

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

Sonja Sorić

**OVISNOST RASTA I FOTOSINTEZE VODENE LEĆE
(*Lemna minor* L.) O OSMOTSKOJ VRIJEDNOSTI
PODLOGE I OSVJETLJENJU**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2011. godina

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

OVISNOST RASTA I FOTOSINTEZE VODENE LEĆE (*Lemna minor* L.) O OSMOTSKOJ
VRIJEDNOSTI PODLOGE I OSVJETLJENJU

Sonja Sorić

Rooseveltova trg 6, Zagreb

Vodena leća je mala brzorastuća jednosupnica koja se zbog visoke osjetljivosti i jednostavnog uzgoja u laboratorijskim uvjetima koristi za istraživanje učinka različitih tvari i okolišnih uvjeta. U ovom radu vodene leće su u kulturi *in vitro* uzgajane na hranjivoj podlozi po Pirsonu i Seidelu uz dodatak različitih koncentracija saharoze (5,0; 7,5 i 10,0 g/L) i izložene različitim izvorima osvjetljenja („Cool White“, 38-40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ te „GroLux“, 55 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ s većim udjelom plavog i crvenog dijela spektra). Praćenjem rasta biljaka utvrđeno je da sve kulture imaju eksponencijalni rast u trajanju 16 dana pa je to vrijeme određeno kao vrijeme trajanja pokusa. Stopa rasta biljaka bila je proporcionalna povećanju koncentracije saharoze u hranjivoj podlozi neovisno o vrsti izvora svjetlosti. Najviša vrijednost stope rasta biljaka zabilježena je u vodenih leća izloženih izvoru svjetlosti „GroLux“ na podlozi s 7,5 i 10,0 g/L saharoze. Mjerenjem učinkovitosti fotosistema II metodom saturacijskog pulsa, utvrđeno je da je fotokemijsko gašenje jedini parametar koji je ukazao na značajniju razliku u biljaka izloženih različitim koncentracijama saharoze i izvoru svjetlosti „Cool White“. Dobiveni rezultati pokazuju da više koncentracije saharoze (7,5 i 10,0 g/L) i izvor svjetlosti s većim udjelom plavog i crvenog dijela spektra („GroLux“) uzrokuju bolju stopu rasta biljaka dok učinkovitost fotosinteze nije bila ovisna o vrsti izvora svjetlosti.

(56 stranica, 18 slika, 3 tablice, 40 literaturnih navoda, hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u: Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: svjetlost, osmotska vrijednost, rast, fotosinteza, vodena leća (*Lemna minor* L.)

Voditelj: Doc. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Mirjana Kalafatić
Doc. dr. sc. Ana Galov

Rad prihvaćen: 13. 04. 2011.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

EFFECT OF OSMOTIC VALUES OF NUTRIENT MEDIUM AND ILLUMINATION CONDITIONS ON GROWTH AND PHOTOSYNTHESIS IN DUCKWEED (*Lemna minor* L.)

Sonja Sorić

Rooseveltovo trg 6, Zagreb

Duckweed is a small, fast growing monocotyledon, commonly used in investigations of effects of various substances and environmental conditions due to high sensitivity and simple cultivation in laboratory conditions. In our experiment duckweeds were grown *in vitro* on Pirson – Seidel's nutrient medium supplemented with sucrose in concentrations 5.0, 7.5 i 10.0 g/L and exposed to different light conditions (Cool White, 38-40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and GroLux, 55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ which has a higher proportion of blue and red part of the spectrum). It was found that all cultures kept exponential growth over period of 16 days, therefore it was defined as duration of the experiment. Under the both illumination conditions, growth rate of duckweeds followed the increase of sucrose concentrations in nutrient solution. The highest value of growth rate was noticed in plants exposed to GroLux light, especially on solution containing 7.5 and 10.0 g/L of sucrose. The only parameter of chlorophyll *a* fluorescence measurement which showed significant influence of osmotic conditions was photochemical quenching in plants exposed to Cool White light. Obtained results show that higher sucrose concentrations (7.5 i 10.0 g/L) and light containing higher proportion of blue and red part of the spectrum (GroLux) caused higher growth rate while efficiency of photosynthesis was not influenced by either of light conditions in duckweed.

