

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Marcela Curman

**Udio fenolnih spojeva, antioksidacijska aktivnost i fotosintetska
učinkovitost rosika (Droseraceae)**

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad izrađen na Biološkom odsjeku, u Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Mirte Tkalec, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu zbog stjecanja naziva magistre edukacije biologije i kemije.

ZAHVALA

Zahvaljujem se od srca svojoj mentorici Mirti Tkalec na pomoći oko diplomskog rada, na silnom strpljenju, brojnim smjernicama i sugestijama tijekom pisanja, te pregleda cjelokupnog rada.

Zahvaljujem se dragoj asistentici Mariji Babić na velikoj pomoći, strpljenju, savjetima i uputama vezanim za eksperimentalni dio diplomskog rada, kao i pregled cjelokupnog rada.

Zahvaljujem se svojim roditeljima Jadranki i Željku, bratu Dinu, dečku Matiji i dragim prijateljima koji su me podržavali i hrabрили tijekom mojeg studiranja. Hvala Vam na prekrasnim riječima i snazi koju ste mi pružali i što je vaša vjera u mene uvijek bila jaka. Bez Vas moj put bio bi puno teži.

Ovaj rad posvećen je mojoj baki Štefici i djedu Stjepanu koji su mi svojom silnom ljubavlju davali snagu i što su mi bili podrška na svakom mojem putu tako i tijekom studiranja. Hvala Vam.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Udio fenolnih spojeva, antioksidacijska aktivnost i fotosintetska učinkovitost rosika (Droseraceae)

Marcela Curman

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Rosike (Droseraceae) spadaju u mesojedne biljke. Žive na osvijetljenim, močvarnim staništima siromašnim nutrijentima. Imaju aktivne stupice jer pokretanjem svojih tentakula love plijen. Cilj ovog istraživanja je bio utvrditi kako se tri vrste rosika *Drosera aliciae*, *D. capensis* i *D. spatulata* prilagođavaju različitim uvjetima uzgoja te postoje li razlike između plojki listova koje nose tentakule i peteljki listova. U tu svrhu određivan je udio fenolnih spojeva, udio fotosintetskih pigmenata, fotosintetska učinkovitost te antioksidacijska aktivnost. Veća fotosintetska učinkovitost izmjerena je kod plojki u odnosu na peteljke listova, te je viša kod vrsta *D. capensis* i *D. aliciae* uzgajanih u vanjskim uvjetima, a kod vrste *D. spatulata* u sobnim uvjetima. Veći udio fotosintetskih pigmenata izmjeren je kod plojki u odnosu na peteljke listova, što se može povezati s višom fotosintetskom učinkovitošću. Udio ukupnih fenola, flavonoida i antocijana je viši u plojkama u odnosu na peteljke što je i logično jer se na plojkama nalaze ružičasti tentakuli koji privlače kukce. Udio flavonoida i antocijana viši je u vanjskim uvjetima kod vrsta *D. spatulata* i *D. aliciae*, dok je kod vrste *D. capensis* viši u sobnim uvjetima. Razlike između vrsta ukazuju da osim intenziteta svjetlosti i drugi faktori imaju učinak na udio pigmenata i fenolnih spojeva. Antioksidacijska aktivnost je podjednako visoka kod svih triju vrsta.

(51 stranica, 18 slika, 57 literaturnih navoda, jezik izvorni: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: mesojedne biljke, rosike, fotosintetska učinkovitost, fotosintetski pigmenti, ukupni fenoli, flavonoidi, antocijani, plojka i peteljka listova

Voditelj: Dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof.

Neposredni voditelj: Dr. sc. Marija Babić

Ocjenitelji: Dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof.

Dr. sc. Ines Radanović, izv. prof.

Dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek, izv. prof.

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Content of phenolic compounds, antioxidative activity and photosynthetic efficiency of sundews (Droseraceae)

Marcela Curman

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sundews (Droseraceae) are carnivorous plants. They live in sunny, wetland habitats, poor of nutrients. They have active traps because they hunt prey by moving their tentacles. The aim of this study was to determine how sundews *Drosera aliciae*, *D. capensis* and *D. spatulata* can adapt to different grow conditions as well as, are there any differences between leaf blades carrying tentacles, and petioles. For this purpose, content of phenolic compounds and photosynthetic pigments, photosynthetic efficiency and antioxidative activity was evaluated. The higher photosynthetic efficiency was measured in leaf blades than petiole, and it was higher in outdoor-growing *D. capensis* and *D. aliciae*, and in indoor-growing *D. spatulata*. The higher content of photosynthetic pigments was in leaf blades, so we can associate it with high photosynthetic efficiency. Content of phenolic compounds, flavonoids and anthocyanins was higher in leaf blades which was expected because they have red tentacles, which attract prey. Content of flavonoids and anthocyanins was higher in outdoor-growing *D. spatulata* and *D. aliciae* while in sundew *D. capensis*, was higher in indoor-growing plants. Differences between sundew species indicate that beside intensity of light, other factors can have the influence on content of photosynthetic pigments and phenolic compounds also. Antioxidative activity is equally high in all sundews.

(51 pages, 18 figures, 57 references, original: in Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: carnivorous plants, sundews, photosynthetic efficiency, photosynthetic pigments, total phenols, anthocyanins, flavonoids, leaf blades and petiole

Supervisor: Dr. Mirta Tkalec, Assoc.Prof.

Assistant Supervisor: Dr. sc. Marija Babić

Reviewers: Dr. Mirta Tkalec, Assoc.Prof.

Dr. Ines Radanović, Assoc.Prof.

Dr. Draginja Mrvoš-Sermek, Assoc.Prof.

Thesis accepted:

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. ROD ROSIKA (<i>Drosera</i>).....	2
1.1.1. Južnoafrička rosika (<i>Drosera capensis</i>)	4
1.1.2. Širokolisna rosika (<i>Drosera aliciae</i>).....	5
1.1.3. Žličasta rosika (<i>Drosera spatulata</i>).....	6
1.2. FOTOSINTEZA.....	7
1.2.1. Fotosintetski pigment.....	9
1.2.2. Fluorescencija klorofila <i>a</i>	11
1.3. FENOLNI SPOJEVI.....	12
1.3.1. Flavonoidi.....	12
1.3.2. Antioksidacijska aktivnost.....	14
1.4. SVJETLOST I NJEZIN UČINAK NA BILJKE.....	14
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	17
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. Biljni materijal.....	18
3.2. Mjerenje fluorescencije klorofila u uvjetima <i>in vivo</i>	19
3.3. Određivanje udjela fotosintetskih pigmenata u tkivu.....	20
3.4. Određivanje ukupnih fenola, flavonoida i antocijana.....	21
3.4.1. Ekstrakcija.....	21
3.4.2. Određivanje udjela ukupnih fenola.....	21
3.4.3. Određivanje udjela flavonoida.....	22
3.4.4. Određivanje udjela antocijana.....	22
3.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom.....	23
3.6. Statistička analiza rezultata.....	23
4. REZULTATI	24
4.1. FLURESCENCIJA KLOOROFILA U UVJETIMA <i>in vivo</i>	24
4.1.1. Optimalni prinos fotosustava II.....	24
4.1.2. Omjer varijabilne i minimalne fluorescencije.....	26
4.1.3. Stopa pada fluorescencije klorofila.....	27
4.2. UDIO FOTOSINTETSKIH PIGMENATA U TKIVU.....	28
4.2.1. Udio klorofila <i>a</i>	28

4.2.2. Udio klorofila <i>b</i>	29
4.2.3. Udio ukupnih karotenoida.....	30
4.3. UDIO FENOLNIH SPOJEVA U TKIVU	31
4.3.1. Udio ukupnih fenola.....	32
4.3.2. Udio flavonoida.....	33
4.3.3. Udio antocijana.....	34
4.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST U EKSTRAKTIMA TKIVA.....	35
5. RASPRAVA.....	36
5.1. Fotosintetska učinkovitost.....	37
5.2. Udio fotosintetskih pigmenta.....	39
5.3. Udio fenolnih spojeva u tkivu.....	41
5.4. Antioksidacijska aktivnost.....	44
6. ZAKLJUČAK.....	45
7. LITERATURA.....	47

1. UVOD

Mesojedne biljke su autotrofni organizmi koji fotosintezom proizvode vlastitu organsku tvar. Obzirom da nastanjuju staništa siromašna hranjivim tvarima (Pavlovič i sur., 2014) nedostatak minerala u tlu nadoknađuju probavljajući kukce koje ulove. Zbog nedostatka hranjivih tvari mesojedne biljke proizvele su i niz prilagodbi kako bi upile hranjive tvari iz plijena (Juniper i sur., 1989) i kako bi se zaštitile od patogena (Okabe i sur., 2005). Hranjenje poboljšava njihov rast, cvjetanje i dulji život (Pavlovič i sur., 2009). Isto tako mesojedne biljke modificirale su listove kako bi mogle uloviti svoj plijen. One to čine na aktivan ili pasivan način. Kod aktivne klopke listovi su preobraženi tako da svojim pokretanjem hvataju plijen, dok su pasivne klopke nepokretne. Razne vrste zamki dolaze u mnogo različitih oblika i veličina (Slack, 2000). U pasivne klopke spadaju vrčaste stupice koje su prisutne kod rodova *Heliamphora*, *Sarracenia*, *Darlingtonia*, *Nepenthes* te *Cephalotus*, zatim stupice nalik na vršu za jastoge kod roda *Genlisea* te ljepljive stupice kod rodova *Byblis* i *Drosophyllum* (Slack, 2000). Pasivne klopke se ne pomiču već mame insekte u biljku gdje zatim budu uhvaćeni, te većinom imaju dio lista preobražen u strukturu nalik na vrč ili lijevak u kojem se nalaze probavni sokovi. Vrčonoše imaju crvene žile koje produciraju nektar i reflektiraju UV-svjetlo (Newell i Nastase, 1998), a nalaze se s unutrašnje površine poklopca te na taj način privlače kukce, dok kod nekih vrsta kukce privlači i boja vrča. Privučeni nektarom kukci dolaze na rub vrča koji je sklizak (d'Amato, 2013) te oni upadaju ravno u unutrašnjost vrča. Unutrašnjost površine vrča obložena je dlakama usmjerenim prema dolje, tako da kukac lako sklizne na dno vrča ali ne može pobjeći van. Na dnu vrča je tekućina u koju kukac upadne, a probavne žlijezde izlučuju kiselinu i enzime te kukac biva probavljen. Za razliku od pasivnih stupica aktivne stupice love kukce svojim pokretanjem. Aktivne stupice prisutne su kod rodova *Pinguicula* i *Drosera* i to kao ljepljive stupice, dok su stupice s iznenadnim zatvaranjem prisutne kod roda *Dionaea* i *Aldrovanda*, a rodovi *Utricularia* i *Polypompholyx* imaju stupice s usisavanjem (Slack, 2000). Među najpoznatije mesojedne biljke s aktivnim stupicama spada vrsta *Dionaea muscipula* (Slack, 2000). Njihove plojke su sastavljene od dvije polovice koje na rubovima imaju zupce. Privlače kukce intenzivnom crvenom bojom i nektarom. Na klopka se nalaze tri dlačice od kojih kukac treba podražiti dvije odjednom kako bi se klopka zatvorila (Król i sur., 2012). Nakon zatvaranje klopke, žlijezde izlučuju probavne enzime te kukac biva probavljen. Zbog svojeg neobičnog načina prehrane mesojedne biljke

zanimljive su i često istraživane. Još davne 1875. Charles Darwin je u svojem djelu "Insektivorne biljke" opisivao biljke koje imaju sposobnost hvatanja i probavljanja kukaca.

1.1. ROD ROSIKA (*Drosera*)

Porodica Droseraceae obuhvaća rodove *Drosera*, *Dionea* i *Aldrovanda*. Rosike (*Drosera*) su rod mesojednih biljaka kojima ime potječe od grč. riječi *drosos* što znači kapljica rose. Rasprostranjene su na obje hemisfere, te ih ima svugdje osim na Antarktici (d`Amato, 2013). Nastanjuju kisela, siromašna tla, većinom močvare (Slack, 2000) i žive u zajednici s mahovinama roda *Sphagnum* (Gibson, 1993). Vrste se međusobno razlikuju u veličini i obliku lista. Neki su jednostavni, neki razdijeljeni, a neki skupljeni u rozetu. Korijen je većinom vlaknast. Rosike imaju aktivne zamke pomoću kojih mame i love kukce. Na gornjoj površini listova nalaze se tentakuli ružičaste boje na kojima je ljepljiva kapljica. Ljepljiva sluz atraktivne boje privlači kukce, on se prilijepe na "kapljicu rose", počinje pojačana proizvodnja sluzi (Król i sur., 2012) pa kukac ne može pobjeći. Na taj način kukac podražuje tentakule te nastaje akcijski potencijal koji dovodi do njihovog savijanja (Król i sur., 2012). Podraživanje tentakula je kemijsko i mehaničko. Duljina tentakula nije svugdje podjednaka, na rubovima lista oni su najdulji (Gibson i Waller, 2009), te se dužina smanjuje prema unutrašnjosti, a u središnjem djelu lista jako su kratki i potpuno uspravni. Kod kraćih tentakula jača je adhezija i bolja apsorpcija hranjivih tvari iz insekata (Gibson i Waller, 2009). Svojim pokretanjem tentakuli usmjeravaju plijen prema središtu lista gdje su probavne žlijezde brojnije. Probavne žlijezde luče mravlju kiselinu, enzime i to proteaze, fosfataze, nukleaze, amilaze, peroksidaze i dr. (Juniper i sur., 1989). Kukac biva razgrađen, te na taj način biljke crpe hranjive tvari kako bi nadoknadile nedostatak minerala u tlu. Skelet kukca ostaje neprerađen (Matusikova i sur., 2005). Kada je probava završena list se vraća u početni položaj, no savijanje se može ponoviti samo tri puta po tentakulu. Mesojedne biljke mogu rasti, preživjeti i razmnožavati se bez da ulove kukca (Slack, 2000), no hranjenje poboljšava njihov rast, cvjetanje i proizvodnju sjemenja (Pavlovič i sur., 2009).

Iako vole sunčana, vlažna tresetišta biljke iz porodice *Droseraceae* mogu se prilagoditi i životu u zasjenjenim uvjetima. Rosike se uspješno aklimatiziraju na različite intenzitete osvjetljenja mijenjajući sadržaj i sastav fotosintetskih pigmenata i fenolnih spojeva (Tkalec i

sur., 2015). Kod većine biljnih vrsta učinkovitost fotosinteze, te sadržaj fotosintetskih pigmentata, te fenolnih tvari ovise o intenzitetu svjetlosti (Walters, 2005), a kod mesojednih biljaka i o količini dušika koju prime od kukaca (Pavlovič i sur., 2014). Fenolni spojevi imaju važnu ulogu u zaštiti protiv predatora, te u rastu i reprodukciji biljke. Zbog farmakoloških svojstva, fenolni spojevi rosika koriste se u medicinskim pripravcima za liječenje dišnih bolesti.

1.1.1. JUŽNOAFRIČKA ROSIKA (*Drosera capensis*)

Rosika *Drosera capensis* ima duguljaste listove skupljene u prizemnu rozetu. Duljina listova je oko 3,5 cm (bez peteljke), a širina 0,5 cm, te promjer rozete oko 8 cm. Jači i dulji tentakuli, te dulji listovi mogu uhvatiti veći plijen, ali se pokreću sporije (Gibson i Waller, 2009). Na gornjoj površini zelenih listova nalaze se tentakuli ružičaste boje, dok je donja površina lista glatka. Na tentakulima se nalaze prozirne ljepljive kapljice za koje se kukac zalijepi (Slack, 2000). Imaju male ljubičaste cvjetove koji se nalazi na 30 cm dugoj peteljci, cvatu u kasno proljeće ili rano ljeto. Živi na kiselim, siromašnim tlima, najčešće u močvarama, u zajednici s mahovinama roda *Sphagnum* (Gibson, 1993). Rasprostranjena je u Južnoj Africi. Voli temperature između 10 °C – 27 °C, iako kraće vrijeme podnosi i niže temperature i to od 0 °C – 4 °C, odnosno više temperature (38 °C) (d`Amato, 2013). Uz odgovarajući uzgoj raste cijele godine i nije zahtjevna zbog čega je jedna od najčešćih uzgajanih vrsta među rosikama.



Slika 1. *Drosera capensis* (južnoafrička rosika),

preuzeto s <http://cpphotofinder.com/drosera-capensis-522.html>

1.1.2. ŠIROKOLISNA ROSIKA (*Drosera aliciae*)

Drosera aliciae se sastoji od malih listova u rozeti koji su klinastog oblika. Duljina listova je oko 2,5 cm, a promjer rozete do 5 cm. Gornja površina zelenog lista je puna ružičastih tentakula. Listovi mogu biti zelene ili crvenkaste boje, zbog većeg udjela antocijana, koji štite od svjetlosnog i UV-B zračenja (Winkel-Shirley, 2002). Ima ljubičaste cvjetove koji se nalaze na 30 cm dugoj peteljci, kako oprašivači ne bi upali u zamku listova. Staništa na kojima obitava su kisela i siromašna nutrijentima, a najčešće živi u zajednici s mahovinama roda *Sphagnum* (Gibson, 1993). Rasprostranjena je u Južnoj Africi. Uvjeti uzgoja su slični kao i kod vrste *Drosera capensis*, raste cijele godine i zahtijeva subtropske uvjete iako ova vrsta može podnijeti i kratkotrajne niske temperature do -7 °C (d'Amato, 2013).



Slika 2. *Drosera aliciae* (širokolisna rosika),

preuzeto s <http://wesselsgardenway.com/2013/05/>

1.1.3. ŽLIČASTA ROSIKA (*Drosera spatulata*)

Drosera spatulata ima listove koji su nalik žlici, a skupljeni su u rozetu. Duljina listova je 5 mm, širina 4 mm, a promjer rozete 4 cm. Ovisno o uvjetima u kojima raste listovi mogu biti zelene ili crvenkaste boje zbog više antocijana. Na gornjoj strani lista nalaze se ružičasti tentakuli (Gibson i Waller, 2009), dok je donja strana lista glatka. Ljubičasti cvjetovi nalaze se na 8 cm visokoj peteljci i cvatu početkom ljeta. Žive na kiselim tlima, koja su siromašna nutrijentima u tropskom i subtropskom području. Nađene su od južnog Japana i jugoistočne Azije do Australije i Novog Zelanda (d'Amato, 2013). Voli temperature između 10 °C – 27 °C, iako kraće vrijeme podnosi i niže temperature i to od 0 °C – 4 °C, odnosno više temperature (38 °C) (d'Amato, 2013).



