PS podloge i podloge po Steinbergu je i u količini helirajućih tvari. Naime, prva osim EDTA sadrži i citrat, a poznato je da helirajuće tvari u podlozi sadrže mikroelemente, kao što je željezo, dostupnijim biljkama, a njihova eventualna toksičnost je manja (Landolt i Kandeler, 1987). Nedostatak željeza i/ili njegova manja dostupnost mogli bi biti uzrok kloroze primije enoj kod biljaka na Steinbergovoj podlozi. Kloroza može biti posljedica smanjene biosinteze, i/ili povećane razgradnje klorofila (Pevalek-Kozlina, 2003). Kako je kloroza u vodenih lea bila najizraženija u novonastalim biljkama primije eno smanjenje sadržaja klorofila vjerojatno je posljedica smanjene sinteze klorofila, a poznato je da je željezo kofaktor mnogih enzima, također i onih uključenih u biosintezu klorofila (Pevalek-Kozlina, 2003). No, do smanjenja količine klorofila, kao što sam već spomenula, dovode i suboptimalan sadržaj dušika, klora i drugih hranjivih tvari pa bi trebalo nastaviti istraživanje određivanjem ovih tvari u vodenoj lei. Primije eno povećanje karotenoida u odnosu na PS podlogu može se povezati sa nepovoljnim uvjetima rasta koji su stresni za biljku. Naime, poznato je da se biljka pokušava zaštititi od stresnih uvjeta tako da povećava količinu pigmenta, kao što su karotenoidi i flavonoidi (Mahdavian i sur., 2008; Pevalek-Kozlina 2003) pa je vjerojatno iz istih razloga, zbog kojih je smanjena koncentracija klorofila, došlo i do povećanja karotenoida za koje je poznato da mogu imati zaštitnu ulogu, npr. kao antioksidansi u oksidacijskom stresu. Porast karotenoida osobito je vidljiv pri utjecaju bijele

svjetlosti pa je stoga drugo objašnjenje za takve rezultate da bijela svjetlost, koja prekriva cijeli vidljivi dio spektra, vjerojatno potiče sintezu karotenoida koji najjače apsorbiraju svjetlost valnih duljina između 380 nm i 550 nm pa služe i kao pomoćni pigmenti koji povećavaju akcijski spektar fotosinteze (Pevalek-Kozlina, 2003). Međutim, s obzirom da je i klorofil *b* pomoćni pigment, neobično je da se nije povećala i njegova koncentracija.

Dosadašnja istraživanja su utvrdila da visok intenzitet svjetlosti smanjuje količinu klorofila *a* i *b* te povećava količinu karotenoida u mnogim biljnim vrstama, primjerice kod duhana (Kadleček i sur., 2003) i obične smreke (Štroch i sur., 2008). Kod biljaka koje ne toleriraju visok intenzitet svjetla dolazi do fotoinhibicije u kloroplastima, gdje kisik nastao kao sporedni produkt fotosinteze može uzrokovati fotooksidaciju klorofila, ukoliko nije vezan karotenoidima. Istraživanja na duhanu pokazala su da pri intenzitetu od 380  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , ukoliko je biljka uzgajana na podlozi sa 0% saharoze, dolazi do fotoinhibicije. Te biljke su imale smanjen sadržaj klorofila *a* i *b*. Na intenzitetu pri kojem sam ja u svojem istraživanju izlagala vodenu leću (80  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) nije došlo do značajne promjene sadržaja klorofila iako je on bio nešto snižen i to osobito kod biljaka osvijetljenih povišenim intenzitetom crvenog i plavog dijela spektra „GroLux“ žarulje. Iz toga možemo zaključiti da intenzitet svjetlosti od 80  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$  još u značajnijoj mjeri ne uzrokuje svjetlosni stres. Međutim, kloroza kao i promjene u sadržaju klorofila, primijećene kod viših intenziteta svjetlosti, ukazuju da je vodena leća aklimatizirana na uvjete nižeg intenziteta osvijetljenja. U daljnjim istraživanjima trebalo bi biljke izložiti još malo više intenzitetima, npr. 90 i/ili 100  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$  pa vidjeti hoće li doći do fotoinhibicije.