(56 pages, 18 figures, 3 tables, 40 references, original in Croatian)

Thesis deposited in: Central biological library

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

Supervisor: Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Mirjana Kalafatić, Full Prof.
Dr. Ana Galov, Asst. Prof.

Thesis accepted: April 13, 2011.

Ovaj rad izrađen u Botaničkom zavodu, pod vodstvom doc. dr. sc. Željke
Vidaković-Cifrek, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi
stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer ekologija.

ZAHVALA

Zahvaljujem svima koji su svojim savjetima, strpljenjem i podrškom pridonijeli izradi ovoga diplomskog rada, posebice mentorici doc. dr. sc. Željki Vidaković-Cifrek, pomoćnoj voditeljici dr. sc. Mariji Babić, mr. sc. Biserki Jelenčić i ostalim članovima Laboratorija za fiziologiju bilja. Veliko hvala mojoj majci i bratu, obitelji i prijateljima koji su mi bili podrška tijekom čitavog mog studija.

Sonja

1. UVOD	1
1.1. Vodena leća (<i>Lemna minor</i> L.)	2
1.2. Uzgoj vodene leće u uvjetima <i>in vitro</i>	3
1.2.1. Hranjive podloge za uzgoj vodene leće	3
1.2.2. Svjetlosni uvjeti za uzgoj vodene leće	5
1.2.3. Temperaturni uvjeti za uzgoj vodene leće	7
1.3. Lemna-test	7
1.3.1. Određivanje stope rasta vodene leće	8
1.3.2. Određivanje učinkovitosti fotosinteze	8
1.4. Fotosinteza	9
1.4.1. Fluorescencija klorofila <i>a</i>	12
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	15
3. MATERIJAL I METODE	17
3.1. Biljni materijal	18
3.1.1. Hranjiva podloga za održavanje kulture vodene leće u uvjetima <i>in vitro</i>	18
3.1.2. Hranjiva podloga za istraživanje osmotskog učinka i učinka tipa osvjetljenja	19
3.2. Metode	21
3.2.1. Lemna – test	21
3.2.2. Mjerenje fluorescencije klorofila <i>a</i>	22
3.3. Statistička analiza	26
4. REZULTATI	27
4.1. Lemna test	28
4.1.1. Relativna stopa rasta (RGR)	28
4.1.2. Vrijeme udvostručenja broja biljaka (Td)	29
4.2. Fluorescencija klorofila	30
4.2.1. Optimalni prinos fotosistema II	30
4.2.2. Efektivni prinos fotosistema II	32
4.2.3. Fotokemijsko gašenje	34
4.2.4. Nefotokemijsko gašenje	36
4.2.5. Stopa transporta elektrona	38
5. RASPRAVA	41
5.1. Ovisnost relativne stope rasta o osmotskoj vrijednosti podloge i osvjetljenju	42
5.2. Ovisnost učinkovitosti fotosinteze o osmotskoj vrijednosti podloge i osvjetljenju	44
6. ZAKLJUČAK	49
7. LITERATURA	51

1. UVOD

Kopnene i vodene biljke su primarni producenti organskih spojeva a u procesu njihove sinteze fotosintezom oslobađaju kisik potreban za sva druga bića (Wang, 1991). Jedinstvene su po tome što putem fotosinteze mogu pretvarati svjetlosnu energiju u kemijsku (Pevalek-Kozlina, 2003). Tijekom evolucije su se prilagodile na efikasnija iskorištavanja svjetlosnog spektra. Budući da klorofil apsorbira u plavom i crvenom dijelu spektra, svjetlost koja se reflektira obogaćena je zelenim dijelom spektra i zato su biljke zelene boje (Pevalek-Kozlina, 2003).

U vodene makrofite ubrajaju se brojne vrste algi i biljaka koje imaju veliku važnost u produkciji kisika, u kruženju hranjivih tvari, stabilizaciji sedimenta te pružaju životni prostor i sklonište za mnoge životinje. Osim velikog značenja u prirodi, vodene biljke su korisni testni organizmi u ekotoksikološkim istraživanjima. Često se koriste i u fitoremedijaciji - postupku u kojem se biljke koriste za sanaciju kontaminiranog tla ili podzemnih voda (Mkandawire i Dudel, 2007).