Slika 3. *Drosera spatulata* (žličasta rosika),

preuzeto s <http://www.carnivoras.com.br/haste-floral-de-drosera-spatulata-ajuda-urgente-t2074-10.htm>

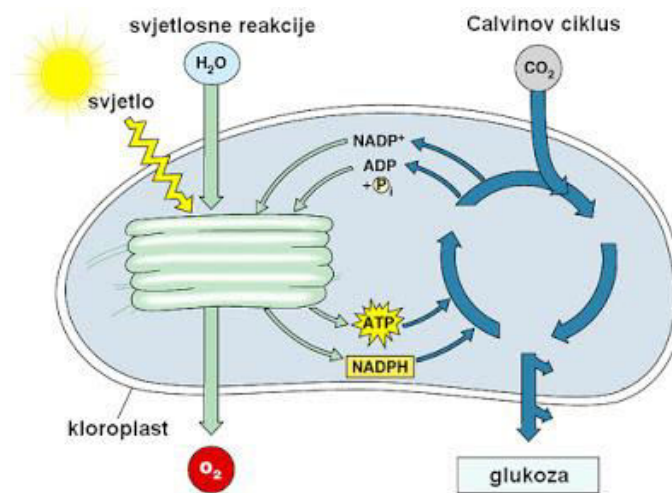
1.2. FOTOSINTEZA

Riječ fotosinteza dolazi od grč. riječi *fotos* (svjetlo) i *synthesis* (spajanje s nečim). Biljke su autotrofni organizmi koji sintetiziraju organske spojeve iz anorganskih tvari primljenih iz okoliša. Za proces fotosinteze biljkama je neophodan ugljikov dioksid (CO_2), voda i svjetlosna energija. Fotoautotrofni organizmi pretvaraju sunčevu energiju u kemijsku energiju koja se pohranjuje u kemijskim vezama šećera. Proces se odvija u kloroplastima. Oni spadaju u plastide i nalaze se u citoplazmi, a sadrže pigmente kao što su klorofili i karotenoidi. Građeni su od tri različite membrane; vanjske, unutrašnje i tilakoidne, te sadrže tri zasebna prostora; međumembranski, tilakoidni i stromin.

Proces fotosinteze dijeli se na primarne i sekundarne reakcije. Primarne ili fotokemijske reakcije odvijaju se u tilakoidnim membranama kloroplasta. Svjetlosne reakcije sastoje se od prijenosa elektrona i protona između različitih molekularnih kompleksa smještenih u tilakoidnim membranama. U tim reakcijama sudjeluju dva fotosistema, fotosistem I i fotosistem II koji su povezani transportnim lancem elektrona. Fotosistem I sadrži klorofil P_{700} čiji je maksimum apsorpcije pri 700 nm, a fotosistem II sadrži klorofil P_{680} čiji je maksimum apsorpcije pri 680 nm. Svaki fotosistem ima svoj specifičan klorofil *a*, s određenom valnom duljinom apsorpcije. Fotokemijske reakcije počinju apsorpcijom fotona svjetlosti na fotosustavu I, iz čijeg se klorofila izbijaju dva elektrona koji se prenose do oksidiranog koenzima NADP^+ , a zajedno s protonima reduciraju ga u NADPH . Fotosustav I otpuštanjem elektrona ostaje pozitivno nabijen, te elektrone nadoknađuje transportnim lancem elektrona, iz fotosustava II, nakon apsorpcije fotona svjetlosti. Fotosustav II gubitkom elektrona ostaje pozitivno nabijen, a nadoknađuje elektrone fotolizom vode. Fotoliza vode je razgradnja vode pomoću svjetlosti na elementarni kisik i vodikove ione. Difuzijom H^+ iona iz tilakoidnog prostora u stromu preko enzima ATP- sintetaze dolazi do oslobađanja kemijske energije i pohranjivanje u molekulama ATP-a. U primarnim reakcijama fotosinteze nastaje NADPH , ATP i O_2 .

Sekundarne reakcije ili Calvinov ciklus odvija se u stromi kloroplasta. Molekula CO_2 , jedini izvor atoma ugljika reducira se i veže u šećere (trioze). Calvinov ciklus odvija se u tri stupnja. Prvi stupanj je vezanje ugljik dioksida karboksilacijom ribuloza-1,5-bisfosfata pomoću enzima Rubisco i nastanak dvije molekule stabilnog inetrmedijera 3-fosfoglicerata. Drugi stupanj je redukcija 3-fosfoglicerata do ugljikohidrata pomoću ATP-a i NADPH iz

svjetlosnih reakcija. Prvi ugljikohidrat koji nastaje je šećer s tri C- atoma, gliceraldehid-3-fosfat. Treći stupanj je regeneracija početnog spoja, ribuloza-1,5-bisfosfata. Kako bi se Calvinov ciklus neometano odvijao te kako bi bilo dovoljno intermedijera za regeneraciju ribuloza-1,5-bisfosfata ciklus se mora okrenuti tri puta fiksirajući po tri molekule CO₂ (Pevalek-Kozlina, 2003).



Slika 4. Svjetlosne reakcije i Calvinov ciklus,

preuzeto s <http://instrukcije-kemija.blogspot.com/>

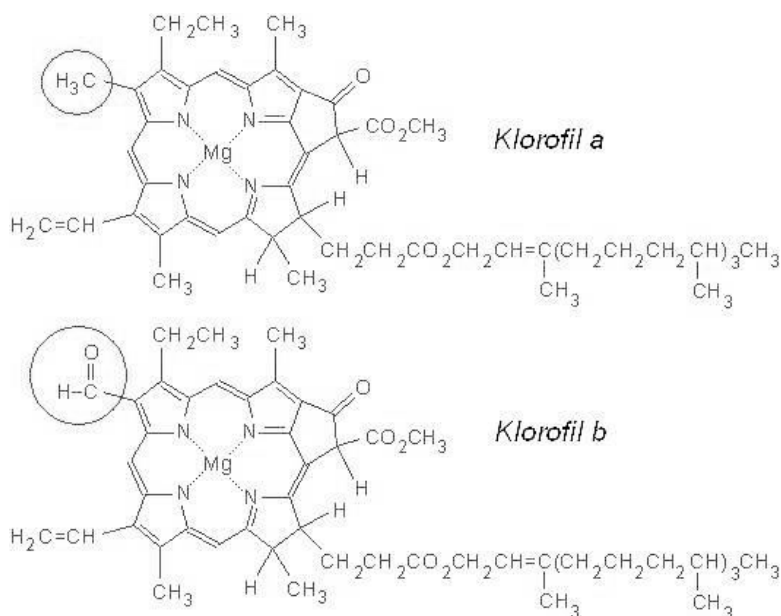
Svake se godine fotosintezom transformira oko 200 do 500 milijardi tona ugljika i proizvodi više od 100 milijardi metričkih tona ugljikohidrata. Veliki dio energije na Zemlji rezultat je fotosintetske aktivnosti koja se zbivala u prošlosti (fosilna goriva) ili se zbiva u današnje doba (biomasa) (Pevalek-Kozlina, 2003).

1.2.1. FOTOSINTETSKI PIGMENTI

U stanicama mezofila lista nalazi se veliki broj kloroplasta koji u tilakoidnim membranama sadrže pigmente klorofile i karotenoide.

Od klorofila pri fotosintezi najveće značenje ima klorofil *a*. U biljkama i nekim algama osim klorofila *a* redovito je prisutan i klorofil *b*, i to u koncentraciji koja može iznositi 1/3 koncentracije klorofila *a*. Klorofil *a* je plavozelene boje i maksimalno apsorbira svjetlost valnih duljina 430 i 662 nm, dok je klorofil *b* žutozelene boje, a maksimalno apsorbira svjetlost valnih duljina 453 i 642 nm (Pevalek-Kozlina, 2003).

Klorofil je građen od četiri pirolska prstena koji su međusobno spojeni metilnim skupinama u porfirinski prsten. U središtu tog prstena nalazi se atom magnezija. Za jedan pirolski prsten vezan je lipofilni fitolski rep. Taj "rep" je topljiv u lipidima što omogućuje molekulama klorofila da se uklope u membranu. Klorofil *a* na pirolskom prstenu br. II ima metilnu skupinu, a klorofil *b* aldehidnu skupinu. Klorofil *b* i karotenoide ubrajamo u pomoćne pigmente jer apsorbiraju svjetlost i prenose energiju na klorofil *a* (Pevalek-Kozlina, 2003).

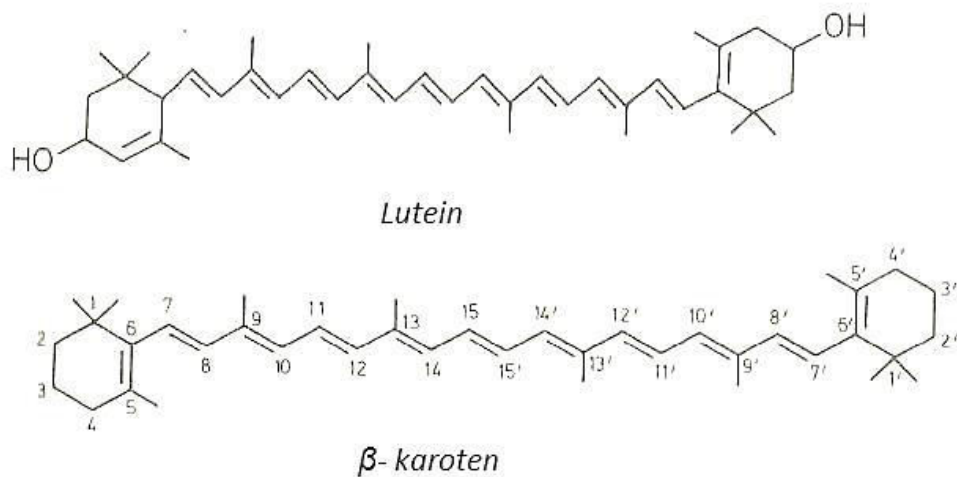


Slika 5. Prikaz strukture klorofila *a* i klorofila *b*,

preuzeto s <https://istiqomahrrr.wordpress.com/2013/06/12/pigmen-klorofil/>

Pigmenti karotenoidi su po građi terpeni. Lipofilni su spojevi koji se sastoje od izoprenskih jedinica s jednim ili dva ionska prstena. Zbog velikog broja konjugiranih dvostrukih veza, obojeni su najčešće crveno (likopen, karoten) ili žuto (ksantofili) (Karlson, 1982). Apsorbiraju svjetlost valne duljine između 380-550 nm, što odgovara plavom ili plavo-ljubičastom spektru svjetlosti.

Zbog toga što pigmenti apsorbiraju velike količine energije, može doći do oštećenja fotosintetske membrane. Ako pobuđeno stanje klorofila potraje dulje dolazi do reakcije s molekulskim kisikom, pri čemu nastaje singletni kisik koji je vrlo reaktivan i može oštetiti mnoge stanične sastojke, osobito lipide. Karotenoidi djeluju zaštitno tako da brzo "ugase" pobuđeno stanje klorofila (Pevalek-Kozlina, 2003).



Slika 6. β-karoten i lutein,

preuzeto iz knjige Karlson 1982

1.2.2. FLUORESCENCIJA KLOROFILA *a*

Fotosintetska učinkovitost je odnos između apsorbirane i akumulirane energije. Na fotosintetsku učinkovitost djeluju brojni unutrašnji i okolišni čimbenici kao što je razvojno stanje biljke, opskrbljenost vodom i mineralnim tvarima, otvorenost puči, temperatura, kvaliteta i intenzitet osvjetljenja, koncentracija ugljikova dioksida i kisika te strujanje zraka. Fluorescencija je pojava kad elektron pri povratku iz stanja više energije u osnovno stanje otpušta foton. Fluorescentna svjetlost uvijek ima veću valnu duljinu i manju energiju nego svjetlost koja ju je izazvala (Pevalek-Kozlina, 2003). Količina svjetlosti oslobođena procesom fluorescencije iznosi 1-2 % (Maxwell i Johnson, 2000) a mjeri se fluorimetrom. Mjerenje fluorescencije klorofila *a in vivo* jedna je od najčešće korištenih metoda ne samo u proučavanju fotosinteze nego i stresa kod biljaka. Naime ova metoda daje korisne informacije o fotosintetskoj učinkovitosti (Brestic i Zivcak, 2013), a fotosintetska učinkovitost ukazuje na vitalnost biljke. Glavnina fluorescencije u listovima potječe od fotosistema II. Kad je biljni materijal u uvjetima tame molekule plastokinona su u potpunosti oksidirane i kao takve mogu primiti elektrone te je intenzitet fluorescencije vrlo nizak. Kod jačeg intenziteta osvjetljenja ne može se iskoristiti sva apsorbirana svjetlosna energija zbog nedostatka oksidiranih plastokinona koji bi mogli primiti elektrone s PSII te se veći dio energije oslobađa u obliku fluorescencije. Fluorescencija zatim počinje padati do ravnotežnog stanja jer se ustalila određena stopa prijenosa elektrona. Budući da intenzitet fluorescencije u velikoj mjeri ovisi o redoks stanju plastokinona odnosno efikasnosti prijenosa elektrona, mjerenje fluorescencije klorofila *a* može nam reći u kakvom je stanju fotosintetski aparat iz čega možemo zaključiti i kakva je fotosintetska učinkovitost biljke u određenim uvjetima .

U ovom istraživanju mjerila sam optimalni prinos fotosustava II (F_v/F_m). Razlika između maksimalne i minimalne fluorescencije naziva se varijabilnom fluorescencijom (F_v). Omjer varijabilne i maksimalne (F_m) fluorescencije u listu koji je prilagođen na uvjete tame je mjera učinkovitosti fotosistema II u uvjetima kad su svi reakcijski centri oksidirani. Mjerila sam i omjer varijabilne i minimalne fluorescencije (F_v/F_0) koji osim o svjetlosnim reakcijama govori i o sekundarnim reakcijama fotosinteze. F_v/F_0 je osjetljiviji parametar u odnosu na F_v/F_m , pokazuje veće vrijednosti od F_v/F_m . Zadnji parametar koji sam mjerila je R_{Fd} koji kao i F_v/F_0 govori o reakcijama Calvinovog ciklusa.

1.3. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi imaju fenolnu tj. hidroksilnu skupinu (-OH) vezanu na aromatski prsten. Spadaju u sekundarne biljne metabolite i velika uloga im je zaštita biljaka (Kováčik i sur., 2010) od jake svjetlosti i ultraljubičastog zračenja (Waterman i sur., 1984) te od herbivornih organizama. Fenolni spojevi također imaju ulogu u mehaničkoj potpori te privlačenju oprašivača. Ubrajamo ih u antioksidanse te imaju veliku ulogu u zaštiti biljaka od fotooštećenja (Close i McArthur, 2002).

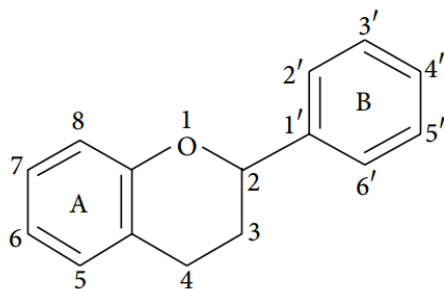
Mesojedne biljke bogate su fenolnim spojevima (Juniper i sur., 1989), a kod rosika je pronađen velik udio flavonoida (Repčák i sur., 2000). To može biti posljedica nižeg udjela dušika (N) u okolišu u kojem obitavaju mesojedne biljke, pošto je akumulacija fenolnih spojeva veća u uvjetima gdje je manji udio dušika (Kováčik i sur., 2010).

Na temelju svoje složenosti, biljni fenolni spojevi podijeljeni su na jednostavne fenolne spojeve, lignin, flavonoide i tanine (Pevalek-Kozlina, 2003).

1.3.1. FLAVONOIDI

Flavonoidi su jedna od najvećih i najistraživanijih skupina fenolnih spojeva. Vrlo su važni za obranu protiv infekcija i ozljeda te za pigmentaciju. Imaju veliku ulogu u zaštiti od svjetla, te apsorbiranju UV zračenja (Winkel-Shirley, 2002). Ovi spojevi također pokazuju protuupalno, antialergijsko i antimikrobno djelovanje. Od mnogih funkcija flavonoida najvažnija je antioksidativna aktivnost koja se očituje u neutraliziranju slobodnih radikala (Wangi sur., 2003), uklanjanju singletnog i tripletnog kisika te uklanjanju peroksida (Winkel-Shirley, 2002).

Struktura flavonoida sadrži 15 C atoma koji su raspoređeni u dva aromatska prstena međusobno povezana mostom od tri C-atoma. Na temelju oksidacije mosta od tri C-atoma, flavonoidi se dijele na flavone, flavonole, antocijane, katehine i izoflavone (Pevalek-Kozlina, 2003).



Slika 7. Prikaz strukture flavonoida,

preuzeto s <http://www.freelandtime.com/micoterapia/approfondimenti/i-flavonoidi.html>

Antocijani (grč. riječi *anthos*-cvijet i *kyaneuos*-plavo) su flavonoidni pigmenti koji cvjetovima, listovima i plodovima daju crveno, ružičasto i plavo obojenje sudjelujući tako u primamljivanju životinja koje oprašuju cvjetove i rasprostranjuju sjemenke (Jaakola i sur., 2004). Velika uloga antocijana je i zaštita od UV svjetla (Winkel-Shirley, 2002). Na boju antocijana utječe broj hidroksilnih i metoksilnih skupina na prstenu, prisutnost metala (Fe i Al), prisutnost flavona i flavonskih pigmenata te pH vrijednost vakuole (Pevalek-Kozlina, 2003).

Ovi spojevi istraživani su i zbog svojeg antioksidativnog učinka te preventivnog djelovanja na bolesti krvožilnog sustava u ljudskom organizmu (Kalt i Dufour, 1997).