### 5.3. UTJECAJ RAZLIČITIH UVJETA OSVJETLJENJA NA FOTOSINTEZU VODENE LEĆE

Lee i sur. (2007) pokazali su da fluorescentno osvijetljenje sa visokim udjelom plave i crvene svjetlosti potiče fotosintezu. Zaključili su da količina i kvaliteta svjetlosti utječu na razvoj pušice i fiziološke odgovore, ovisno o intenzitetu i valnoj duljini svjetlosti.

Budući da dosadašnja istraživanja pokazuju da su biljke sposobne nositi se s desetorostrukim povećanjem intenziteta svjetlosti, zahvaljujući i efikasnoj neradijativnoj disipaciji apsorbirane svjetlosne energije unutar PSII antene (Štroch i sur., 2008), bilo je za očekivati da izlaganje vodene leće povišenom intenzitetu od svega 80  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$  neće prouzrokovati veće štete fotosintetskog aparata.

Biljke su sposobne aklimatizirati se na uvjete različitih intenziteta svjetlosti, što su potvrdila istraživanja na biljci *Arabidopsis thaliana* (Ballottari i sur., 2007). U tom istraživanju analiziran je fotosintetski aparat u biljkama aklimatiziranim na različite svjetlosne intenzitete i temperaturne uvjete. Nakon premještanja biljaka sa nižih na više intenzitete svjetlosti, biljke su pokazale sposobnost aklimatizacije na različite okolne uvjete te sposobnost izbjegavanja fotoinhibicije.

Ritchie (2006) je proveo istraživanje na golosjemenja i *Pseudotsuga menziesii* kroz jednogodišnji ciklus rasta. Korišten je PAM fluorometar koji daje iste vrijednosti kao i fluorometar Kautskijevog tipa. U vrijeme sadnje,  $F_0$  je varirao od 0,2 do 0,4, što se smatra normalnim za većinu biljaka, a takva vrijednost je dobivena i u mojem istraživanju na vodenoj leži. Kod *Pseudotsuge menziesii*  $F_m$  je bilo nisko, ali se njegova vrijednost naglo popela unutar normalnog okvira (oko 1,2 do 1,5) i ostala tako, dok se kod vodene leže vrijednost  $F_m$  kretala od 0,7 do 0,9. Vrijednost maksimalne fluorescencije,  $F_m$ , je prolazna i ubrzo slijedi vidljivi pad, potom postepeno spuštanje u stabilno stanje,  $F_s$ . Kada je biljka pod jakim stresom, vrijednost  $F_m$  ostaje nepromijenjena dugo vremena, što nije bio slučaj kod vodene leže. To je dokaz da su stanice vodene leže bile zdrave i sposobne za gašenje svjetlosne energije što inače nije moguće kod ubijenih ili oštećenih stanica (Ritchie, 2006).

Vrijednost optimalnog prinosa ( $F_v/F_m$ ) kod *Pseudotsuge menziesii* je bila oko 0,8. Mnoge studije, koje koriste fluorometre Kautskijevog tipa, uglavnom nalaze vrijednost optimalnog prinosa od 0,83 kao rezultat analize (Fisker i sur., 1995; Binder i Fielder 1996; Perks i sur., 2001; Perks i sur., 2004). Dobivena vrijednost optimalnog prinosa u ovom istraživanju je bila nešto manja od teoretske vrijednosti, a kretala se od 0,65 do 0,67. Ti rezultati opet ukazuju da na Steinbergovoj podlozi nisu bili optimalni uvjeti za fotosintezu. Stresni okolišni uvjeti (niske temperature, suša, nedostatak hranjivih tvari, izloženost teškim metalima) remete ravnotežu apsorpcije i iskorištavanja energije na PSII uslijed čega dolazi do fotooksidacijskog oštećenja. Smanjenje optimalnog prinosa PSII zajedno sa smanjenim sadržajem klorofila *a* i *b*, koji je također u ovom radu, ukazuje na moguću fotoinhibiciju (Fodor, 2002). Iako do smanjenja optimalnog prinosa obično dolazi zbog previsokog intenziteta osvjetljenja, pri čemu nastaje oštećenje fotosistema te dolazi do fotooksidacije klorofila (Murchie i Horton, 1997), moguće je da je u ovom slučaju kombinacija korištenih uvjeta osvjetljenja i suboptimalne količine hranjivih tvari dovela do smanjene količine klorofila. S obzirom da je optimalan prinos fluorescencije proporcionalan sadržaju klorofila (Genkov i sur., 1997), primijećeno smanjenje optimalnog prinosa može biti posljedica smanjenog sadržaja klorofila u vodenoj leži uzgajanoj na podlozi po Steinbergu.