1.1. VODENA LEĆA *Lemna minor* L.

Vodne leće su slobodnoplutajuće jednosupnice koje pripadaju porodici *Lemnaceae*. Porodica *Lemnaceae* sadrži oko 40 vrsta koje su svrstane u pet rodova: *Lemna*, *Spirodela*, *Wolffiella*, *Wolffia* i *Landoltia* (Landolt, 1986; Les i Crawford, 1999). One su morfološki najjednostavnije vaskularne biljke (Holm, 1997) i kozmopoliti su, a nastanjuju slatke i braktične vode. Jedina mjesta koja ne naseljavaju su pustinje i polarni krajevi. Rasprostranjuju se pomoću vjetra, vodenih struja te životinjama koje žive uz vodu. Vrsta *Lemna minor* L. je među svim vrstama porodice *Lemnaceae* geografski najrasprostranjenija (Krajncić, 1972). Ekološki su značajne jer mnogobrojne životinje opskrbljuju hranom i skloništem (Wang, 1991; Landolt, 1986).

Vodena leća *Lemna minor* L. je građena od dva morfološki različita dijela: „listića“, koji u funkcionalnom smislu odgovara tijelu biljke, i jednog korijena. S obzirom da list u pravom smislu riječi ne može proizvoditi nove listove i cvatove, u vodenoj leći se njeni „listići“ identificiraju kao zasebna biljka (Landolt, 1986). Vodena leća apsorbira mineralne tvari kroz donju epidermu lista, a korijen služi za stabilizaciju i sprječava preokretanje (Landolt, 1986). Biljke stvaraju kolonije od dva ili više „listića“ (Wang, 1991) a veličina biljke varira od dva do četiri milimetra. Razmnožava se primarno vegetativnim putem. Na matičnoj biljci se nalaze dvije meristemske regije, tzv. reproduktivni džepovi, gdje nastaju novi „listići“ koji se nakon određenog vremena odvajaju od matične biljke koja tijekom života producira do 15 „listića“ kćeri nakon čega propada (Landolt, 1986). Vodena leća se rijetko razmnožava spolnim putem pri čemu se razvijaju cvatovi većinom u lijevom reproduktivnom džepu (Krajnčić, 1972).

1.2. UZGOJ VODENE LEĆE U UVJETIMA *in vitro*

Uzgoj vodene leće u uvjetima *in vitro* se provodi u klima komori na sterilnoj hranjivoj podlozi u kontroliranim temperaturnim i svjetlosnim uvjetima.

1.2.1. Hranjive podloge za uzgoj vodene leće

Svim biljkama, i vodenim i kopnenim, da bi se normalno razvijale potrebno je 17 esencijalnih elemenata koji se na temelju zastupljenosti u biljci dijele na makro- i mikroelemente. Makroelementi su ugljik, kisik, vodik, dušik, sumpor, fosfor, kalcij, kalij i magnezij, a mikroelementi željezo, mangan, cink, bakar, molibden, klor, nikal i bor. Ako je biljka dobro opskrbljena svim potrebnim elementima i vodom, uz odgovarajuću svjetlost, razvijat će se normalno. Suvišak ili nedostatak esencijalnih elemenata će uzrokovati poremećaje rasta i razvoja. No, pri manjku ili nedostatku potrebnih elemenata, na biljkama se osim usporenog rasta i smanjenih prinosa mogu uočiti i specifični simptomi, npr. žućenje listova (kloroza), nekroza i sl. (Pevalek-Kozlina, 2003). Ako su u

mediju prisutni elementi koji su toksični za biljku, ona će i tada reagirati pojavom simptoma poput razdvajanja kolonija, skraćivanje korijena, kloroze, nekroze i promjenom izgleda listića (Wang, 1990).

Vodene leće se uzgajaju na tekućim hranjivim podlogama od kojih su najpoznatije Hunterova, Hoaglandova, Hillmanova, Pirson-Seidlova, Bonner-Devirianova, Eysterova, Dathova i Docauerova (Landolt i Kandeler, 1987, Wang, 1990). Te hranjive podloge sadrže u određenoj mjeri različite koncentracije mikro- i makroelemenata a neke među njima sadrže i organske dodatke (aminokiseline, helirajuće spojeve, vitamine, hormone, ugljikohidrate) da bi se postigli što optimalniji uvjeti za rast biljaka.