Flavoni i flavonoli su dvije glavne skupine biljnih flavonoida, apsorbiraju svjetlost kraćih valnih duljina nego antocijanini i zato nisu vidljivi ljudskom oku, ali ih kukci npr. pčele mogu vidjeti (Pevalek-Kozlina, 2003). Uloga im je zaštita od UV-B zračenja. Obje skupine se nalaze u cvjetovima i epidermi listova.

1.3.2. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

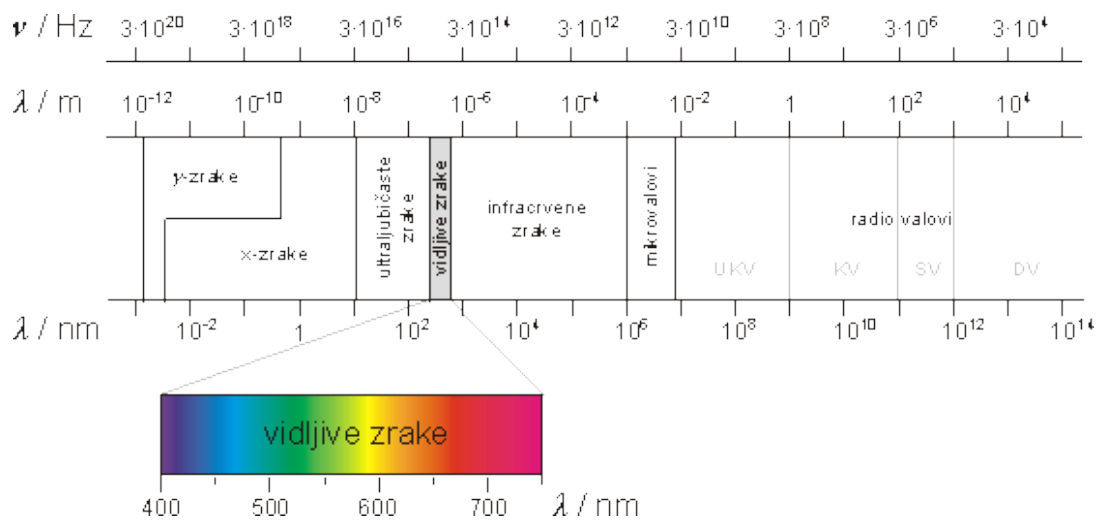
Izloženost biljaka ekološkim faktorima kao što su suša, nedostatak ili suvišak vode u tlu, visoke i niske temperature, povećan salinitet, izloženost ozonu, imaju nepovoljan utjecaj te mogu izazvati stres (Wang i sur., 2005). Ako je biljka izložena stresnim uvjetima fotosintetski aparat apsorbira više svjetlosti nego što može koristiti za fiksaciju ugljika. Dolazi do prijenosa energije na molekule kisika i to uzrokuje nastajanje kratkoživućih vrsta aktivnog kisika (ROS). ROS su kratko živuće vrste aktiviranog kisika poput singletnog kisika ($^1\text{O}_2$), hidroksidnog radikala ($-\text{OH}$) (Close i McArthur, 2002), vodikovog peroksida (H_2O_2) i superoksidnog radikala (O_2^-). Biljke posjeduju veoma učinkovit antioksidacijski sustav za gašenje ROS-a (Close i McArthur, 2002). Antioksidansi su skupina različitih prirodnih spojeva koji sprečavaju oksidaciju drugih tvari. Doniraju elektrone slobodnim radikalima i na taj način zaustavljaju lančanu reakciju stvaranja novih radikala, te sprečavaju njihovo štetno djelovanje. U antioksidanse ubrajamo askorbat, tiolne antioksidanse, tokoferol, flavonoide i druge fenolne spojeve (Arora i sur., 2002). Karotenoidi su učinkoviti "gasitelji" singletnog kisika (Havaux, 1998). Pritom nastaje ekscitirani triplet karotenoida koji svoju energiju otpušta u obliku topline. Još važnija uloga karotenoida je njihova sposobnost da direktno primaju ekscitiranu energiju elektrona od tripletnog klorofila i otpuštaju ju u obliku topline (Pevalek-Kozlina, 2003).

1.4 . SVJETLOST I NJEZIN UČINAK NA BILJKE

Svjetlost je elektromagnetsko zračenje vidljivo ljudskom oku. Elektromagnetsko zračenje je fizikalna pojava širenja električnih i magnetskih valova, odnosno fotona. Foton je kvant elektromagnetskog zračenja, čestica bez mase koja se giba brzinom svjetlosti (300 000 km/s). Valne duljine elektromagnetnih valova možemo prikazati pomoću spektra elektromagnetskog zračenja. Elektromagnetski spektar čine gama (γ) zrake, x-zrake,

ultraljubičaste zrake (UV), infracrvene zrake (IR), vidljive (VIS), mikrovalne i radiovalne zrake.

Vidljivu svjetlost možemo rastaviti na svjetla svih duljina valova od 400-800 nm staklenom prizmom ili optičkom rešetkom. Tako dobijemo spektar (lat. *spectrum* - slika) vidljive svjetlosti koji se sastoji od svjetlosti crvene, narančaste, žute, zelene, modre i ljubičaste boje, koje kontinuirano prelaze jedna u drugu (Filipović-Lipanić, 1979).



Slika 8. Elektromagnetski spektar,

preuzeto s <http://free-zg.t-com.hr/ivanzub/SAMP/foto1.html>

Biljkama je potrebna svjetlost kako bi mogle provoditi fotosintezu. Mnoge biljke primaju više svjetlosti nego što mogu iskoristiti (Müller i sur., 2001). Kada se poveća intenzitet osvjetljenja tada se fotosinteza u početku povećava linearno, zatim se postepeno smanjuje, a kada se fotosintetski aparat zasiti svjetlošću poprima konstantnu vrijednost. Kod određenog porasta svjetlosti dolazi do svjetlosnog zasićenja, te daljnji porast intenziteta svjetlosti ne utječe dalje na stopu fotosinteze.

Svjetlost je vrlo važan čimbenik fotosinteze i sve biljke imaju fotosintetski aparat prilagođen podneblju u kojem rastu. S obzirom na intenzitet svjetlosti koji im je potreban razlikujemo dvije vrste biljaka. To su biljke koje vole sunčana područja i njih nazivamo

heliofiti, te biljke zasjenjenih područja koje nazivamo skiofiti. Gibanja kloroplasta mogu bitno promijeniti sadržaj apsorbirane svjetlosti u fotosintetizirajućoj stanici. Pri slabom intenzitetu svjetlosti kloroplasti se postavljaju usporedno s površinom lista, odnosno okomito na smjer upada svjetlosti, a pri visokom intenzitetu svjetlosti kloroplasti se postavljaju uz površinu stanice koje je usporedna sa smjerom upada svjetlosti (Pevalek-Kozlina, 2003). Kod biljaka sunca koje su naglo izložene visokim stopama osvjetljenja kao i kod biljaka sjene, može doći do fotoinhibicije, odnosno do gubitka boje listova ili čak do ugibanja listova. Razni stresni uvjeti dovode do fotoinhibicije, kao što je zatvaranje puči u sušnim uvjetima, inaktivacija enzima uslijed visokih ili niskih temperatura. To stanje može dovesti do stvaranja toksičnih produkata a to su singletni kisik, superoksidni anion i hidroksilni radikali (Close i McArthur, 2002). Ti toksični produkti mogu oksidirati lipide, proteine, pigmente i druge molekule (Knox i Dodge, 1985). Pri povećanim intenzitetima svjetlosti kako bi izbjegle fotoinhibiciju biljke prilagođavaju svoj fotosintetski aparat tako da smanjuju koncentraciju fotosintetskih pigmenata, uglavnom klorofila te mijenjaju njihov omjer (Walters, 2005). Budući da karotenoidi učinkovito preuzimaju višak energije "gase" singletni kisik (Havaux, 1998) njihova koncentracija se u svjetlosnom stresu povećava kako bi zaštitili biljku od prejakog intenziteta svjetlosti (Demmig-Adams i sur., 1996). Kao što sam već spomenula veliku ulogu u zaštiti biljke od prejake svjetlosne energije imaju i fenolni spojevi, flavonoidi te antocijani.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Rosike su biljke sunčanih staništa ali se isto tako uzgajaju i u sobnim uvjetima. Ovim istraživanjem željela sam saznati na koji način se rosike prilagođavaju na tako različite uvjete. Istraživanje sam provela na tri najčešće uzgajane vrste rosika *D. capensis* (južnoafrička rosika), *D. spatulata* (žličasta rosika) i *D. aliciae* (širokolisna rosika). Dio biljaka bio je uzgajan na otvorenom prostoru pri visokim intenzitetima svjetlosti, a drugi dio biljaka bio je uzgajan u sobnim uvjetima pri niskim intenzitetima svjetlosti tijekom nekoliko tjedana. Kako bih utvrdila kako se rosike prilagođavaju na različite svjetlosne uvjete mjerila sam fotosintetsku učinkovitost, određivala udio fotosintetskih pigmenata u tkivu (sadržaj klorofila *a*, sadržaj klorofila *b* i sadržaj ukupnih karotenoida). Također sam određivala udio ukupnih fenola, flavonoida i antocijana, te antioksidacijski kapacitet DPPH metodom. Također zanimalo me postoji li razlika između ove tri vrste rosika pa sam na kraju dobivene rezultate za sve tri vrste usporedila.

Isto tako željela sam utvrditi razlikuje li se peteljka koja je zelena i nema tentakula od plojke na kojoj su prisutni tentakuli i koja sudjeluje u lovljenju i probavljanju kukaca pa sam u istraživanju iste pokazatelje određivala u peteljkama, odnosno plojkama listova i dobivene rezultate usporedila.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. BILJNI MATERIJAL

U ovom istraživanju koristila sam tri vrste rosika *Drosera capensis* (južnoafrička rosika), *Drosera aliciae* (širokolisna rosika) i *Drosera spatulata* (žličasta rosika). Korištene biljke su bile stare između 2-3 godine, a dobivene su iz sjemena.

Dio biljaka istraživanih vrsta (*D. capensis*, *D. spatulata* i *D. aliciae*) uzgajan je u sobnim uvjetima pri osvjetljenju od 60-120 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i temperaturi $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, dok je drugi dio biljaka bio uzgajan na otvorenom prostoru pri osvjetljenju od prosječno 2500 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i temperaturi $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom nekoliko tjedana. Biljke su rasle u vlažnom tresetu te su zalijevane destiliranom vodom tako da u podlošku uvijek bude 2 cm vode.

Sa svake od istraživanih vrsta prikupila sam po 6 uzoraka plojki i 6 uzoraka peteljki. Najprije sam škarama sa svake vrste odrezala 6 cijelih listova. Odrezane listove sam prvo isprala destiliranom vodom, zatim posušila među listovima filter papira te potom škarama odrezala list na plojku i peteljku.

Za analizu sadržaja fotosintetskih pigmenata vagala sam po 20 mg tkiva, posebno peteljki odnosno plojki. Tri uzorka za analizu fotosintetskih pigmenata sam neposredno nakon uzorkovanja prvo iskoristila za mjerenje fluorescencije klorofila *a* u uvjetima *in vivo*, a potom sam sve uzorke za analizu pigmenata pohranila na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Za analizu sadržaja fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti vagala sam po 30 mg tkiva, koje sam nakon vaganja odmah pohranila na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2. MJERENJE FLUORESCENCIJE KLOROFILA U UVJETIMA *in vivo*

Fluorescenciju klorofila *a* u uvjetima *in vivo* mjerila sam pomoću Qubit sustava (Kanada) metodom koju su opisali Lichtenthaler i Babani (2004) te Lichtenthaler i sur. (2005). Neposredno prije mjerenja listove sam stavila u malo destilirane vode kako se ne bi osušili. Listove sam držala u tami 20 min kako bi se primarni akceptori elektrona u potpunosti oksidirali. Zatim sam uzorak stavila na stalak fluorimetra. Kako se list ne bi osušio tijekom mjerenja i da što bolje prianja uz podlogu, na stalak fluorimetra stavila sam i destiliranom vodom navlaženi filtar papir.

List se najprije obasjava crvenom svjetlošću niskog intenziteta ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) koju proizvodi izvor svjetlosti LED, a bilježi se detektorom fluorescencije spojenim na fluorimetar. Prvo se zabilježi minimalna vrijednost fluorescencije u listu (F_0), zatim se upali aktinično svjetlo (bijela svjetlost; $1500 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Dolazi do kratkotrajnog porasta signala fluorescencije iz kojeg se iščitava signal maksimalne fluorescencije (F_m). Nakon kratkotrajnog porasta, signal fluorescencije se smanjuje sve dok se ne stabilizira, i tada se očita vrijednost fluorescencija ravnotežnog stanja (F_s).

Fluorimetar je spojen na računalo, te se mjerenje izvodi pomoću programa Logger Pro 3.2. Signal iz fluorimetra se bilježi u obliku pikova u koordinativnom sustavu. Iz očitanih vrijednosti F_0 , F_m i F_s moguće je prema formulama (Lichtenthaler i sur., 2005) izračunati učinkovitost fotosustava II koristeći sljedeća tri parametra:

Optimalni prinos PSII - omjer varijabilne fluorescencije i maksimalnog signala fluorescencije

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

Omjer varijabilne fluorescencije i minimalnog signala fluorescencije

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

Stopa pada fluorescencije klorofila

$$R_{Fd} = (F_m - F_s) / F_s$$

3.3. ODREĐIVANJE UDJELA FOTOSINTETSKIH PIGMENATA U TKIVU

U hladan porculanski tarionik stavila sam 20 mg bilnog tkiva i homogenirala u 750 μL hladnog 80%-tnog acetona. Homogenat sam ulila u tamne epruvete za centrifugiranje. Kako bih isprala ostatke homogenata s tarionika i tučka, u tarionik sam ponovno dodala 750 μL hladnog 80%-tnog acetona. Ostatak homogenata nadolila sam u istu epruvetu. Ovako dobiveni homogenat centrifugirala sam 10 min na 5000 g pri 4 °C. Nakon centrifugiranja sam supernatante prelila u nove tamne epruvete, te sve uzorke nadopunila hladnim 80%-tnim acetonom do 1 mL. Slijedilo je mjerenje apsorbancije UV/VIS spektrofotometrom Specord (Analytik Jena) pri tri valne duljine: 470 nm, 646 nm i 663 nm.

Sadržaj fotosintetskih pigmenata odredila sam prema sljedećim formulama (Lichenthaler, 1987, Wellburn, 1994):

$$\text{sadržaj klorofila } a = c_a = \frac{12,21 \cdot A_{663} - 2,81 \cdot A_{646}}{l \cdot 1000 \cdot m} \cdot V$$

$$\text{sadržaj klorofila } b = c_b = \frac{20,13 \cdot A_{646} - 5,03 \cdot A_{663}}{l \cdot 1000 \cdot m} \cdot V$$

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

A_x = apsorbancija uzoraka pri određenim valnim duljinama

V = volumen uzorka (mL)

l = dužina optičkog puta = 1 cm

m = masa uzorka

3.4. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA, FLAVONOIDA I ANTOCIJANA U TKIVU

3.4.1. EKSTRAKCIJA

U porculanski tarionik stavila sam 30 mg uzorka i homogenirala u 750 μL 50%-tnog etanola. Homogenat sam ulila u obične epruvete za centrifugiranje od 1,5 mL. Kako bi se isprali ostaci homogenata s tarionika i tučka u tarionik sam ponovno dodala 750 μL 50%-tnog etanola, te sam ostatak nadolila u istu epruvetu. Uslijedila je inkubacija uzoraka 30 minuta na 60 °C u termobloku. Nakon hlađenja uzorke sam stavila na centrifugiranje 10 min na 12000 g pri 4 °C. Dobivene supernatante sam prelila u graduirane epruvete od 1,5 mL, te sam volumen nadopunila 50%-tnim etanolom do 1,5 mL. Dobivene ekstrakte koristila sam za određivanje udjela ukupnih fenola, flavonoida i antocijana, kao i za mjerenje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata.

3.4.2. ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNIH FENOLA

Sadržaj ukupnih fenola odredila sam spektrofotometrijski metodom prema Singleton-u i sur. (1999). U plastičnu epruvetu od 2 mL dodala sam 20 μL ekstrakta, 1580 μL dH_2O i 100 μL Folin Ciocalteu (FC) reagensa. Slijepu probu priredila sam tako da sam u epruvetu ulila 1580 μL dH_2O , 100 μL FC reagensa, te dodala i 20 μL 50 %-tnog etanola (umjesto uzorka). Nakon kratkog miješanja na mućkalici, u slijepu probu i uzorke dodala sam po 300 μL Na_2CO_3 , te ponovno promiješala na mućkalici. Uslijedila je inkubacija 60 min na 45 °C u termobloku, pri čemu su uzorci poprimili plavkastu boju. Apsorbanciju sam mjerila na 765 nm. Koncentraciju ukupnih fenola odredila sam korištenjem baždarne krivulje koju sam napravila s poznatim koncentracijama galne kiseline. Maseni udio ukupnih fenola izrazila sam kao mg ekvivalenata galne kiseline po g svježih tkiva ($\text{mg E-GA g}^{-1}_{\text{sv.t.}}$).

3.4.3. ODREĐIVANJE UDJELA FLAVONOIDA

Sadržaj flavonoida odredila sam metodom po Pourmoradu i sur. (2006). U plastičnu epruvetu od 1,5 mL dodala sam 100 μL ekstrakta, 20 μL 10% (w/v) AlCl_3 , 500 μL 1 M kalijevog acetata, i 380 μL vode. Slijepu probu pripremila sam tako da sam u epruvetu dodala 20 μL 10% AlCl_3 , 500 μL 1 M kalijevog acetata, i 380 μL vode te 100 μL 50 % etanola. Svaki uzorak sam kratko pomiješala na mućkalici, te je uslijedila inkubacija uzoraka 30 min na sobnoj temperaturi. Uzorke sam prelila u kivete i mjerila apsorbanciju na 420 nm. Koncentraciju flavonoida odredila sam korištenjem baždarne krivulje s poznatim koncentracijama kvercetina. Rezultate sam izrazila kao mg ekvivalenata kvercetina po g svježe tvari tkiva ($\text{mg E-Kg}^{-1}_{\text{sv.t.}}$).