Rezultati mjerenja klorofila to donekle i potvrđuju jer je količina klorofila niža u odnosu na rezultate dobivene na PS podlozi (Šari, 2001). Pri uvjetima osvjetljenja GL80 došlo je do daljnjeg značajnog smanjenja optimalnog prinosa, iako od samo 4% u odnosu na bijelu svjetlost. Pri tim uvjetima primijećena je i blaga tendencija smanjenja sadržaja ukupnog klorofila što je izgleda bilo dovoljno za promjene u fotosintezi.

Iz podataka o fluorescenciji ravnotežnog stanja ( $F_s$ ) te maksimalnoj fluorescenciji ( $F_m$ ) izračunala sam efektivnu učinkovitost PSII ( $\Phi_{PSII}$ ). S obzirom da su intenziteti svjetlosti kojima je vodena leća bila izlagana relativno niski, očekivala sam da će se pri većem intenzitetu svjetlosti povećati i stopa fotosinteze koja je proporcionalna u učinkovitosti PSII. Međutim, u vodenoj leći je kod viših intenziteta aktivne svjetlosti došlo do izrazitog smanjenja u učinkovitosti PSII. Smanjena efektivna učinkovitost ukazuje da je iz nekog razloga došlo do zasićenja fotosinteze već pri nižim intenzitetima osvjetljenja. Nisam primijetila značajne razlike između različitih uvjeta osvjetljenja iako je u učinkovitost bila nešto manja kod većeg intenziteta i kod „GroLux“ žarulje. Budući da je efektivna učinkovitost mjera udjela svjetlosti apsorbirane klorofilom vezanim uz PSII i energije iskorištene u fotokemijskim reakcijama, dobiveni rezultati ukazuju da se u istraživanim uvjetima ne može povećati udio svjetlosti apsorbirane klorofilom. To opet ukazuje na nedostatak molekula klorofila koji bi tu svjetlost apsorbirale što se poklapa s rezultatima sadržaja klorofila. Dakle, kod većih intenziteta sve je manji udio svjetlosti apsorbirane klorofilom vezanim uz PSII i energije iskorištene u fotokemijskim reakcijama, tj. nastaje preveliko opterećenje za postojeću količinu klorofila. Do smanjenja u učinkovitosti PSII dolazi i kod biljaka koje rastu na vrlo visokom intenzitetu svjetlosti, od otprilike  $1000 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$  pa je apsorbirana energija fotona previsoka u usporedbi sa stopom fotosinteze, odnosno fotosinteza je limitirana količinom  $\text{CO}_2$  koja kroz pučice dolazi do kloroplasta. Pod tim uvjetima efikasnost fotosinteze je smanjena, što se odražava u smanjenju efektivnog prinosa PSII (Miyake i sur., 2009)

Dobivene vrijednosti za efektivnu učinkovitost PSII koristila sam za izračun stope neto prijenosa elektrona. S povećanjem intenziteta aktivne svjetlosti značajno se povećala stopa prijenosa elektrona. Ovi rezultati su zanimljivi jer pokazuju da se stopa prijenosa elektrona zasićuje kod većih vrijednosti intenziteta aktivne svjetlosti nego stopa fotosinteze. Stopa prijenosa elektrona (ETR) predstavlja relativnu količinu elektrona koji prolaze kroz PSII tijekom ravnotežnog stanja fluorescencije. Primijećeno smanjenje stope prijenosa elektrona kod biljaka koje su rasle pri  $80 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$  u odnosu na biljke koje su rasle pri  $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , osobito kod „GroLux“ žarulja, može se opet povezati sa smanjenom količinom klorofila i smanjenom učinkovitošću hvatanja energije.