Šećeri su ugljikohidrati koji se dijele na monosaharide, disaharide, oligosaharide i polisaharide. Disaharid saharoza je česti sastojak hranjivih podloga za vodene leće. Biljke ju koriste kao izvor energije u uvjetima nedostatnog osvjetljenja. Najčešći udio saharoze u podlogama za rast biljaka iz porodice *Lemnaceae* je između 0,5 i 2,5%. Sve vrste iz porodice *Lemnaceae* koje rastu u uvjetima nižih intenziteta svjetlosti rastu brže nakon dodavanja saharoze. Vodena leća sadrži određenu količinu saharoze (Landolt i Kandeler, 1987). Naime, šećeri koji fotosintezom nastaju u kloroplastima osiguravaju organske spojeve za čitavu biljku. U većine biljaka ugljikohidrati se iz stanica prenose u obliku saharoze koja u fotosintetizirajućim i nefotosintetizirajućim stanicama predstavlja materijal za stanično disanje i brojne anaboličke putove. Dio šećera u biljci se nalazi u obliku škroba koji se kratkotrajno pohranjuje u kloroplastima (Pevalek-Kozlina, 2003). Sadržaj saharoze u biljci ili u dijelu biljke predstavlja ravnotežu između proizvodnje fotosintezom i potražnje saharoze uslijed rasta i metabolizma. Osim toga, saharoza ima i značajnu regulatornu funkciju. Npr. ukoliko se nalazi u suvišku, saharoza može stimulirati procese odlaganja šećera u spremišna tkiva, može smanjiti potrebu za energijom koju biljka dobiva od fotosinteze i na taj način inhibirati proces fotosinteze (Farrar i sur., 2000; Kadleček i sur., 2003).

Saharoza u hranjivoj podlozi, ovisno o koncentraciji, može inhibirati odvajanje biljaka kćeri od majčinske biljke, te se tako stvaraju velike kolonije. Stimulira formiranje auksina (IAA) u biljci *Spirodela punctata* i reducira aktivnost glutamat dehidrogenaze u vrsti *Lemna aequinoctialis*. Veličina listića vodene leće se smanjuje s porastom

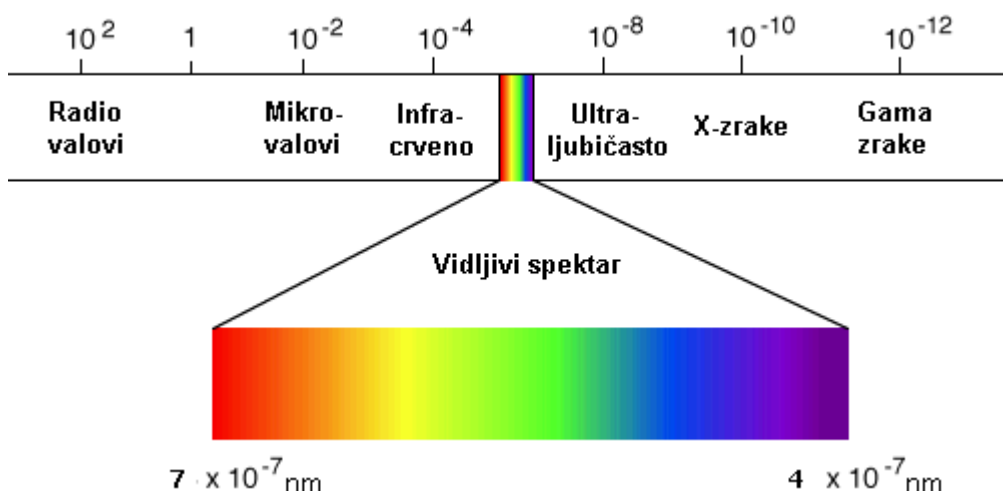
koncentracije saharoze u hranjivoj podlozi od 1 do 3%. Primanje saharoze je jednako u uvjetima tame kako i u uvjetima svjetla (Landolt i Kandeler, 1987).

Povećana koncentracija različitih tvari u mediju (npr. šećera ili iona) može izazvati osmotski stres (Grača, 2004). U takvim uvjetima može doći do poremećaja rasta i razvoja biljaka (Drøbak i Watkins, 2000), poremećaja sinteze fotosintetskih pigmenata (Ralph, 1998) i drugih učinaka.