3.4.4. ODREĐIVANJE UDJELA ANTOCIJANA

Udio antocijana odredila sam prilagođenom metodom prema Paiva i sur. (2003). U epruvetu od 1,5 mL dodala sam 500 μL ekstrakta, zatim 500 μL 50 % etanola te 84 μL 37% -tne HCl. Kako bih pripremila slijepu probu koja je potrebna kod mjerenja, u epruvetu od 1,5 mL dodala sam 1000 μL 50 %-tnog etanola i 84 μL 37%-tne HCl. Uzorke sam stavila na inkubiranje 30 min na 60 °C u termoblok. Uzorke sam zatim prelila u kivete i mjerila apsorbanciju na 537 nm. Za određivanje koncentracije antocijana koristila sam ekstinkcijski koeficijent cijanidin-3-glukozida ($\epsilon = 26900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) i molekularnu masu od 484,8 g mol^{-1} , a dobivene rezultate izrazila sam u miligramima ekvivalenata cijanidin-3-glukozida po gramu svježe mase tkiva ($\text{mg E-C3G g}^{-1}_{\text{sv.t.}}$).

3.5. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA DPPH METODOM

Antioksidacijski kapacitet odredila sam DPPH (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil) metodom (Awah i sur., 2012). U epruvete sam otpipetirala 950 μL 0,1 mM otopine DPPH u etanolu i 50 μL ekstrakta svježeg biljnog tkiva. Za kontrolni uzorak (A_0) u epruvetu sam stavila 950 μL 0,1 mM otopine DPPH u etanolu i 50 μL 50 %-etanola. Za slijepu probu sam koristila 950 μL 96%-tnog etanola i 50 μL 50%-tnog etanola. Smjesa se zatim miješa na mućkalici i ostavi stajati 30 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbanciju sam izmjerila na spektrofotometru na 517 nm. Postotak inhibicije DPPH radikala izračunala sam prema formuli:

$$\% \text{ inhibicij} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100$$

A_0 - apsorbancija kontrole (bez ekstrakta)

A_t - apsorbancija uzorka (s ekstraktom)

3.6. STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA

Rezultate sam prikazala kao srednje vrijednosti od 3 replike \pm standardna pogreška za određivanje fotosintetske učinkovitosti. Za određivanje ukupnih fenola, fotosintetskih pigmenta kao i antioksidacijske aktivnosti rezultate sam prikazala kao srednje vrijednosti od 6 replika \pm standardna pogreška. Kako bih obradila dobivene podatke koristila sam Excel 2007, te računalni program Statistica 7.1 (StatSoft Inc., SAD). Statistički značajnim podacima smatrala sam one rezultate koji se razlikuju na razini $p \leq 0,5$.

4. REZULTATI

Istraživanje sam provodila na plojkama i peteljkama listova triju najčešće uzgajanih vrsta rosika, *Drosera aliciae* (širokolisna rosika), *D. capensis* (južnoafrička rosika) i *D. spatulata* (žličasta rosika). Dio proučavanih biljaka nalazio se u sobnim uvjetima pri osvjetljenju od $60 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a dio biljaka u vanjskim uvjetima pri osvjetljenju od prosječno $2500 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kroz nekoliko tjedana. Kako bih utvrdila na koji su se način mesojedne biljke prilagodile različitim uvjetima rasta određivala sam fotosintetsku učinkovitost, udio fotosintetskih pigmenata i fenolnih spojeva te antioksidacijski kapacitet i to odvojeno u peteljkama odnosno plojkama listova triju istraživanih vrsta.

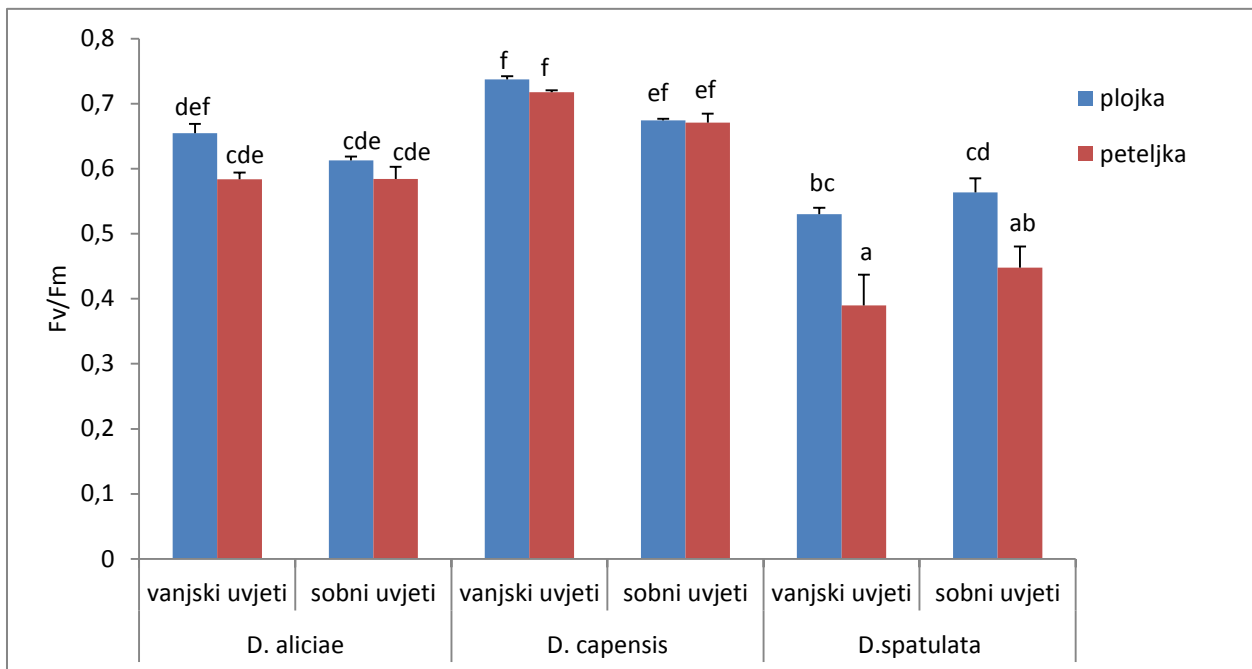
4.1. FLUORESCENCIJA KLOOROFILA U UVJETIMA *in vivo*

Kako bih utvrdila fotosintetsku učinkovitost u tri vrste rosika uzgajanih u različitim uvjetima mjerila sam optimalni prinos fotosustava II, omjer varijabilne i minimalne fluorescencije, te udio pada fluorescencije klorofila. Posebno sam određivala navedene pokazatelje u plojci i peteljci lista.

4.1.1. OPTIMALNI PRINOS FOTOSUSTAVA II

Optimalni prinos PSII (F_v/F_m) bio je općenito najveći u biljaka vrste *D. capensis* koje su rasle u vanjskim uvjetima dok su biljke vrste *D. spatulata* imale najniže vrijednosti. Općenito je niža vrijednost optimalnog prinosa izmjerena u peteljkama u odnosu na plojke listova.

U biljaka vrste *D. capensis* koje su rasle u sobnim uvjetima F_v/F_m je bio nešto manji u odnosu na biljke u vanjskim uvjetima. Plojke i peteljke listova ove vrste rosika imale su vrlo slične vrijednosti parametra F_v/F_m . Kod vrste *D. spatulata* vrijednost F_v/F_m je bila nešto malo veća kod biljaka koje su rasle u sobnim uvjetima u odnosu na biljke koje su rasle u vanjskim uvjetima. Značajno veću vrijednost F_v/F_m izmjerila sam kod plojke nego peteljki listova i kod biljaka u vanjskim i kod biljaka u sobnim uvjetima. Nešto veći optimalni prinos PSII kod vrste *D. aliciae* imaju biljke uzgajane u vanjskim uvjetima, i to plojke listova. Kod biljaka koje su uzgajane u sobnim uvjetima optimalni prinos PSII je sličan kod plojke i peteljke listova (Slika 9).

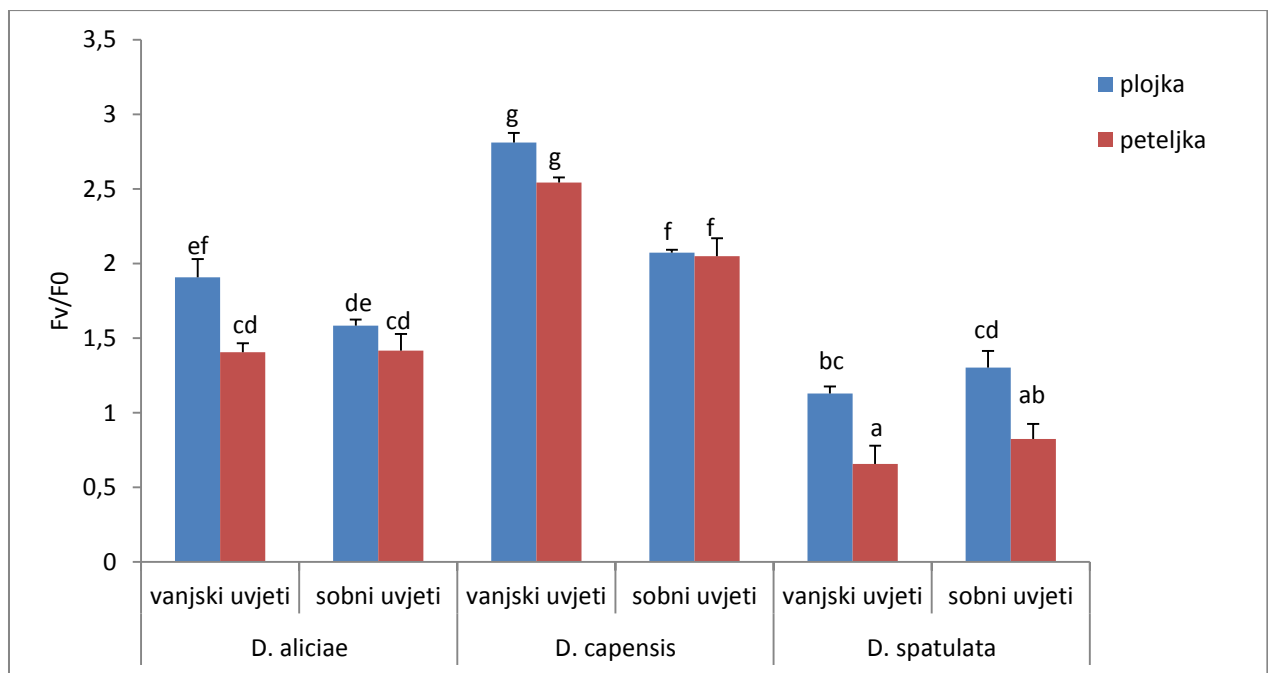


Slika 9. Optimalni prinos PSII (F_v/F_m) u plojkama i peteljkama listova triju vrsta rosika *Drosera aliciae*, *D. capensis* i *D. spatulata*. Dio biljaka bio je uzgajan u sobnim uvjetima pri osvjetljenju od $60 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$, dok je drugi dio biljaka bio uzgajan na otvorenom prostoru pri osvjetljenju od prosječno $2500 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tijekom nekoliko tjedana. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti od 3 replike \pm standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p < 0,05$).

4.1.2. OMJER VARIJABILNE I MINIMALNE FLUORESCENCIJE

Omjer varijabilnog i minimalnog signala fluorescencije (F_v/F_0) bio je općenito najveći u vrste *D. capensis* i to kod biljaka koje su uzgajane u vanjskim uvjetima dok je najniži bio kod vrste *D. spatulata*. Peteljke su uglavnom imale niže vrijednosti od plojki listova.

Biljke vrste *D. capensis* koje su uzgajane u sobnim uvjetima pokazuju značajno nižu vrijednost parametra F_v/F_0 od biljaka koje su rasle u vanjskim uvjetima. Niti kod jednih niti kod drugih biljaka nisam utvrdila razliku između plojki i peteljki listova. U vrste *D. spatulata* nešto veću vrijednost F_v/F_0 izmjerila sam kod biljaka koje su rasle u sobnim uvjetima, osobito u plojkama listova. Značajno veće vrijednosti parametra F_v/F_0 utvrdila sam kod plojki listova bez obzira jesu li biljke rasle vani ili u sobnim uvjetima. Kod vrste *D. aliciae* isto kao i kod vrste *D. capensis* vrijednost F_v/F_0 veća je kod biljaka koje su rasle u vanjskim uvjetima u odnosu na biljke sobnih uvjeta, ali samo kod plojki listova. Dakle kod biljaka u vanjskim uvjetima vrijednost F_v/F_0 je značajno veća kod plojki u odnosu na peteljke listova dok kod biljaka u sobnim uvjetima nema razlike između plojki i peteljki (Slika 10).

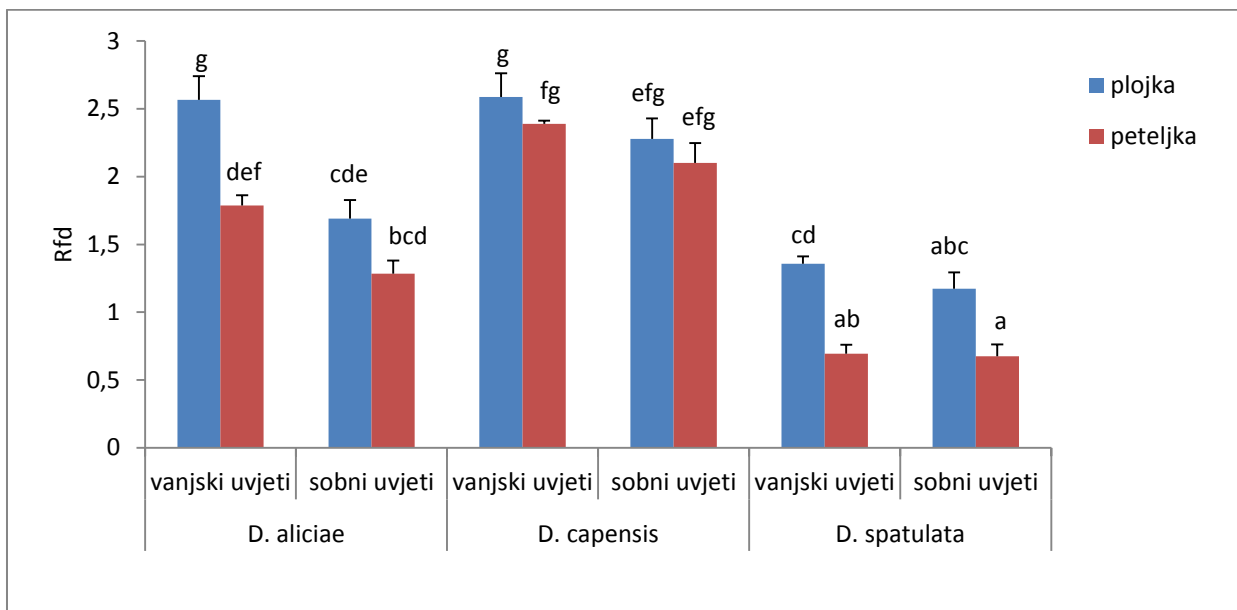


Slika 10. Omjer varijabilne i minimalne fluorescencije (F_v/F_0) u plojkama i peteljkama listova triju vrsta rosika *Drosera aliciae*, *D. capensis* i *D. spatulata*. Dio biljaka bio je uzgajan u sobnim uvjetima pri osvjetljenju od $60 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$, dok je drugi dio biljaka bio uzgajan na otvorenom prostoru pri osvjetljenju od prosječno $2500 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tijekom nekoliko tjedana. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti od 3 replike \pm standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p < 0,05$).

4.1.3. STOPA PADA FLUORESCENCIJE KLOROFILA

Stopa pada fluorescencije klorofila (R_{Fd}) bila je najveća u plojkama listova *D. capensis* i *D. aliciae* koje su rasle u vanjskim uvjetima dok sam najnižu vrijednost izmjerila u vrste *D. spatulata*. Kao i kod ostalih pokazatelja fluorescencije plojke su imale veće vrijednosti od peteljki listova.

Rosike *D. capensis* koje su rasle u sobnim uvjetima imaju nešto nižu vrijednost R_{Fd} u odnosu na one u vanjskim uvjetima, a niti kod jednih nisam utvrdila značajnu razliku između plojki i peteljki listova, iako su vrijednosti nešto niže u peteljkama. Kod vrste *D. aliciae* utvrdila sam da biljke uzgajane na sobnim uvjetima imaju nižu vrijednost parametra R_{Fd} u odnosu na biljke u vanjskim uvjetima, te je veća vrijednost izmjerena kod plojki listova u odnosu na peteljke listova. Vrsta *D. spatulata* pokazuje najmanji R_{Fd} u usporedbi s ostale dvije vrste. Kod nje je nešto veći udio R_{Fd} kod biljaka koje su rasle u vanjskim uvjetima i to značajno viši u plojkama nego peteljkama listova (Slika 11).



Slika 11. Stopa pada fluorescencije klorofila (R_{Fd}) u plojkama i peteljkama listova triju vrsta rosika *Drosera aliciae*, *D. capensis* i *D. spatulata*. Dio biljaka bio je uzgajan u sobnim uvjetima pri osvjetljenju od $60 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$, dok je drugi dio biljaka bio uzgajan na otvorenom prostoru pri osvjetljenju od prosječno $2500 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tijekom nekoliko tjedana. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti od 6 replika \pm standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p < 0,05$).