Ako usporedimo vrijednosti fotokemijskog gašenja (qP) i nefotokemijskog gašenja (NPQ) sa vrijednostima koje je Ritchie (2006) dobio u svojim istraživanjima, možemo zaključiti da su takoer unutar ekvivalentnih vrijednosti. Koeficijent fotokemijskog gašenja u njihovim istraživanjima kretao se unutar intervala od oko 0,7 do 0,8, što je približno mojim dobivenim rezultatima gdje su se vrijednosti fotokemijskog gašenja kretale od oko 0,8 do 0,9 pri svim uvjetima osvjetljenja. S druge strane, vrijednosti nefotokemijskog gašenja dobivenih na vodenoj lea (oko 0,2) su se razlikovale od onih koje je dobio Ritchie (oko 0,5).

S povećanjem intenziteta aktinog svjetla dolazilo je do postupnog smanjivanja qP, što je bilo za ekvivalentno s obzirom da su vodena lea i njen fotosintetski aparat prilagođeni rastu pri vrlo niskom intenzitetu svjetlosti ( $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) pa vrlo brzo dođe do zasićenja reakcije fotosinteze. S obzirom da je poznato da se to uglavnom događa u biljkama sjene (Mache i Loiseaux, 1973), ovi rezultati potvrđuju da uvjeti osvjetljenja u klima komori, gdje je vodena lea bila uzgajana, odgovaraju približno uvjetima sjene.

Smatra se da je nefotokemijsko gašenje jedan od glavnih mehanizama zaštite od fotoinhibicije jer sprječava da višak energije dođe do reakcijskih središta i ošteti ih (Muller i sur., 2001). Najniža vrijednost NPQ dobivena je pri intenzitetu od  $90 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$  što sugerira da je na niskim svjetlosnim intenzitetima fotokemijsko gašenje iskoristilo veći dio upadne energije pa se biljka nije morala oslanjati na nefotokemijsko gašenje za disipaciju energije. S obzirom da su biljke bile prilagođene niskom intenzitetu svjetlosti, nefotokemijsko gašenje se postupno povećavalo sa povećanjem intenziteta aktinog svjetla što je posljedica konverzije violaksantina u zeaksantin čime se biljka oslobađa viška energije u obliku topline. S porastom intenziteta aktinog svjetla brzina fotosinteze se postupno smanjuje zbog zasićenja fotosintetskog aparata pa se suvišna apsorbirana energija oslobađa u obliku topline. Zbog toga vidimo da se povećava vrijednost NPQ do izjednačenja sa qP.

Kadleček i sur. (2003) su dobili slične rezultate za efektivnu učinkovitost, fotokemijsko i nefotokemijsko gašenje na duhanu koji je bio uzgajan pri dva intenziteta svjetlosti ( $80$  i  $380 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) na podlogama sa različitom koncentracijom saharoze. Pri većem intenzitetu osvjetljenja i u nedostatku saharoze, uočeno je povećanje sadržaja pigmenta ksantofilskog ciklusa, smanjena efektivna učinkovitost fotosistema II i povećano nefotokemijsko gašenje.

Budući da je vodena lea bila uzgajana pri dva niska intenziteta svjetlosti na koje je prilagođena rastom u klima komori, značajne razlike u fotokemijskom i nefotokemijskom gašenju uglavnom nisu bile prisutne između pojedinih tretmana (GL 40, GL80, CW40 i CW80).