Osmotski stres u vrsta iz porodice *Lemnaceae* pojavljuje se kada je u hranjivoj podlozi prisutno više od 13.5 % (w/w) saharoze. U takvim uvjetima primijećena je apscizija biljaka u kolonijama, promjene u razini apscizinske kiseline (ABA), etilena i auksina (IAA) (Landolt i Kandeler, 1987). Kako bi preživjele ove uvjete, biljke reagiraju i prilagođavaju se pomoću niza biokemijskih i razvojnih promjena, uključujući sintezu hormona stresa poput apscizinske kiseline (ABA), sintezu tzv. kompatibilnih osmolita i sintezu proteina koji sprečavaju denaturaciju i oksidativno oštećenje (Munnik i Meijer, 2001).

1.2.2. Svjetlosni uvjeti za uzgoj vodene leće

Spektar elektromagnetskog zračenja dijeli se na gama, rendgensko, ultraljubičasto, vidljivo, infracrveno, mikrovalno zračenje i radiovalove (Slika 1). Ljudsko oko vidi samo uski dio elektromagnetskog spektra - vidljivo zračenje ili svjetlost (Hilyard i Biggin, 1984). Valna duljina svjetlosti određuje boju. Najkraću valnu duljinu imaju ljubičasta i plava svjetlost, a najdulju crvena svjetlost. Za uzgoj vodene leće, preporuča se korištenje intenziteta svjetlosti od 85 do 125 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1} \pm 15\%$ (ISO/CD 20079).



Slika 1. Spektar elektromagnetskog zračenja. Istaknut je dio spektra koji predstavlja vidljivo zračenje ili svjetlost. To je ujedno djelotvoran dio spektra za fotosintezu. (<http://glossary.periodni.com/>)

Djelotvoran dio spektra za fotosintezu je u području vidljive svjetlosti, posebice u području crvene i plave svjetlosti. Fotosinteza pokazuje snažnu ovisnost o količini i kvaliteti svjetlosti. Povećanjem intenziteta osvjetljenja uočeno je da koncentracija klorofila i karotenoida raste (Landolt i Kandeler, 1987) te da se brzina fotosinteze u početku linearno povećava da bi zatim postupno, kada se fotosintetski aparat zasiti svjetlošću, poprimila konstantnu vrijednost. Prejako osvjetljenje može oštetiti fotosintetski aparat i tako smanjiti stopu fotosinteze. Ta se pojava zove svjetlosni stres (Pevalek-Kozlina, 2003). Vodena leća najbolje raste na 9000 luxa dok je iznad 15000 luxa zabilježeno oštećenje biljaka (Landolt i Kandeler, 1987).

Područje vidljive svjetlosti (388-760 nm) kao što je već napomenuto, je dio spektra koji omogućuje fotosintezu a to se područje spektra naziva fotobiološkim područjem. Naime, osim što svjetlost utječe na fotosintezu, taj dio spektra je odgovoran i za fototropizme (zakrivljenja uzrokovana svjetlošću), fototaksije (slobodna lokomotorna gibanja upravljana svjetlošću) i fotomorfogeneze (promjene oblika potaknute svjetlošću).

1.2.3. Temperaturni uvjeti za uzgoj vodene leće

Temperatura koja se preporuča kod istraživanja vodene leće i izvođenja Lemna-testa iznosi 24 ± 2 °C (ISO/CD 20079). Vodena leća može podnijeti široki raspon temperaturnih vrijednosti. Temperaturni optimum se nalazi između 21 i 30 °C, dok se minimum nalazi između 5 i 8 °C a maksimum između 30 i 32 °C (Landolt i Kandeler, 1987).