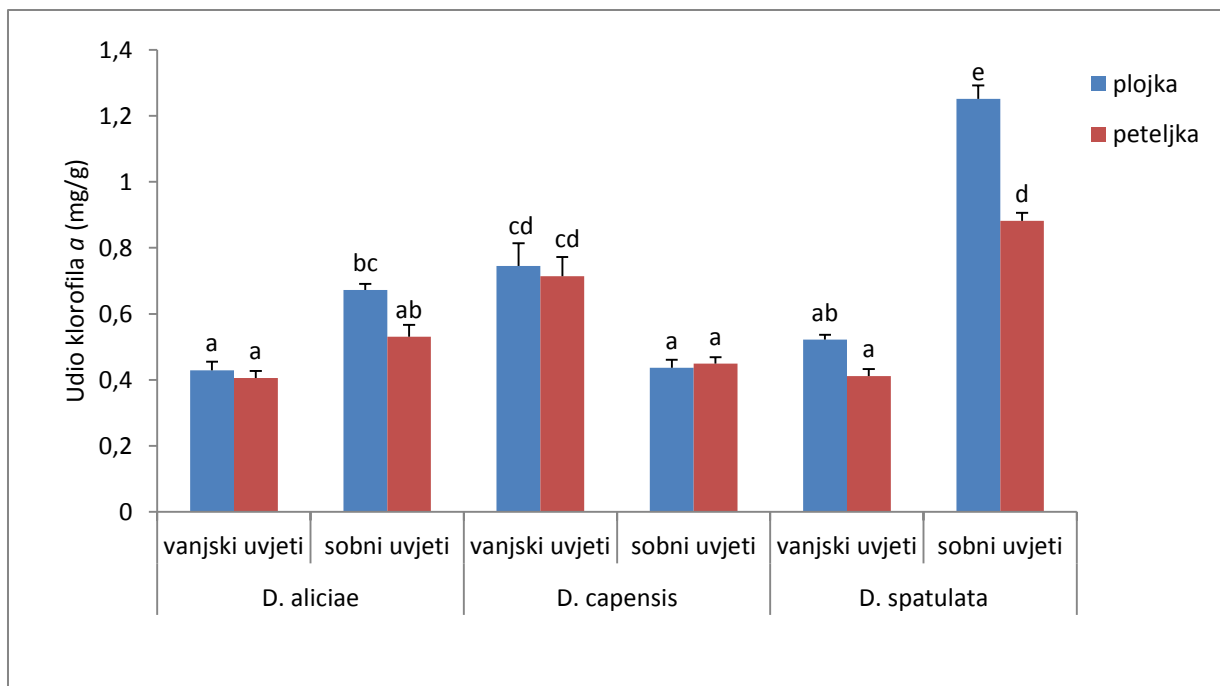
4.2. UDIO FOTOSINTETSKI PIGMENATA U TKIVU

Kod istraživanih vrsta rosika mjerila sam udio fotosintetskih pigmenata i to udio klorofila *a*, zatim udio klorofila *b*, te udio ukupnih karotenoida. Posebno sam određivala udio navedenih komponenata u plojci i peteljci lista.

4.2.1. UDIO KLOROFILA *a*

Udio klorofila *a* najviši je kod plojki vrste *D. spatulata* kod biljaka uzgajanih u sobnim uvjetima. Općenito plojke imaju više klorofila *a*, a peteljke listova manje. Ističe se vrsta *D. aliciae* uzgajana u vanjskim uvjetima gdje je podjednak udio klorofila *a* kod plojki i peteljki listova kao i kod *D. capensis* uzgajane u sobnim uvjetima.

Istraživanjem sam dokazala da se najveći udio klorofila *a* nalazi u plojkama listova vrste *D. spatulata* koje su rasle u sobnim uvjetima u odnosu na ostale dvije vrste *D. aliciae* i *D. capensis*. Kod vrste *D. spatulata* dosta nizak udio klorofila *a* izmjereno je u biljkama u vanjskim uvjetima, s time da je kao i kod biljaka u sobnim uvjetima niži bio u peteljkama. Kod vrste *D. aliciae* utvrdila sam sličan odnos kao i kod vrste *D. spatulata* iako je udio klorofila bio dosta niži. Veći udio klorofila *a* izmjerila sam u plojci kod biljaka u sobnim uvjetima, dok kod biljaka u vanjskim uvjetima nema razlike između plojki i peteljki. Za razliku od vrsta *D. aliciae* i *D. spatulata*, rosika *D. capensis* pokazuje veći udio klorofila *a* kod biljaka koje su rasle u vanjskim uvjetima. Podjednak udio klorofila *a* je prisutan kod plojke i peteljke listova i kod biljaka u sobnim i vanjskim uvjetima (Slika 12).



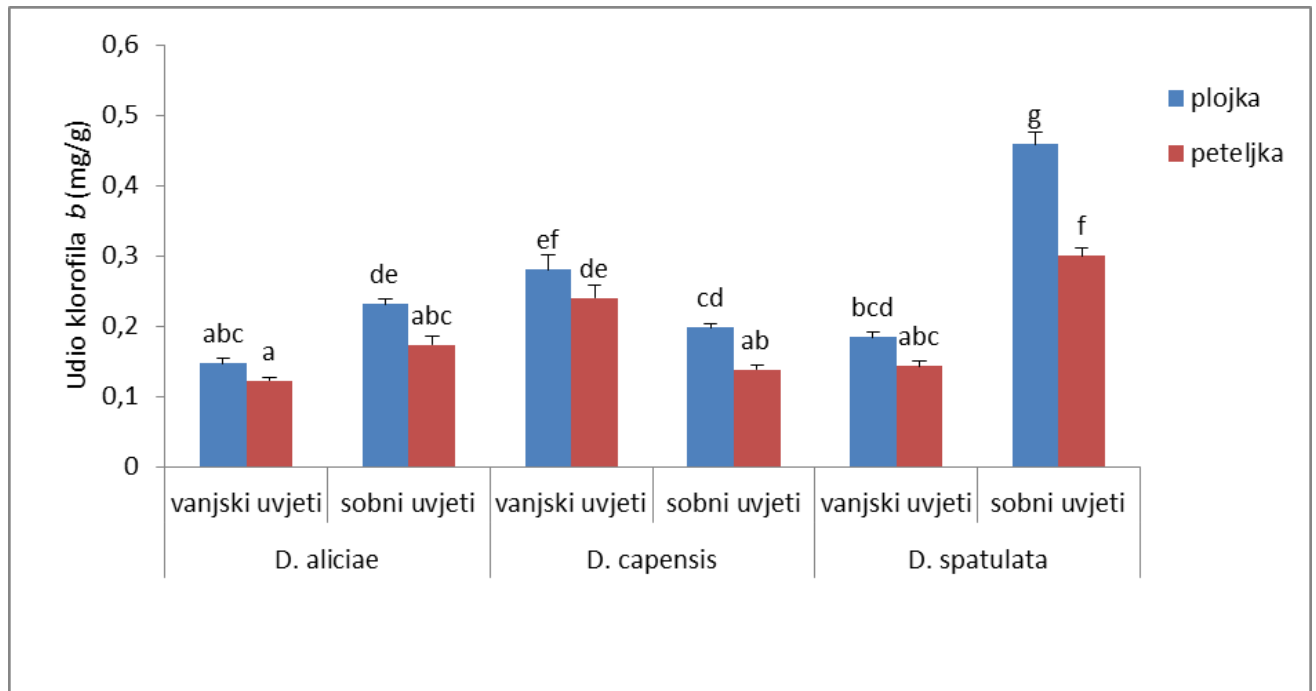
Slika 12. Udio klorofila *a* u plojkama i peteljka listova triju vrsta rosika *Drosera aliciae*, *D. capensis* i *D. spatulata*. Dio biljaka bio je uzgajan u sobnim uvjetima pri osvjetljenju od 60 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$, dok je drugi dio biljaka bio uzgajan na otvorenom prostoru pri osvjetljenju od prosječno 2500 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tijekom nekoliko tjedana. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti od 6 replika \pm standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p < 0,05$).

4.2.2. UDIO KLOOROFILA *b*

Rosika *D. spatulata* ističe se od ostalih vrsta s najvećim udjelom klorofila *b* u plojkama kod biljaka koje su rasle u sobnim uvjetima. Veći udio klorofila *b* izmjeren je kod plojki u odnosu na peteljke listova kod svih vrsta rosika.

Utvdila sam da najveći udio klorofila *b* kod vrste *D. spatulata* u plojkama listova i to kod biljaka uzgajanih u sobnim uvjetima. Biljke ove vrste u vanjskim uvjetima imaju dosta niži udio klorofila *b* i malo veći udio klorofila *b* izmjeren je u plojkama u odnosu na peteljke listova. Kod vrste *D. aliciae* udio klorofila *b*, iako niži u odnosu na vrstu *D. spatulata*, također je veći kod biljaka uzgajanih u sobnim uvjetima u odnosu na biljke koje su rasle u vanjskim uvjetima. Plojke listova sadrže veći udio klorofila *b* u odnosu na peteljke, osobito kod biljaka u sobnim uvjetima. Vrsta *D. capensis* razlikuje se svojim rezultatima od vrsta *D. aliciae* i *D. spatulata*. Kod nje je veći udio klorofila *b* prisutan kod biljaka u vanjskim uvjetima. Utvdila

sam veći udio klorofila *b* u plojkama listova u odnosu na peteljke kod biljaka u vanjskim i sobnim uvjetima (Slika 13).



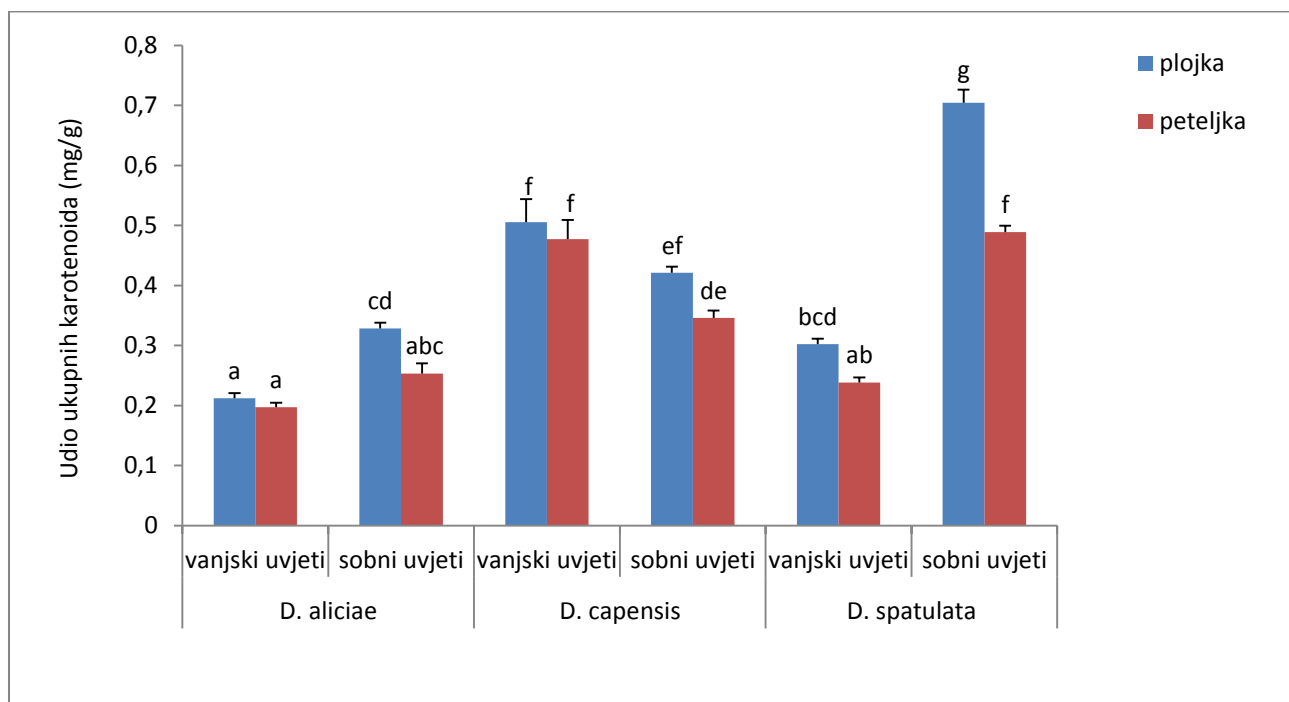
Slika 13. Udio klorofila *b* u plojkama i peteljkama listova triju vrsta rosika *Drosera aliciae*, *D. capensis* i *D. spatulata*. Dio biljaka bio je uzgajan u sobnim uvjetima pri osvjetljenju od 60 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$, dok je drugi dio biljaka bio uzgajan na otvorenom prostoru pri osvjetljenju od prosječno 2500 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tijekom nekoliko tjedana. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti od 6 replika \pm standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajne rezultate ($p < 0,05$).

4.2.3. UDIO UKUPNIH KAROTENOIDA

Udio ukupnih karotenoida najvećim udjelom ističe se kod plojki vrste *D. spatulata* uzgajanih u sobnim uvjetima. Dok je najmanji udio karotenoida izmjereno kod *D. aliciae* i to podjednako u plojkama i peteljkama listova kod biljaka uzgajanih u vanjskim uvjetima. Općenito je veći udio karotenoida kod plojki u odnosu na peteljke kod svih vrsta, jedino se razlikuje *D. aliciae* uzgajana u vanjskim uvjetima.

Plojke listova vrste *D. spatulata* uzgajanih u sobnim uvjetima pokazuju najveći udio ukupnih karotenoida u odnosu na ostale vrste. Kod ove vrste utvrdila sam manji udio

karotenoida kod biljaka u vanjskim uvjetima u odnosu na biljke u sobnim uvjetima. Veći udio karotenoida izmjerila sam u plojkama nego peteljka listova. Kod vrste *D. aliciae* veći udio karotenoida nalazi se u plojkama listova, dok je manji u peteljka kod biljaka uzgajanih u sobnim uvjetima. Biljke u vanjskim uvjetima imaju podjednak odnos karotenoida u plojkama i peteljka listova. Za razliku od prethodne dvije vrste kod vrste *D. capensis* veći udio karotenoida prisutan je kod biljaka u vanjskim uvjetima, gdje je podjednak odnos izmjeren u plojkama i peteljka listova. Kod biljaka u sobnim uvjetima utvrdila sam nešto veći udio karotenoida u plojkama listova (Slika 14).



Slika 14. Udio ukupnih karotenoida u plojkama i peteljka listova triju vrsta rosika *Drosera aliciae*, *D. capensis* i *D. spatulata*. Dio biljaka bio je uzgajan u sobnim uvjetima pri osvjetljenju od $60 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$, dok je drugi dio biljaka bio uzgajan na otvorenom prostoru pri osvjetljenju od prosječno $2500 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tijekom nekoliko tjedana. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti od 6 replika \pm standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p < 0,05$).

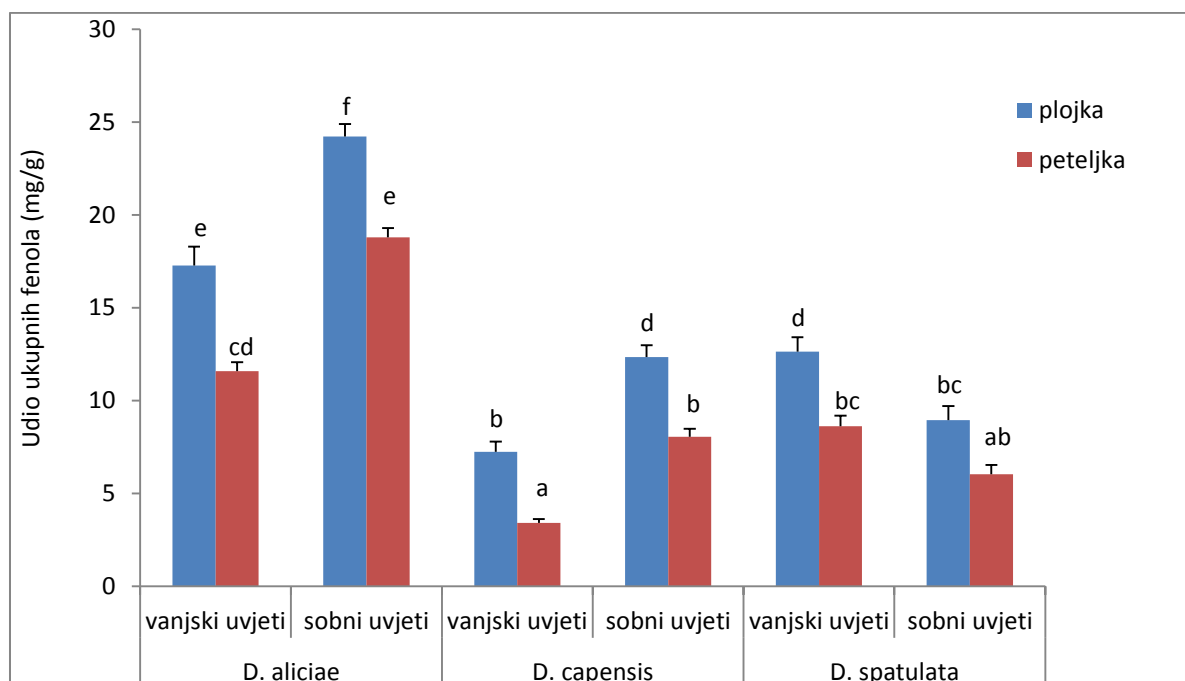
4.3. UDIO FENOLNIH SPOJEVA U TKIVU

Kod istraživanih vrsta rosika određivala sam udio ukupnih fenola, udio flavonoida, te udio antocijana u tkivu plojke odnosno peteljke lista.

4.3.1. UDIO UKUPNIH FENOLA

Utvdila sam da u odnosu na sve tri vrste vrsta *D. aliciae* pokazuje najveći udio ukupnih fenola i to u plojci listova kod biljaka u sobnim uvjetima dok je najniži u peteljci vrste *D. capensis*. Općenito, peteljke svih vrsta imaju niže vrijednosti ukupnih fenola od plojki.

Kod vrste *D. aliciae* nižu vrijednost imaju biljke u vanjskim uvjetima u odnosu na one u sobnim uvjetima. U oba slučaja biljke imaju više ukupnih fenola u plojci listova. Vrsta *D. capensis* kao i *D. aliciae* ima veći udio fenola kod biljaka u sobnim uvjetima. Veći udio izmjerila sam u plojkama nego peteljkama listova i kod biljaka u sobnim uvjetima i kod biljaka u vanjskim uvjetima. Vrsta *D. spatulata* se razlikuje od ostalih vrsta svojim udjelom ukupnih fenola kojih ima više kod biljaka u vanjskim uvjetima u odnosu na biljke u sobnim uvjetima. Izmjerila sam da je i kod jednih i kod drugih veći udio fenola prisutan u plojci u odnosu na peteljku lista (Slika 15).