Na temelju činjenice da je djelotvoran dio spektra za fotosintezu u području crvene i plave svjetlosti koju apsorbiraju klorofili, otkriva se da je „GroLux“ žarulje sa povećanim udjelom plave i crvene svjetlosti značajnije utjecati na fotosintezu vodene leće. Istraživanje na vodenoj leći je pokazalo da iako nije bilo značajnijeg utjecaja „GroLux“ žarulje na rast i fotosintezu, ipak je uočeno da viši intenzitet osvjetljenja u biljaka uzgojenih pod osvjetljenjem te žarulje ima nešto veći i u inak na promatrane pokazatelje od istog intenziteta bijele svjetlosti. Međutim, značajne promjene nisu se dogodile vjerojatno zbog smanjene količine klorofila koji bi tu svjetlost mogli apsorbirati. Za potvrdu te pretpostavke potrebna su daljnja istraživanja.

Izlaganje vodene leće *Lemna minor* L. različitim uvjetima osvjetljenja, intenzitetima od 40 i 80  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  hladne bijele svjetlosti „Cool White“ žarulje te crvene svjetlosti „GroLux“ žarulje, nije dovelo do značajnijih promjena niti u rastu niti u procesu fotosinteze.

Vidljiv je blagi porast stope rasta broja biljaka pri većem intenzitetu svjetla (80  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) kod oba tipa osvjetljenja, i hladne bijele svjetlosti „Cool White“ žarulje i crvene svjetlosti „GroLux“ žarulje, ali taj porast nije bio značajan.

Sadržaj fotosintetskih pigmenta klorofila *a*, klorofila *b* te ukupnih karotenoida bio je nešto veći i u biljaka osvjetljenih hladnom bijelom svjetlošću u „Cool White“ žarulja u odnosu na biljke osvjetljene crvenom svjetlošću u „GroLux“ žarulja. Međutim primijećeni porast nije bio statistički značajan.

U biljaka izloženih crvenoj svjetlosti većeg intenziteta primijećeno je statistički značajno smanjenje optimalnog prinosa PSII. U inkovitost PSII na svjetlu, kao ni stopa prijenosa elektrona, nije se značajno razlikovala pri istraživanim uvjetima osvjetljenja. Nešto veće vrijednosti fotokemijskog gašenja uočene su pri izlaganju biljaka hladnoj bijeloj svjetlosti „Cool White“ žarulja dok su nešto veće vrijednosti nefotokemijskog gašenja primijećene pri izlaganju biljaka crvenoj svjetlosti „GroLux“ žarulja, osobito kod većih intenziteta aktinikog svjetla. S povećanjem intenziteta aktinikog svjetla u inkovitost PSII i fotokemijsko gašenje su se značajno smanjili kod svih istraživanih uvjeta osvjetljenja, a nefotokemijsko gašenje i stopa prijenosa elektrona se povećali, što ukazuje da su *Lemna minor* i njezin fotosintetski aparat prilagođeni rastu kod vrlo niskog intenziteta osvjetljenja.

- Arnon, D. I. (1949): Copper enzyme in isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* **24**: 1-15.
- Babani, F., Lichtenthaler, H. K. (1996): Light-induced age-dependant development of chloroplasts in etiolated barley leaves as visualized by determination of photosynthetic pigments, CO<sub>2</sub> assimilation rates and different kinds of chlorophyll fluorescence ratios. *J. Plant Physiol.* **148**: 555-566.
- Babi, M., Radi, S., Cvjetko, P., Rojec, V., Pevalek-Kozlina, B., Pavlica, M. (2009): Antioxidative response of *Lemna minor* plants exposed to thallium(I)-acetate. *Aquat. Bot.* **91**: 166–172.
- Ballottari, M., Dall'Osto, L., Morosinotto, T., Bassi, R. (2007): Contrasting Behavior of Higher Plant Photosystem I and II Antenna Systems during Acclimation. *J. Biol. Chem.* **282**: 8947-8958.
- Binder, W. D., Fielder, P. (1996). Chlorophyll fluorescence as an indicator of frost hardiness in white spruce seedlings from different latitudes. *New Forest.* **11**: 233-253.
- Boniardi, N., Vatta, G., Rota, R., Nano, R. i Carra, S. (1994) Removal of water pollutants by *Lemna gibba*. *Chem. Engin. J.* **54**: B41-B48.
- Fisker, S. E., Rose, R., Haase, DL. (1995): Chlorophyll fluorescence as a measure of cold hardiness and freezing stress in 1+1 Douglas-fir seedlings. *Forest Sci.* **41**: 564-575.
- Fodor, F. (2002): Physiological responses of vascular plants to heavy metals. *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, str. 149–177.
- Genkov, T., Tsoneva, P., Ivanova, I. (1997): Effect of Cytokinins on Photosynthetic Pigments and Chlorophyllase Activity in in Vitro Cultures of Axillary Buds of *Dianthus caryophyllus* L. *J. Plant Growth Regul.* **16**: 169-172.
- Hillman, W. S., Culley, D.D. Jr. (1978): The uses of duckweed. *Am. Sci.* **66**: 442-451.

- Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993): Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**: 481-483.
- ISO/CD 20079 (2001) Water quality – Determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed growth inhibition test. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Kadlek, P., Rank, B., Ticha, I. J. (2003): Photosynthesis and photoprotection in *Nicotiana tabacum* L. in vitro grown plantlets. *Plant Physiol.* **160**: 1017–1024.
- Kautsky, H., Hirsch, A. (1931): Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation, *Naturwissenschaften*, **19**: 964-964.
- Kenrick, P. R., Crane, P. (1997): The origin and early diversification of land plants. A cladistic study. Smithsonian Institution Press, Washington & London. Washington: Smithsonian Inst. Press.
- Krajnc, B., Devidé, Z. (1980): Report on photoperiodic responses in Lemnaceae from Slovenia, *Berichte des Geobot. Inst.* **47**: 75-86.
- Lakatos, G., Mészáros, I., Bohátka, S., Szabó, S., Makadi, M., Csaltós, M, Langer, G. (1993): Application of *Lemna* species in ecotoxicological studies of heavy metals and organic biocides. *Sci. Tot. Environ. Supplement*: 773-778.
- Landolt, E. (1986): The family of *Lemnaceae*: A monographic study (Vol. 1) Veröffentlichungen des Geobotanischen Institute des Edig. Tech. Hochschule, Stiftung Rübél. Zürich. 71. Heft.
- Landolt, E., Kandeler, R. (1987): Biosystematic investigations in the family of duckweeds (*Lemnaceae*) (vol. 4). The family of Lemnaceae – A monographic study, vol.2. Veröff. Geobot. Inst. ETH, Zürich.
- Lewis, M. A. (1995): Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: A review. *Environ. Pollut.* **87**: 319-336.

- Lee, S. H, Tewari, R. K, Hahn E. J., Paek, K. Y. (2007): Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania Somnifera* (L.) Dunal. plantlets. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **90**:141–151.
- Lichtenthaler, H. K. (1987): Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol.* **148**: 350-382.
- Mache, R., Loiseaux S. (1973): Light saturation of growth and photosynthesis of the shade plant *marchantia polymorpha*. *J. Cell Sci.* **12**: 391-40.
- Mahdavian, K., Ghorbanli, M., Kalantrari, Kh. M. (2008): The effects of ultraviolet radiation on the content of chlorophyll, flavonoid, anthocyanin and proline in *Capsicum annum* L. *Turk. J. Bot.* **32**: 25-33.
- Maxwell, K., Johnson, G. N. (2000): Chlorophyll fluorescence- a practical guide, *J. Exp. Bot.* **51**: 659-668.
- McDonald, M. S. (2003): *Photobiology of higher plants*, Wiley, England.
- McNellis, T. W, Deng, X. W. (1995): Light Control of Seedling Morphogenetic Pattern. *Plant Cell* **7**: 1749-1761.
- Miyake, C., Katsumi, A., Naomasa, S. , Toshio, S. (2009): Acclimation of Tobacco Leaves to High Light Intensity Drives the Plastoquinone Oxidation System—Relationship Among the Fraction of Open PSII Centers, Non-Photochemical Quenching of Chl Fluorescence and the Maximum Quantum Yield of PSII in the Dark. *Plant Cell Physiol.* **50**: 730–743.
- Muller, P., Li, X., Niyogi, K. K. (2001): Non-Photochemical Quenching. A response to Excess Light Energy. *Plant Physiol.* **125**: 1558-1566.
- Murchie, E.H., Horton, P. (1997): Acclimation of photosynthesis to irradiance and spectral quality in British species: chlorophyll content, photosynthetic capacity and habitat preference. *Plant Cell Environ.* **20**: 438-448.