1.3. LEMNA –TEST

Vodne leće su vrlo prikladne za rad u laboratorijskim uvjetima zbog sljedećih svojstava: 1) malih su dimenzija, 2) lako se i brzo razmnožavaju, 3) jednostavne su građe, 4) osjetljive su na prisutnost različitih tvari u hranidbenoj podlozi, 5) razmnožavaju se vegetativno čime nastaju genetički identične biljke, 6) lako se uzgajaju i održavaju u kulturi. Zbog svega navedenog, vodene leće se učestalo koriste kao testni organizmi u ekotoksikološkim istraživanjima i u biljnoj fiziologiji za određivanje biološke aktivnosti i toksičnosti različitih tvari (Landolt, 1986; Wang, 1990) U Lemna-testu se najčešće koriste vrste *Lemna minor* i *Lemna gibba* (OECD, 2002). Većina biotestova koji se danas koriste predloženi su 1960-tih godina od strane regulatornih i standardnih razvojnih agencija kao što su to Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj (The Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD), Međunarodna organizacija za standardizaciju (The International Organization for Standardization, ISO), i Američko društvo za testiranje i materijale (The American Society for Testing and Materials, ASTM) (Lewis, 1995).

Lemna test se prema ISO (ISO/CD 20079) i OECD (2002) standardu izvodi na hranjivoj podlozi po Steinbergu u trajanju od sedam dana. U brojnim starijim literaturnim navodima nalaze se podaci da se test provodio i na drugim različitim hranjivim

podlogama i trajao je 4, 5, 7, 14 ili 21 dan (Wang, 1991). Pokazatelji toksičnosti koji se mogu pratiti u Lemna-testu su prirast broja biljaka, prirast mase svježe i suhe tvari,

duljina korijena, ukupna površina biljaka, koncentracija fotosintetskih pigmenata. Lemna test se može izvoditi kao statički test, test s periodičnim obnavljanjem hranjive podloge i protočni test. Statični test je jednostavniji i ekonomičniji (Wang, 1990).

1.3.1. Određivanje stope rasta vodene leće

U okviru Lemna-testa može se pratiti više pokazatelja učinka istraživanih tvari ili okolišnih uvjeta. Rast se obavezno prati u svakoj izvedbi Lemna-testa (Wang, 1990; Lewis, 1994). Pri uzgoju vodene leće u laboratorijskim uvjetima nedostatak hranjivih tvari ne smije biti uzrok zaostajanja rasta biljaka. Zato u hranjivoj podlozi mora biti dovoljna količina hranjivih tvari za vrijeme trajanja pokusa (Vidaković-Cifrek 1999). Dostatnu količinu hranjivih tvari nam dokazuje eksponencijalan rast biljaka (Landolt i Kandeler, 1987).

1.3.2. Određivanje učinkovitosti fotosinteze

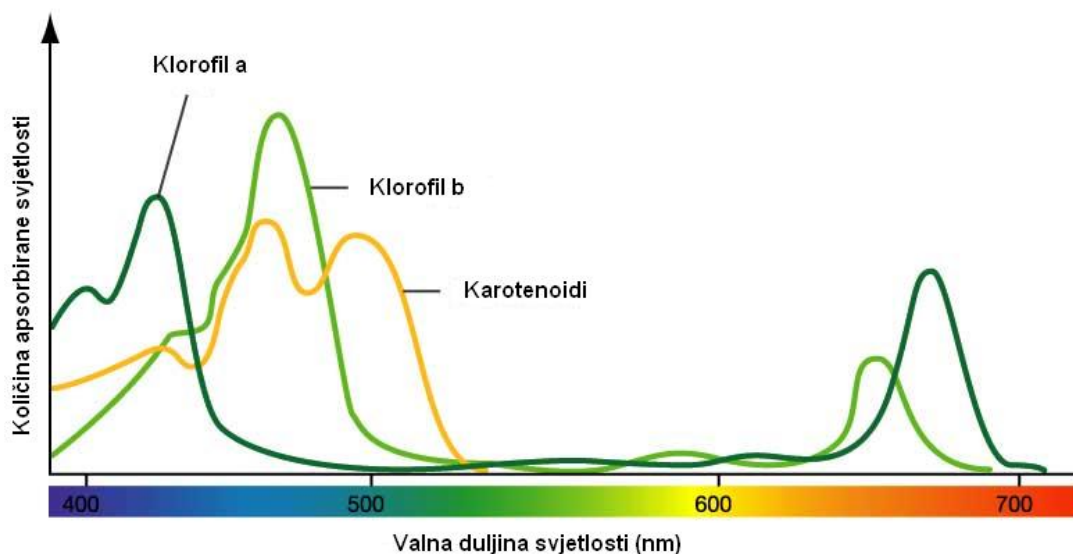
U okviru izvedbi Lemna-testa koje su propisane standardima, često se uz stopu rasta određuje i koncentracija fotosintetskih pigmenata. Određivanje ostalih pokazatelja procesa fotosinteze se rijetko primjenjuje u okviru Lemna-testa. No, budući da fluorescencija klorofila *a* daje informacije o učinkovitosti fotosistema II (PS II) ta se metoda danas koristi u procjeni fotosintetske aktivnosti u mnogih biljaka pa tako i vodene leće.