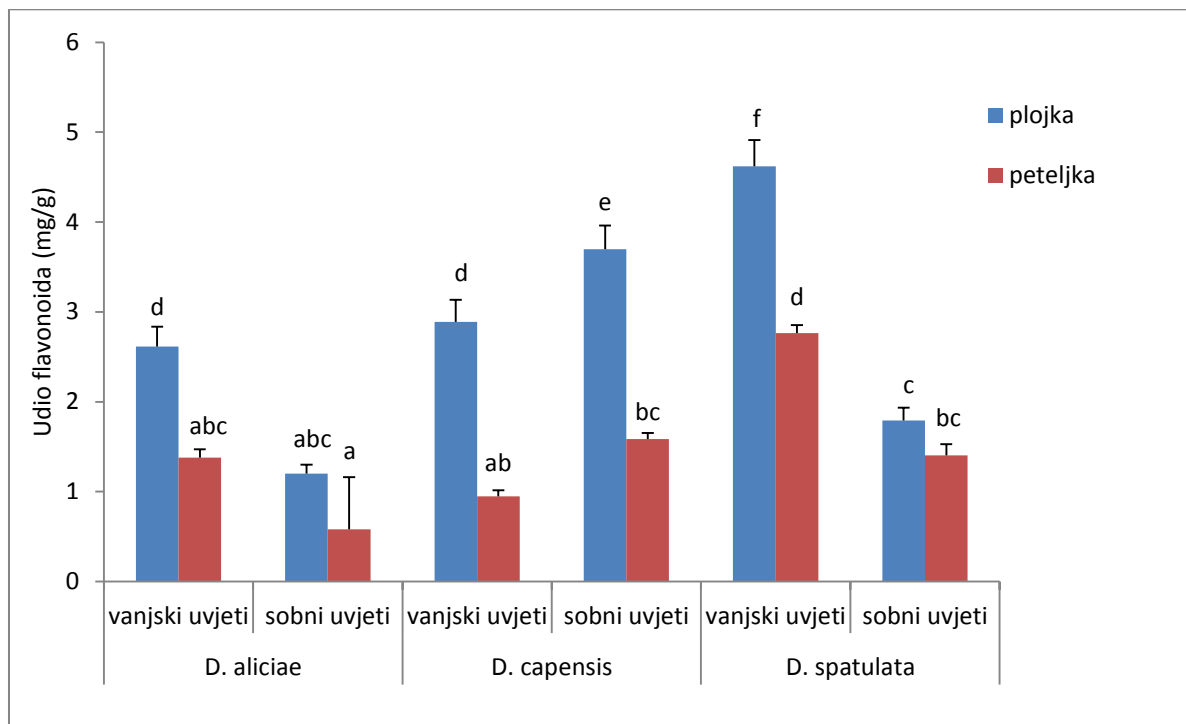


Slika 15. Udio ukupnih fenola u plojkama i peteljkama listova triju vrsta rosika *Drosera aliciae*, *D. capensis* i *D. spatulata*. Dio biljaka bio je uzgajan u sobnim uvjetima pri osvjetljenju od $60 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$, dok je drugi dio biljaka bio uzgajan na otvorenom prostoru pri osvjetljenju od prosječno $2500 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tijekom nekoliko tjedana. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti od 6 replika \pm standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p < 0,05$).

4.3.2. UDIO FLAVONOIDA

Najveći udio flavonoida izmjerila sam u plojci vrste *D. spatulata* kod biljaka u vanjskim uvjetima, a najniži kod vrste *D. aliciae* u sobnim uvjetima. Kod sve tri vrste više flavonoida uglavnom imaju plojke u odnosu na peteljke listova.

U vrste *D. spatulata* i peteljke biljaka u vanjskim uvjetima imaju više flavonoida u odnosu na druge dvije vrste, dok su u sobnim uvjetima vrijednosti slične. Vrsta *D. capensis* sadrži više flavonoida u plojkama nego u peteljka listova i u sobnim i u vanjskim uvjetima. Za razliku od druge dvije vrste kod vrste *D. capensis* sam izmjerila veći udio flavonoida kod biljaka u sobnim uvjetima u odnosu na biljke u vanjskim uvjetima. *D. aliciae* ima veći udio flavonoida kod biljaka u vanjskim nego u sobnim uvjetima. Isto tako veći udio prisutan je u plojkama u odnosu na peteljke i u jednim i u drugim uvjetima (Slika 16).

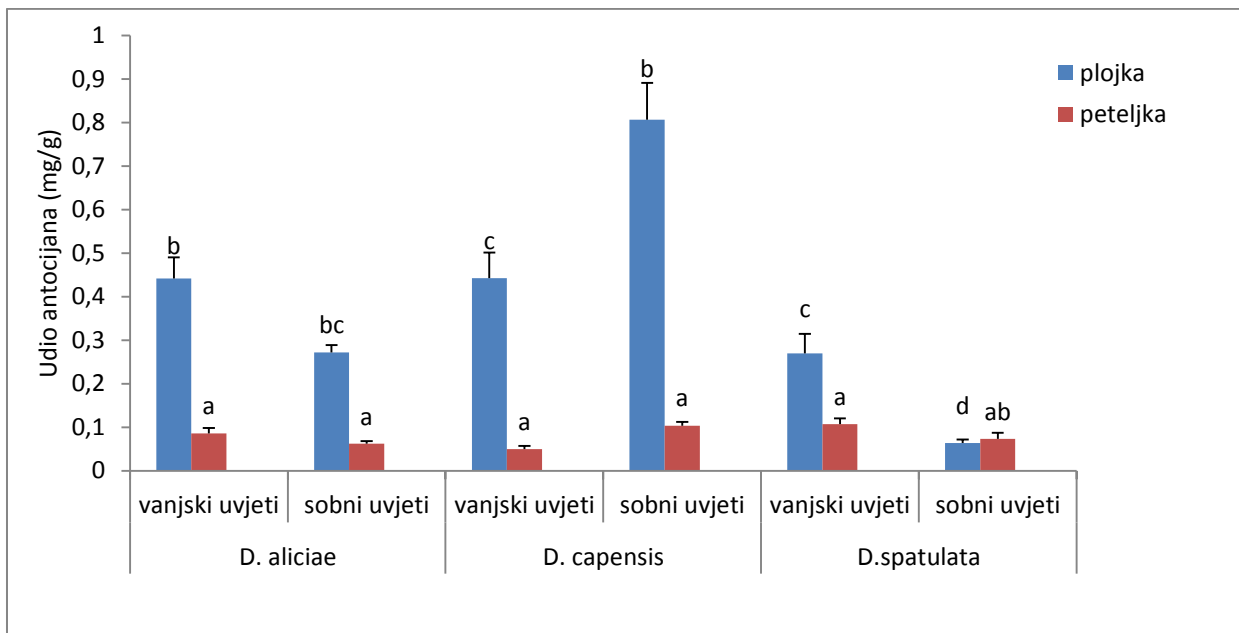


Slika 16. Udio flavonoida u plojkama i peteljka listova triju vrsta rosika *Drosera aliciae*, *D. capensis* i *D. spatulata*. Dio biljaka bio je uzgajan u sobnim uvjetima pri osvjetljenju od 60 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$, dok je drugi dio biljaka bio uzgajan na otvorenom prostoru pri osvjetljenju od prosječno 2500 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tijekom nekoliko tjedana. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti od 6 replika \pm standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p < 0,05$).

4.3.3. UDIO ANTOCIJANA

Kod proučavanih rosika *D. capensis*, *D. spatulata* i *D. aliciae* najveći udio antocijana odredila sam kod vrste *D. capensis* kod biljaka u sobnim uvjetima, i to u plojkama listova. Vrlo niske vrijednosti izmjerila sam u peteljka listova svih istraživanih vrsta.

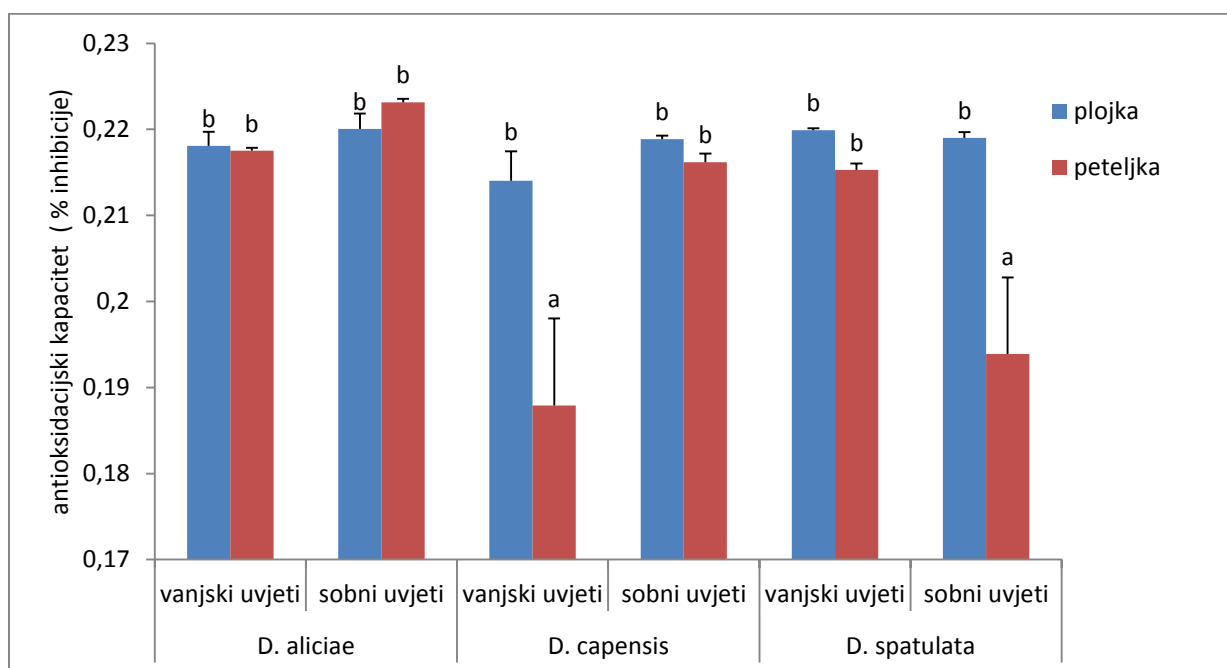
Kod vrste *D. capensis* biljke u vanjskim uvjetima imale su niže vrijednosti antocijana u odnosu na biljke u sobnim uvjetima. Za razliku od prethodne vrste, u vrste *D. spatulata* veći udio antocijana izmjerila sam kod biljaka u vanjskim uvjetima, nego u biljkama u sobnim uvjetima. Plojke listova biljaka u vanjskim uvjetima imaju veći udio antocijana dok kod antocijana kod biljaka uzgajanih u sobnim uvjetima nisam našla razlike između plojki i peteljki listova. Kod vrste *D. aliciae* kao i kod *D. spatulata* utvrdila sam veći udio antocijana kod biljaka u vanjskim uvjetima, i to više u plojkama nego peteljka listova. Rosike vrste *D. aliciae* koje su se nalazile u sobnim uvjetima također pokazuju veći udio antocijana kod plojki u odnosu na peteljke listova (Slika 17).



Slika 17. Udio antocijana u plojkama i peteljka listova triju vrsta rosika *Drosera aliciae*, *D. capensis* i *D. spatulata*. Dio biljaka bio je uzgajan u sobnim uvjetima pri osvjetljenju od $60 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$, dok je drugi dio biljaka bio uzgajan na otvorenom prostoru pri osvjetljenju od prosječno $2500 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tijekom nekoliko tjedana. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti od 6 replika \pm standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p < 0,05$).

4.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST U EKSTRAKTIMA TKIVA

Antioksidacijska aktivnost skoro kod svih vrsta rosika podjednako je visoka i kod plojki i peteljki listova. Jedino se razlikuje antioksidacijska aktivnost peteljki *D. capensis* kod biljaka koje su rasle u vanjskim uvjetima koja je značajno niža u odnosu na aktivnost kod peteljki drugih vrsta, dok peteljke iste vrste kod biljaka u sobnim uvjetima pokazuju visoku antioksidacijsku aktivnost. Niži antioksidacijski kapacitet pokazuje i vrsta *D. spatulata* u peteljkama listova ali kod biljaka koje su rasle u sobnim uvjetima (Slika 18).



Slika 18. Antioksidacijska aktivnost u plojkama i peteljkama listova triju vrsta rosika *Drosera aliciae*, *D. capensis* i *D. spatulata*. Dio biljaka bio je uzgajan u sobnim uvjetima pri osvjetljenju od $60 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$, dok je drugi dio biljaka bio uzgajan na otvorenom prostoru pri osvjetljenju od prosječno $2500 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tijekom nekoliko tjedana. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti od 6 replika \pm standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p < 0,05$).

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju proučavala sam tri vrste mesojednih biljaka iz porodice Droseraceae *D. capensis* (južnoafrička rosika), *D. spatulata* (žličasta rosika) i *D. aliciae* (širokolisna rosika). Sve mesojedne biljke su zelene i fiksiraju CO₂ kako bi mogle provoditi fotosintezu (Givnish i sur., 1984). Rosike su heliofilne biljke i prilagođene su rastu na otvorenim sunčanim staništima (Ellison i Goetelli, 2001) ali mogu rasti i u zasjenjenim uvjetima (Hajek i Adamec, 2010). Osim toga poznato je da mesojedne biljke imaju nižu stopu fotosinteze jer su prilagodile svoje listove za lovljenje i hvatanje plijena (Bruzzese i sur., 2010). Kako bih potvrdila da je i kod istraživanih vrsta rosika tome tako u istraživanju sam pomoću metode fluorescencije klorofila odredila fotosintetsku učinkovitost i stopu fotosinteze koristeći nekoliko pokazatelja (Lichtenthaler i sur., 2005). Budući da je sa stopom fotosinteze povezan i udio fotosintetskih pigmenata te da većina biljaka, pa tako i mesojedne biljke, prilagođavaju svoj fotosintetski aparat uvjetima osvjetljenja (Tkalec i sur. 2015), u svojem istraživanju sam mjerila udio klorofila *a*, klorofila *b* te karotenoida. Veća količina dostupnog svjetla samo do određene mjere povećava stopu fotosinteze pa ako je osvjetljenje prejako dolazi do oštećenja fotosintetskog aparata. Pošto je uloga fenolnih spojeva zaštita od visokog intenziteta osvjetljenja (Jaakola i sur., 2004) i UV zračenja (Waterman i sur., 1984) također sam ih mjerila u svojem istraživanju. Ubrajamo ih u antioksidanse, te imaju veliku ulogu u zaštiti biljaka od fotooštećenja (Close i McArthur, 2002). U raznim istraživanjima je dokazano kako prisutnost fenolnih spojeva znatno pridonosi antioksidacijskom potencijalu biljke (Dudonne i sur., 2009), te sam mjerila i antioksidacijsku aktivnost u ovom istraživanju.

5.1. FOTOSINTETSKA UČINKOVITOST

Fotosintetsku učinkovitost mjerila sam pomoću tri parametra. Parametar F_v/F_m govori o maksimalnoj učinkovitosti fotosistema II, dok druga dva parametra koja sam mjerila, F_v/F_0 i R_{Fd} govore i o sekundarnim reakcijama fotosinteze.

Mjerila sam optimalni prinos fotosistema II (F_v/F_m) jer taj omjer predstavlja mjeru potencijalnog maksimalnog prinosa kvanta fotosustava II. U mnogim biljnim vrstama ta optimalna vrijednost iznosi oko 0,83 (Maxwell i Jonhson, 2000). U mojem istraživanju rosika, optimalni prinos fotosistema II iznosio je između 0,4-0,75. Najmanja vrijednost izmjerena je kod vrste *D. spatulata* i iznosila je 0,4. Vrijednosti F_v/F_m niže od 0,83 pokazatelji su da je biljka bila izložena stresu, te da je došlo do fotoinhibicije (Maxwell i Johnson, 2000). Moguće je da su na optimalni prinos utjecali tentakuli na listovima koji su možda ometali samo mjerenje fluorescencije pa su vrijednosti niže od onih navedenih u literaturi. Druga mogućnost je da je optimalni prinos kod rosika niži jer s obzirom da mesojedne biljke imaju nižu stopu fotosinteze zbog toga što su svoje listove prilagodile na lov i apsorpciju hranjivih tvari iz kukaca (Bruzzese i sur., 2010). U istraživanju na rosikama vrste *D. rotundifolia* koje su proveli Tkalec i sur. (2015) također je utvrđen niži optimalni prinos u odnosu na teoretsku vrijednost. U istom istraživanju utvrđeno je i kako nema značajne razlike u optimalnom prinosu između biljaka koje su rasle u vanjskim uvjetima i biljaka koje su rasle u sobnim uvjetima. Moje istraživanje pokazalo je nešto veću vrijednost F_v/F_m kod biljaka koje su rasle u vanjskim uvjetima i to kod vrsta *D. capensis* i *D. aliciae* ali to nije bilo statistički značajno različito. Moguće objašnjenje za veći optimalni prinos je u činjenici da su rosike koje su rasle u vanjskim uvjetima gdje su imale na raspolaganju više svjetlosti potrebne za fotosintezu. Međutim, osim izloženosti višim intenzitetima svjetlosti te su biljke imale i veću dostupnost kukaca (Adamec, 1997). Pavlovič i sur. (2013) su otkrili da je F_v/F_m viši kod vrste *D. capensis* koja je bila hranjena. Veći optimalni prinos može biti i posljedica većeg udjela fotosintetskih pigmenta neophodnih za odvijanje fotosinteze. Moje istraživanje pokazalo je da vrsta *D. capensis* ima veći udio klorofila kod biljaka koje su rasle u vanjskim uvjetima koje ujedno imaju i viši F_v/F_m . Također više se fotosintetskih pigmenta nalazilo u plojkama a manje u peteljka listova svih istraživanih vrsta rosika. To vjerojatno utječe na viši F_v/F_m izmjeren kod plojki u odnosu na peteljke listova. Viši udio klorofila je nađen kod nekih vrsta rosika koje su rasle u sobnim uvjetima i nisu imale mogućnost ulova kukaca (Pavlovič i sur., 2014).