- Osmond, C. B. (1994): What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. U: Bake N. R., Bowyer J. R. (ur.), Photoinhibition of Photosynthesis from Molecular Mechanisms to the Field. Bios Scientific Publisher, Oxford, UK, str. 1–24.
- Perks, M. P., Monaghan, S., O'Reilly, C., Mitchell, D. T. (2001): Chlorophyll fluorescence characteristics, performance and survival of freshly lifted and cold stored Douglas-fir seedlings. *Ann. Forest Sci.* **58**: 225-235.
- Perks, M. P., Osborne, B. A., Mitchell, D. T. (2004): Rapid predictions of cold tolerance in Douglas-fir seedlings using chlorophyll fluorescence after freezing. *New Forest.* **28**: 49-62.
- Pevalek-Kozlina, B. (2003): Fiziologija bilja, Profil, Zagreb
- Pirson, A., Seidel, F. (1950): Zell- und stoffwechselfysiologische Untersuchungen an der Wurzel von *Lemna minor* unter besonderer Berücksichtigung von Kalium- und Calciummangel. *Planta* **38**: 431-473.
- Quibit Systems Inc. (2006): Chlorophyll fluorescence Logger Pro 3 Version. Instructors manual, Kanada.
- Ritchie, G. A. (2006): Chlorophyll Fluorescence: What Is It and What Do the Numbers Mean? USDA For. Serv. Proceedings RMRS-P **43**: 34-43.
- Ritz, M., Thomas, J. C., Spilar A., Etienne, A. L. (2000): Kinetics of Photoacclimation in Response to a Shift to High Light of the Red Alga *Rhodella violacea* Adapted to Low Irradiance. *Plant Physiol.* **123**: 1415–1425.
- Roger, R. R., Weiss, O. (2001): Fluorescence techniques, U: Reigosa R.M. (ur.) Handbook of Plant ecophysiology techniques, Kluwer Academic Publisher, The Netherlands.
- Schreiber, U., Klughammer, C. (1994): An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700+-absorbance changes at 830 nm. *Planta* **192**: 261- 268.

Šari , M. (2001): Utjecaj kadmija na vodenu le u (*Lemna minor* L.) u uvjetima *in vitro*,  
Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu.

Štroch, M., Kuldova, K., Kalina, J., Špunda, V. (2008): Dynamics of the xanthophyll cycle  
and non-radiative dissipation of absorbed light energy during exposure of Norway spruce to  
high irradiance. *J. Plant Physiol.* **165**: 612—622.

Thomas, A.S., Dunn, S. (1967): Plant growth with new fluorescent lamps. Fresh and dry  
weight yields of tomato seedlings. *Planta* **72**:198-207.

Toth, N., Žuti , I., Novak, B., Benko, B., Herak usti , M. (2005): Utjecaj organskih  
mala na rast salate. Zbornik radova XL. znanstvenog skupa hrvatskih agronoma s  
meunarodnim sudjelovanjem, Osijek..

Valladares, F., Pearcy, R. W. (1997): Interactions between water stress, sun-shade  
acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*.  
*Plant Cell Environ.* **20**: 25–36.

Wang, W. (1990): Literature review on duckweed toxicity testing. *Environ. Res.* **52**: 7-22.

Wang, W. (1991): Literature Review on higher plants for toxicity testing. *Water Air Soil  
Pollut.* **59**: 381-400.

Internet:

[http://www.meti.go.jp/english/information/data/TESTalga\\_daphnia.html](http://www.meti.go.jp/english/information/data/TESTalga_daphnia.html)

<http://www.mobot.org/jwcross/duckweed/phytochrome.htm#tetrapyrrole>

<http://www.sylvania-lamps.com/>

<http://www.wikipedia.org>