Isti takav rezultat dobila sam kod vrste *D. spatulata* koja ima veći udio klorofila kod biljaka koje su rasle u sobnim uvjetima, kao i viši F_v/F_m . Kod vrste *D. aliciae* udio klorofila je također bio viši kod biljaka koje su rasle u sobnim uvjetima, ali je optimalni prinos PSII neočekivano bio manji, dok je kod biljaka koje su uzgajane u vanjskim uvjetima bio neočekivano viši. Pretpostavljam dakle da na optimalni prinos istodobno utječe više faktora, i udio fotosintetskih pigmenata i intenzitet osvjetljenja, ali i hranjenje, te da svi ti faktori doprinose u određenom postotku.

Kako bi odredila učinkovitost fotosinteze mjerila sam i parametar F_v/F_0 koji osim o svjetlosnim reakcijama govori i o sekundarnim reakcijama fotosinteze. F_v/F_0 je osjetljiviji parametar u odnosu na F_v/F_m , pokazuje veće vrijednosti od F_v/F_m , te ima veću amplitudu u stresnim uvjetima (Lichtenthaler i sur., 2005). Optimalna vrijednost F_v/F_0 iznosi 4 (Chatzistathis i sur., 2011). Moje istraživanje pokazalo je da se vrijednost F_v/F_0 kreće između 0,54 i 2,7. Ako su vrijednosti F_v/F_0 manje od 4 znači da je biljka izložena stresnim uvjetima, te da su oštećeni kloroplasti (Chatzistathis i sur., 2011). Međutim, smatram da rosike u ovom istraživanju nisu bile izložene stresnim uvjetima nego je niska vrijednost parametra F_v/F_0 posljedica karnivorije, odnosno prilagodbi mesojednih biljaka za hvatanje i probavu plijena. Mnoge mesojedne biljke, iako se smatraju fakultativni heliofiti (Givnish i sur., 1984, Juniper i sur., 1989) imaju nisku stopu fotosinteze iako rastu na sunčanim područjima (Bruzzese i sur., 2010). Niska fotosintetska stopa posljedica je zamjene fotosintetskog tkiva žljezdanim, nižeg sadržaja dušika u tkivu, manjeg udjela palisadnog parenhima i drugih karakteristika povezanih s karnivorijom (Pavlovič i sur., 2007). Istraživanje Tkalec i sur. (2015) pokazalo je kako je F_v/F_0 udio 30 % viši kod biljaka koje su rasle vani nego kod biljaka koje su rasle u sobnim uvjetima. Moje istraživanje je pokazalo da je vrijednost F_v/F_0 također viša kod biljaka koje su rasle u vanjskim uvjetima kod dvije vrste *D. capensis* i *D. aliciae*. Vjerojatno zbog veće količine dostupnog svjetla koja kao što je poznato do određene mjere povećava stopu fotosinteze ali kao što sam već spomenula kod parametra F_v/F_m i zbog veće dostupnosti kukaca (Adamec, 1997). Međutim, kod rosike *D. spatulata* vrijednost parametra F_v/F_0 je bila veća kod biljaka koje su rasle u sobnim uvjetima naspram biljaka u vanjskim uvjetima. Kod te vrste izmjeren je i veći udio klorofila kod biljaka koje su rasle u sobnim uvjetima, pa je moja pretpostavka da kod ove vrste udio klorofila vjerojatno najviše doprinosi fotosintetskoj učinkovitost. Više fotosintetskih pigmenata se također nalazi u plojkama u odnosu na peteljke listova svih istraživanih vrsta biljaka. To vjerojatno utječe na viši F_v/F_0 kao i na viši F_v/F_m izmjeren kod plojki u odnosu na peteljke listova. Kod vrste *D. aliciae* udio klorofila je također

viši kod biljaka koje su rasle u unutarnjim uvjetima, pa bi prema tome i optimalni prinos PSII trebao biti viši, ali je utvrđeno da je nešto viši kod biljaka koje su uzgajane u vanjskim uvjetima pa je moguće da kod ove vrste rosika neki drugi faktor više doprinosi fotosintetskoj učinkovitosti.

Kao što sam već spomenula parametar R_{Fd} kao i parametar F_v/F_0 može dati neke informacije o reakcijama Calvinovog ciklusa. Vrijednosti R_{Fd} su više kod biljaka koje su izložene suncu i ta vrijednost iznosi 3-5, dok biljke u zasjenjenim uvjetima imaju niži R_{Fd} , vrijednosti 1,0-2,5 zbog različitih prilagodbi jednih odnosno drugih na različite svjetlosne uvjete (Lichtenthaler i sur., 2005). U mojem istraživanju rosike koje su rasle u vanjskim uvjetima imaju niske vrijednosti parametra R_{Fd} , između 0,7 i 2,6. Generalno plojke imaju vrijednosti ovog parametra iznad 1 kod svih istraživanih vrsta što odgovara biljkama u zasjenjenim uvjetima. Kao što je već spomenuto iako su rosike biljke koje vole sunčana područja za očekivati je da će njihova stopa fotosinteze biti manja, jer su prilagodile svoje listove za lovljenje i hvatanje plijena (Bruzzese i sur., 2010). Peteljke imaju niže R_{Fd} vrijednosti, kod *D. spatulata* i ispod 1 što govori da iako su zelene vjerojatno nemaju jednaku fotosintetsku učinkovitost kao plojke. Najveći R_{Fd} izmjeren je kod plojki vrsta *D. capensis* i *D. aliciae* što govori da je kod njih najviša stopa fotosinteze. Rosika *D. spatulata* pokazuje znatno manju stopu fotosinteze od ostale dvije rosike. Na to može utjecati veličina listova koji su kod vrste *D. spatulata* najmanji. Isto tako s obzirom da ova vrsta rosike ima najmanju rozetu skoro u razini zemlje moguće je da je bila manje osvijetljena u odnosu na druge dvije vrste pa je stopa fotosinteze dodatno niža. Kod svih istraživanih vrsta veće R_{Fd} vrijednost izmjerene su u vanjskim uvjetima što govori da vjerojatno intenzitet svjetla značajno doprinosi većoj stopi fotosinteze.

. 5.2. UDIO FOTOSINTETSKIH PIGMENATA

U ovom radu mjerila sam i udio klorofila *a*, udio klorofila *b* i udio karotenoida. Fotosintetski pigmenti, klorofili i karotenoidi odgovorni su za apsorpciju svjetla i integralni su dio tilakoidnih membrana (Lichtenthaler i sur., 2007). Klorofil *b* i karotenoide ubrajamo u pomoćne pigmente jer apsorbiraju svjetlost i prenose energiju na klorofil *a* (Pevalek-Kozlina, 2003).

Iz literature je poznato da se vrijednosti klorofila *a* u biljkama obično kreću u rasponu od 2,6-3,2 (Lichtenthaler i sur., 2007). U mojem istraživanju vrijednosti su nešto manje, udio klorofila *a* se kreće u rasponu od 0,4-1,2. Dok je udio klorofila *b* manji u odnosu na klorofil *a* i kreće se između 0,1- 0,5. Za razliku od drugih biljaka mesojedne biljke sadrže manje klorofila zbog zamjene fotosintetskih stanica sa stanicama s probavnim žlijezdama (Bruzese i sur., 2010). Pa je to vjerojatno razlog manjeg udjela klorofila u istraživanim rosikama. Odredila sam veći udio klorofila *a* i *b* kod rosika koje su rasle u sobnim uvjetima i to kod vrsta *D. aliciae* i *D. spatulata*. U istraživanju Tkalec i sur. (2015) udio klorofila *a* i *b* kod rosika u sobnim uvjetima bio je dva puta viši nego kod rosika koje su rasle u vanjskim uvjetima. Pri povećanim intenzitetima svjetlosti biljke smanjuju koncentraciju fotosintetskih pigmenata te mijenjaju njihov omjer (Walters, 2005). Zbog toga me ne iznenađuje da su moji rezultati pokazali manji udio klorofila kod biljaka koje su rasle u vanjskim uvjetima u kojima su biljke bile izložene većem intenzitetu osvjetljenja. S jedne strane fotoinhibicija može uzrokovati oštećenje fotosintetskih pigmenata (Franck i sur., 2007), pa redukcija klorofila *a* i *b* može biti posljedica prekomjernog osvjetljenja (Franck i sur., 2007). Što znači da niži udio klorofila pronađen kod rosika koje su rasle u vanjskim uvjetima može biti rezultat degradacije klorofila u reakcijskim centrima PSII (Barber, 1995) ili zbog utjecaja UV svjetla (Hakala-Yatkin i sur., 2010). No, s druge strane moguće je da je niži udio pigmenata u biljkama uzgajanim pri višem intenzitetu osvjetljenja u stvari prilagodba tih biljaka na te uvjete rasta (Tkalec i sur., 2015). Naime poznato je da biljke sunca u odnosu na biljke sjene imaju niži sadržaj fotosintetskih pigmenata kako bi smanjile apsorpciju svjetlosne energije i time spriječile fotoinhibiciju i oštećenja uslijed prevelike količine apsorbirane energije (Walters, 2005). Suprotno, biljke sjene koje su prilagođene na niže intenzitete osvjetljenja moraju imati više fotosintetskih pigmenata kako bi mogle iskoristiti svu raspoloživu svjetlosnu energiju. Vrsta *D. capensis* se razlikuje od ostale dvije vrste, zbog toga što pokazuje veći udio klorofila *a*, kao i klorofila *b* kod biljaka koje su rasle u vanjskim uvjetima. Moguće da je na to utjecala dostupnost i veća količina plijena jer ova vrsta rosike zbog svoje morfologije lista koji ima dulju peteljku ima uspravniju i veću rozetu za razliku od druge dvije koje imaju dosta nisku i polegnutu rozetu listova. Naime, poznato je da udio klorofila *a* i klorofila *b* raste kod hranjenih mesojednih biljaka (Pavlovič i sur., 2014). Pretpostavljam da je *D. capensis* koja je rasla u vanjskim uvjetima ulovila više plijena, te je to utjecalo na viši udio klorofila. Kod sve tri vrste rosika udio klorofila *a* i *b* bio je viši kod plojki u usporedbi s peteljkama listova, što je utjecalo i na veću fotosintetsku učinkovitost u plojkama u odnosu na peteljke listova, što sam opisala u prethodnom poglavlju.

Karotenoidi imaju veliku ulogu kao pigmenti cvjetova i plodova, a zajedno s klorofilima također sudjeluju u fotosintezi (Karlson, 1982). Imaju zaštitnu ulogu jer sprečavaju nastajanje različitih oblika ROS-a, pogotovo singletnog kisika (Ramel i sur., 2012). Kako bi zaštitile fotosintetski aparat biljke kod prevelikog intenziteta svjetla povećavaju udio karotenoida (Franck i sur., 2007). U mojem istraživanju više karotenoida se nalazi u plojkama listova. Pošto je uloga karotenoida zaštita od prevelikog intenziteta sunca, očito ih ima najviše u plojkama listova jer su one više izložene suncu u odnosu na peteljke listova. U mojem istraživanju kod vrsta *D. aliciae* i *D. spatulata* veći udio karotenoida se nalazi kod biljaka koje su bile uzgajane u sobnim uvjetima što je neobično s obzirom da je u tim uvjetima bio niži intenzitet svjetlosti. Naime, pri jakom intenzitetu svjetlosti biljke imaju povećan udio karotenoida u odnosu na klorofile (Singh i sur., 2011) jer karotenoidi preuzimaju suvišak energije od klorofila i sprečavaju moguća oštećenja (Pevalek-Kozlina, 2003). Međutim, karotenoidi imaju i ulogu pomoćnih pigmenata koji proširuju spektar valnih duljina pa je moguće da kod mesojednih biljaka imaju ulogu upravo u tome. Iako hranjenje mesojednih biljaka povećava udio klorofila *a* i *b*, nije nađen učinak hranjenja na udio karotenoida (Pavlovič i sur., 2014).

5.3. UDIO FENOLNIH SPOJEVA U TKIVU

U rosikama sam određivala i udio ukupnih fenola, flavonoida i antocijana. Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koji imaju veliku ulogu u zaštiti biljke (Dixon i Paiva, 1995), od herbivora (Close i McArthur, 2002), od UV zračenja (Waterman i sur., 1984), ulogu u obojenosti biljaka (Dixon i Paiva, 1995) te zaštitu od (ROS) (Close i McArthur, 2002). Flavonoidi spadaju u fenolne spojeve (Jaakola i sur., 2004), te imaju ulogu u zaštiti biljaka od dugovalnog UV zračenja (295-400 nm) te oštećenja DNA (Pevalek-Kozlina, 2003). Antocijani, podgrupa flavonoida, su obojeni pigmenti u biljkama i uloga im je privlačenje insekata (Jaakola i sur., 2004) iako mogu imati i ulogu od previsokog intenziteta osvjetljenja (Winkel-Shirley, 2002).

Kod vrsta *D. capensis* i *D. aliciae* manji udio fenolnih spojeva bio je prisutan kod biljaka koje su se nalazile u vanjskim uvjetima. Taj me rezultat iznenadio jer sam očekivala

da će biljke izložene većem intenzitetu svjetlosti imati i veći udio fenola zbog njihove zaštitne uloge. Ako je rizik od fotooštećenja nizak tada je i nizak udio fenolnih spojeva jer je potreba za njima manja (Close i McArthur, 2002). S druge strane udio fenolnih spojeva je bio viši kod plojki nego peteljki listova što je i očekivano jer su one bile više izložene sunčevoj svjetlosti, te je rizik od fotooštećenja veći. Međutim, zna se da na povišenje udjela fenola utječe i manjak minerala (Close i McArthur, 2002). Moguće je da je na povećan udio fenolnih spojeva prisutan kod biljaka *D. capensis* i *D. aliciae* koje su rasle u sobnim uvjetima utjecao manjak dostupnosti kukaca te su biljke imale manjak minerala. Poznato je da mesojedne biljke učinkovito apsorbiraju N, P, K i Mg iz insekata (Kováčik i sur., 2010), te da udio N i P može značajno porasti kad mesojedna biljka ulovi pijen (Pavlovič i sur., 2014). Vrsta *D. spatulata* razlikuje se po svojim rezultatima od prethodne dvije vrste. Kod nje je veći udio fenolnih spojeva kod biljaka koje su rasle u vanjskim uvjetima. Ovaj neočekivano visoki rezultat je vjerojatno posljedica utjecaja nekog stresnog čimbenika na biljku. Kao što sam već spomenula fenolni spojevi štite biljku od fotooštećenja (Agati i Tattini, 2010) jer osim što mogu apsorbirati štetne valne duljine mogu djelovati i kao antioksidansi te ukloniti ROS-ove inducirane prevelikom intenzitetom svjetlosne energije (Close i McArthur, 2002). Budući da je kod vrste *D. spatulata* kod biljaka koje su bile uzgajane u vanjskim uvjetima izmjeren najmanji udio fotosintetske učinkovitosti u odnosu na ostale dvije vrste rosika, a udio fenola je bio najviši, može se zaključiti da se biljka sintezom veće količine fenolnih spojeva željela zaštititi od oštećenja visokim intenzitetom svjetla pa su ti spojevi svojim djelovanjem smanjili količinu svjetlosne energije dostupne kloroplastima što je u konačnici dovelo do niže stope fotosinteze.

Mnogi autori istraživali su udio flavonoida u različitim svjetlosnim uvjetima (Bieza i Lois, 2001). Velika uloga flavonoida je zaštita od UV zračenja (Winkel-Shirley, 2002). U svojem istraživanju odredila sam veći udio flavonoida kod plojki u usporedbi s peteljka listova kod triju vrsta rosika *D. spatulata*, *D. capensis* i *D. aliciae*. Vjerojatno je veći udio flavonoida prisutan u plojkama jer su one na položaju koji je više izložen sunčevoj svjetlosti, i kako bi se zaštitile od prekomjerne izloženosti suncu prisutan je veći udio flavonoida. Udio flavonoida raste u stresnim uvjetima kao što su suša, niske temperature te preveliki intenzitet UV zračenja (Winkel-Shirley, 2002). Kod vrsta *D. spatulata* i *D. aliciae* veći udio flavonoida izmjerila sam kod biljaka koje su rasle u vanjskim uvjetima nego kod biljaka koje su rasle u sobnim uvjetima. Ovi rezultati u skladu s istraživanjima Jaakola i sur. (2004) koji je izmjerio veći udio flavonoida kod biljaka koje su bile izložene suncu. Zanimljivo je da je kod vrste *D.*

spatulata koje je bila uzgajana u vanjskim uvjetima prisutan najveći udio flavonoida u odnosu na ostala dvije vrste. Te biljke imale su ujedno i najviše ukupnih fenola te nisku fotosintetsku učinkovitost. Moguće da je došlo do oštećenja fotosintetskog aparata te je zbog toga fotosintetska učinkovitost manja. Prejak intenzitet osvjetljenja može uzrokovati svjetlosni stres koji najprije djeluje na fotosintezu te dolazi do smanjivanja njene stope (Pevalek-Kozlina, 2003). A udio flavonoida je povećan jer se biljka njihovom sintezom pokušala zaštititi kod fotooštećenja (Agati i Tatini, 2010). No kao što sam već navela moguće je i da je povećana količina flavonoida efikasno apsorbirala svjetlosnu energiju te je na taj način došlo do „zasjenjenja“ kloroplasta pa je fotosinteza bila snižena. Rosika *D. capensis* se razlikuje od ostale dvije vrste, veći udio flavonoida je prisutan kod biljaka koje su se nalazile u sobnim uvjetima, kao što je nađeno i za ukupne fenole, što je neočekivani rezultat i može biti povezan s većim manjkom mineralnih tvari uslijed nemogućnosti ulova plijena kao što je već objašnjeno kod fenolnih spojeva.

Prisutnost antocijana odgovorna je za crvenu boju listova (Jaakola i sur., 2004). Ne čudi me da je u mojem istraživanju znatno veći udio antocijana prisutan u plojkama u odnosu na peteljke listova i to kod svih triju rosika. Na plojkama listova nalaze se tentakuli pomoću kojih biljka lovi plijen, a poznato je da kod mesojednih biljaka mnoge zamke imaju crvenu pigmentaciju (Briscoe i Chittka, 2001). Jedna od glavnih uloga sekundarnih biljnih metabolita je i u privlačenju kukaca (Jaakola i sur., 2004). Vjerojatno je manji udio antocijana prisutan u peteljkama listova jer one kao prvo na sebi nemaju tentakule i ne služe za privlačenje kukaca, a vjerojatno su i manje izložene sunčevoj svjetlosti u odnosu na plojke listova. Moje istraživanje je pokazalo da je kod vrsta *D. spatulata* i *D. aliciae* veći udio antocijana prisutan kod biljaka koje su bile uzgajane u vanjskim uvjetima. Kod Jaakole i sur. (2004) koncentracija antocijana je također viša kod listova koji su bili više izloženi suncu. Udio antocijana je 40 % niži kod biljaka koje su uzgajane u sobnim uvjetima u odnosu na biljke koje su bile uzgajane u vanjskim uvjetima (Tkalec i sur., 2015). Antocijani su također antioksidanti koji uklanjaju ROS-ove (Close i McArthur, 2002) znači njihova je uloga zaštita od fotoinhibicije kod visokih intenziteta svjetlosti. Antocijani apsorbiraju svjetlo plavog i zelenog dijela spektra (Merzlyak i sur., 2008) te tako reduciraju količinu svjetlosti koja dolazi do kloroplasta. Vrsta *D. capensis* se kao i u slučaju flavonoida razlikuje od ostale dvije vrste, zbog toga što pokazuje veći udio antocijana kod biljaka koje su bile uzgajane u sobnim uvjetima što dakle može ukazivati na manjak hranjivih tvari uslijed nemogućnosti hvatanja kukaca ili na neki dodatni, nepoznati stresni faktor budući da je poznato da razni stresni

faktori poput suše, niskih temperatura i dr. mogu poticati sintezu flavonoida (Winkel-Shirley, 2002).

5.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Izloženost biljaka ekološkim faktorima kao što su suša, nedostatak ili suvišak vode u tlu, visoke i niske temperature, povećan salinitet, izloženost ozonu, imaju nepovoljan utjecaj te mogu izazvati stres (Wang i sur., 2005). Dolazi do prijenosa energije na molekule kisika i to uzrokuje nastajanje kratkoživućih vrsta aktivnog kisika (ROS). Biljke posjeduju veoma učinkovit antioksidacijski sustav za gašenje ROS-a (Close i McArthur, 2002).

Antioksidacijska aktivnost pokazala se dosta visokom i to kod svih triju vrsta rosika. Jedino je niža kod peteljke *D. capensis* koja je bila uzgajana u vanjskim uvjetima, te kod peteljke *D. spatulata* koja je bila uzgajana u sobnim uvjetima. Pošto je najveći udio ukupnih fenola, flavonoida i antocijana prisutan u plojkama listova pretpostavljala sam kako će i veća antioksidacijska aktivnost biti u plojkama u odnosu na peteljke listova. U raznim istraživanjima je dokazano kako prisutnost fenolnih spojeva znatno pridonosi antioksidacijskom potencijalu biljke (Dudonne i sur., 2009), zbog toga jer postoji povezanost u koncentraciji fenolnih spojeva i vezanju ROS-a. Međutim u svojem istraživanju dobila sam podjednak antioksidacijski potencijal u plojkama i peteljkama listova.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata provedenog istraživanja na tri vrste rosika *D. capensis*, *D. spatulata* i *D. aliciae* od kojih sam dio uzgajala u sobnim uvjetima pri osvjetljenju od 60 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a drugi dio na otvorenom prostoru pri osvjetljenju od prosječno 2500 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tijekom nekoliko tjedana, zaključila sam sljedeće:

- fotosintetska učinkovitost se pokazala višom kod rosika uzgajanih u vanjskim uvjetima i to kod vrsta *D. capensis* i *D. aliciae*, dok je kod vrste *D. spatulata* bila viša u sobnim uvjetima. Sve vrste rosika pokazuju veću fotosintetsku učinkovitost kod plojki a manju kod peteljki listova. Fotosintetska učinkovitost je znatno manja kod istraživanih rosika u odnosu na optimalne vrijednosti nemesojednih biljaka. Mogu zaključiti da je na to utjecala prilagodba rosika na karnivoriju.
- udio klorofila *a* i *b*, te karotenoida bio je viši kod vrste *D. capensis* kod biljaka uzgajanih u vanjskim uvjetima dok je kod vrsta *D. spatulata* i *D. aliciae* veći udio fotosintetskih pigmenata nađen kod biljaka koje su rasle u sobnim uvjetima. Može se zaključiti da na udio fotosintetskih pigmenata osim svjetlosti utječe i neki drugi faktor kao što je na primjer ulov kukaca iz kojeg rosike dobivaju dušik. Plojke su bogatije fotosintetskim pigmentima od peteljki listova što rezultira i višom fotosintetskom učinkovitošću. Međutim veća učinkovitost fotosinteze nije nužno povezana s udjelom fotosintetskih pigmenata jer vrsta *D. aliciae* pokazuje veći udio fotosintetskih pigmenata kod biljaka uzgajanih u sobnim uvjetima, ali neočekivano višu fotosintetsku učinkovitost kod biljaka uzgajanih u vanjskim uvjetima.
- udio ukupnih fenola, flavonoida i antocijana viši je u plojkama u odnosu na peteljke listova što se može povezati s prisutnošću crvenih tentakula odnosno privlačenjem insekata njihovom obojenošću. Kod vrsta *D. capensis* i *D. aliciae* veći je udio ukupnih fenola kod biljaka uzgajanih u sobnim uvjetima, dok je kod vrste *D. spatulata* viši kod biljaka uzgajanih u vanjskim uvjetima. Udio flavonoida i antocijana viši je u vanjskim uvjetima kod vrsta *D. spatulata* i *D. aliciae*, dok je kod vrste *D. capensis* viši u sobnim uvjetima. Ovi rezultati ukazuju da i na udio fenolnih spojeva osim svjetlosti može utjecati dostupnost kukaca kao izvora mineralnih tvari.

- antioksidacijska aktivnost je visoka kod svih triju vrsta rosika i to podjednako u peteljka i plojkama listova, jedino je nešto niža vrijednost kod peteljki *D. capensis* uzgajanih u vanjskim uvjetima, te kod *D. spatulata* kod biljaka uzgajanih u sobnim uvjetima. Nije dokazana povezanost fenolnih spojeva s antioksidacijskom aktivnošću.

7. LITERATURA

- Adamec, L., (1997): Mineral nutrition of carnivorous plants: a review. *Bot Rev* 63: 273-299.
- Agati, G., Tattini, M. (2010): Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytol* 186: 786-793.
- Arora, A., Sairam, R. K., Srivastava, G. C., (2002): Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr Sci India* 82: 1227-1238
- Awah, F. M., Uzoegwu, P. N., Ifeonu, P., Oyugi, J. O., Rutherford, J., Yao X., Fehrmann, F., Fowke, K. R., Eze, M. O., (2012): Free radical scavenging activity, phenolic contents and cytotoxicity of selected Nigerian medicinal plants. *Food Chem* 131: 1279–1286.
- Barber, J., (1995): Molecular basis of the vulnerability of photosystem II to damage by light. *Funct Plant Biol* 22: 201-208.
- Bieza, K., Lois, R., (2001): An arabidopsis mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolic. *Plant Physiol* 126: 1105-1115.
- Brestic, M., Zivcak, M., (2013): PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in plants: protocols and applications. *Mol Stress Physiol Plants* 87-131.
- Briscoe, A. D., Chittka, L., (2001): The evolution of color vision in insects. *Annu Rev Entomol* 46: 471-510.
- Bruzzese, B. M., Bowler, R., Massicotte, H. B., Fredeen, A. L., (2010): Photosynthetic light response in three carnivorous plant species: *Drosera rotundifolia*, *D. capensis* and *Sarracenia leucophylla*. *Photosynthetica* 48(1): 103-109.
- Chatzistathis, T. A., Papadakis, I. E., Therios, I. N., Giannakoula, A., Dimassi, K., (2011): Is chlorophyll fluorescence technique a useful tool to assess manganese deficiency and toxicity stress in olive plants? *J Plant Nutr* 34: 98-114.
- Close, D. C., McArthur, C., (2002): Rethinking the role of many plant phenolics – protection from photodamage not herbivores? *OIKOS* 99: 166–172.
- d'Amato, P., (2013): *The savage garden, cultivating carnivorous plants*. Ten Speed Press, New York.
- Demming-Adams, B., Gilmore, A. M., Adams, W. W., III (1996): In vivo functions of carotenoids in higher plants. *Fed Am Soc Exp Biol J* 10: 403-412.
- Dixon, R. A., Paiva, N. L., (1995): Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097.

- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., Mérillon, J.M., (2009): Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J Agr Food Chem* 57(5): 1768–177.
- Ellison, A. M., Gotelli, N. J., (2001): Evolutionary ecology of carnivorous plants. *Trends Ecol Evol* 16: 623-629.
- Filipović, I., Lipanović, S., (1979): *Opća i anorganska kemija, Školska knjiga, Zagreb.*
- Franck, N., Winkler, S., Pastenes, C., Infante, R., (2007): Acclimation to sun and shade of three accessions of the Chilean native berry-crop murta. *Agroforest Syst* 69: 215-229.
- Gibson, R., (1993): A Closer Look at *Drosera peltata* and *D. auriculata*. *B Aust Carnivory Plant* 12 (4): 11-16.
- Gibson, T. C., Waller, D. M., (2009): Evolving Darwin's 'most wonderful' plant:ecological steps to a snap-trap. *New Phytol* 183(3): 575-87.
- Givnish, T. J., Burkhardt, E. L., Happel, R. E., Weintraub, J. D., (1984): Carnivory in the Bromeliad *Brocchinia reducta*, with a cost/benefit model for the general restriction of carnivorous plants to sunny, moist, nutrient-poor habitats. *Am Nat* 124: 479-497.
- Hájek, T., Adamec, L., (2010): Photosynthesis and dark respiration of leaves of terrestrial carnivorous plants. *Biologia* 65(1): 69 – 74.
- Hakala- Yarkin, M., Mäntysaari, M., Mattila, H., Tyystjärvi, E., (2010): Contributions of visible and ultraviolet parts of sunlight to photoinhibition. *Plant Cell Physiol* 51: 1745-1753.
- Havaux, M., (1998): Carotenoids as membrane stabilisers in chloroplasts. *Trends Plant Sci* 3: 147-151.
- Jaakola, L., Määttä-Riihinen, K., Kärenlampi, S., Hohtola, A., (2004): Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus*, L.) leaves. *Planta* 218: 721-728.
- Juniper, B. E., Robins, R. J., Joel, D. M., (1989): *The carnivorous plants.* Academic Press, London.
- Kalt, W., Dufour, D., (1997): Health Functionality of blueberries. *Hort Technol* 7: 216-221.
- Karlsen, P., (1984): *Biokemija, Školska knjiga, Zagreb.*
- Knox, J. P., Dodge, A. D., (1985): Singlet oxygen and plants. *Phytochemistry* 24: 889-896.
- Kováčik, J., Klejduš, B., Štork, F., Hedbavny, J., (2010): Prey- induced, change in the accumulation of amino acids and phenolic metabolites in the leaves of *Drosera capensis* L. *Amino Acids* 42 (4): 1277-85.

Król, E., Płachno, B. J., Adamec, L., Stolarz, M., Dziubińska, H., Trębacz, K., (2012): Quite a few reasons for calling carnivores 'the most wonderful plants in the world'. *Ann Bot-London* 109: 47-64.

Lichtenthaler, H. K., (1987): Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Method Enzymol* 148: 350 – 382.

Lichtenthaler, H. K., Babani, F., (2004): Light adaptation and senescence of the photosynthetic apparatus. Changes in pigment composition, chlorophyll fluorescence parameters and photosynthetic activity. U: Papageorgiou, G. C., Govindjee (ur.) *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*. Springer, The Netherlands, str. 713 -736.

Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C., Knapp, M., (2005): How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio RFd of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica* 43(3): 379-393.

Lichtenthaler, H. K., (2007): Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids, *α*-tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance. *Photosynth Res* (92): 163-179.

Matušíková, I., Salaj, J., Moravčíková, J., Mlynárová, L., Nap, JP., Libantová, J., (2005): Tentacles of *in vitro*-grown round-leaf sundew (*Drosera rotundifolia* L.) show induction of chitinase activity upon mimicking the presence of prey. *Planta* 222: 1020-1027.

Maxwell, K., Johnson, G. N., (2000): Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J Exp Bot* 51(345): 659-668.

Müller, P., Li, X. P., Niyogi, K. K., (2001): Non - photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* 125(4): 1558-1566.

Newell, S. J., Nastase, A. J., (1998): Efficiency of insect capture by *Sarracenia purpurea* (*Sarraceniaceae*), the northern pitcher plant. *Am J Bot* 85(1): 88–91.

Okabe, T., Iwakiri, Y., Mori, H., Ogawa, T., Ohyama, T., (2005): An S –like ribonuclease gene is used to generate a trap- leaf enzyme in the carnivorous plant *Drosera adelae*. *FEBS Lett* 579: 5729-5733.

Paiva, É. A. S., Isaias, R. M. S., Vale, F. H. A., Queiroz, C. G. S., (2003): The influence of light intensity on anatomical structure and pigment contents of *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. *purpurea* Boom (*Commelinaceae*) leaves. *Braz Arch Biol Techn* 46: 617-624.

Pavlovič, A., Masaričova, E., Hudak, J., (2007): Carnivorous syndrome in Asian pitcher plants of the genus *Nepenthes*. *Ann Bot- London* 100: 527–536.

Pavlovič, A., Singerová, L., Demko, V., Hudák, J., (2009): Feeding enhances photosynthetic efficiency in the carnivorous pitcher plant *Nepenthes talangensis*. *Ann Bot* 104: 307-314.

Pavlovič, A., Krausko, M., Libiaková, M., Adamec, L., (2014): Feeding on prey increases photosynthetic efficiency in the carnivorous sundew *Drosera capensis*. *Ann Bot* 113: 69-78.

- Pevalek-Kozlina, B., (2003): Fiziologija bilja. Profil, Zagreb
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J., Shahabimajd, N. (2006): Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr J Biotechnol* 5(11): 1142-1145.
- Ramel, F., Birtic, S., Cuiné, S., Triantaphylidés, C., Ravanat, J. L., Havaux, M., (2012): Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. *Plant Physiol* 158: 1267–1278.
- Repčák, M., Galambosi, B., Takkunen, N., (2000): The production of 7-methyljuglone , quercetin and kaempferol by *Drosera anglica* and *Drosera rotundifolia*. *Biologia* 55: 429-433.
- Singh, R., Singh, S., Tripathi, R., Agrawal, S. B., (2011): Supplemental UV-B radiation induced changes in growth, pigments and antioxidant pool of bean (*Dolichos lablab*) under field conditions. *J Environ Biol* 32: 139-45.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela - Raventos, R.M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin - Ciocalteu reagent. *Method Enzymol* 299: 152-178.
- Slack, A., (2000): Carnivorous plants. MIT Press, Yeovil.
- Tkalec, M., Doboš, M., Babić, M., Jurak, E., (2015): The acclimation of carnivorous round-leaved sundew (*Drosera rotundifolia* L.) to solar radiation. *Acta Physiol Plant* 37(4): 1-9.
- Walters, R. G., (2005): Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *J Exp Bot* 56 (411): 435-447.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A., (2003): Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14.
- Waterman, P. G., Ross, J. A. M., i McKey, D. B., (1984): Factors affecting levels of some phenolic compounds, digestibility, and nitrogen content of the mature leaves of *Barteria fistulosa*. *J Chem Ecol* 10: 387-401.
- Wellburn, A. R., (1994): The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol* 144: 307-313.
- Winkel- Shirley, B., (2002): Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* 5: 218-223.

Korištene internet stranice:

<http://cpphotofinder.com/drosera-capensis-522.html>

<http://wesselsgardenway.com/2013/05/>

<http://www.carnivoras.com.br/haste-floral-de-drosera-spatulata-ajuda-urgente-t2074-10.htm>

<http://instrukcije-kemija.blogspot.com/>

<https://istiqomahrrr.wordpress.com/2013/06/12/pigmen-klorofil/>

<http://www.freelandtime.com/micoterapia/approfondimenti/i-flavonoidi.html>

<http://free-zg.t-com.hr/ivanzub/SAMP/foto1.html>

ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: MARCELA CURMAN
Adresa: Mokrice 72, 49243 Oroslavje
Datum i mjesto rođenja: 3.6.1989, Zagreb
Telefon: 098 190 4997
e-mail: marcela.curman@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2010.- Prirodoslovno-matematički fakultet – Biološki odsjek, Zagreb
Smjer: Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije -
nastavnički smjer
2004.- 2008. Opća gimnazija Oroslavje
1997.- 2004. Osnovna škola Oroslavje

POSEBNE VJEŠTINE:

Strani jezici: Engleski jezik
Računala: MS Office, GIMP,
Vozačka dozvola: B kategorije

NAGRADE I PRIZNANJA:

2001.- sudjelovanje na literarnoj smotri "Dani Ivice Kičmanovića" s radom "Sitni nesporednici"
2003.- dobitnica Male nagrade Gjalski za rad " Iz dnevnika jedne Ane"
2004.- drugo mjesto na županijskom natjecanju ekipa podmlatka i mladeži Crvenog križa
2007.- uspješno završila modul programa Organizator primijenjene komunikacije "Brzo čitanje"
2008.- osvojeno prvo mjesto u kategoriji Mladeži na XII. Državnom natjecanju mladeži Hrvatskog Crvenog križa
2008.- sudjelovanje u finalu natječaja "ZNAM, HOĆU, MOGU" organiziranog povodom Međunarodnog dana borbe protiv zlouporabe opojnih droga
2011.- 2015.- sudionik na Noći biologije
2012.- dobitnica posebne Rektorove nagrade za sudjelovanje na Noći biologije
2015. - sudionik na Danu kemije
2015. - praksa u inozemstvu, Netherlands Cancer Institute (NKI): Antoni Van Leeuwenhoek, Amsterdam
2015.- sudjelovanje na 12. Hrvatskom biološkom kongresu

HOBI I INTERESI:

Putovanje svijetom, crtanje, čitanje.