Budući da je za razumijevanje mjerenja fluorescencije klorofila potrebno poznavanje procesa fotosinteze, u narednom poglavlju ću opisati taj proces.

1.4. FOTOSINTEZA

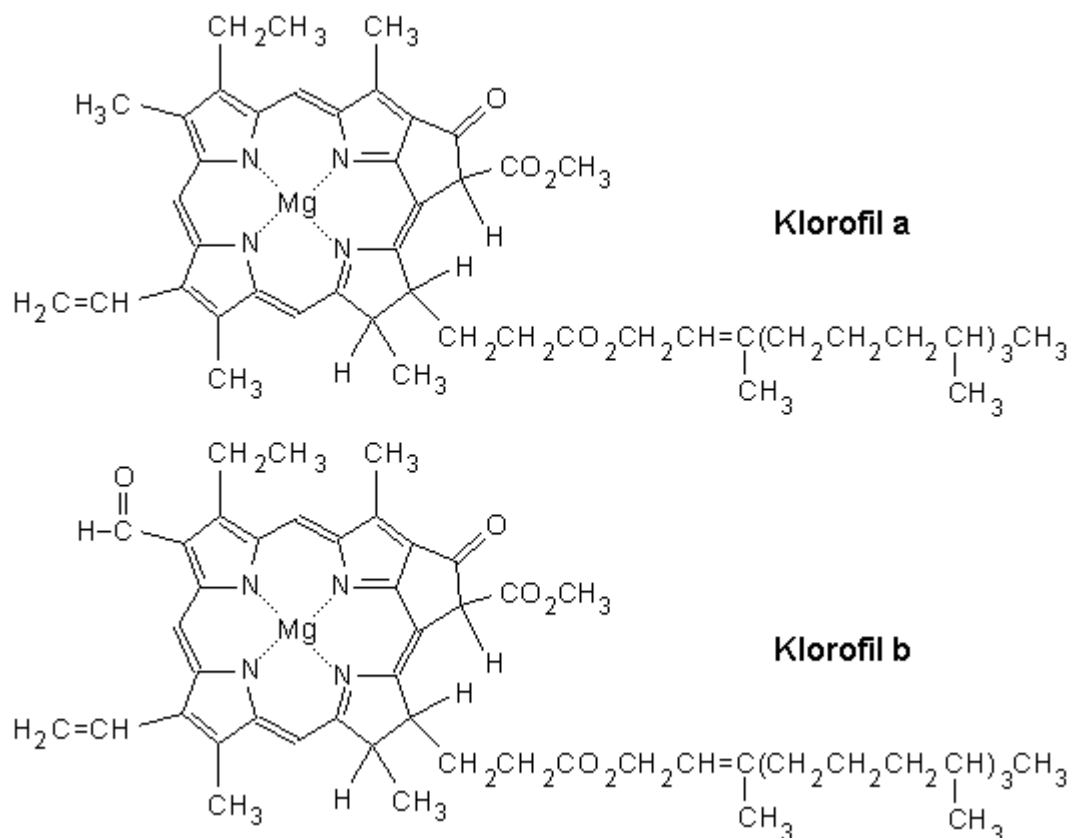
Fotosinteza je proces u kojem se uz pomoć Sunčeve svjetlosti ugljični dioksid veže u organske spojeve. Proces fotosinteze možemo podijeliti na svjetlosne reakcije (primarne reakcije) i reakcije koje nisu direktno ovisne u svjetlosti (sekundarne reakcije). Sekundarne reakcije se još uvijek iz povijesnih razloga nazivaju reakcijama u tami. U svjetlosnim reakcijama se oksidira voda te oslobađa kisik, dok se u reakcijama tame ugljikov dioksid veže u organske spojeve. Svjetlosne reakcije odvijaju se u tilakoidnim membranama kloroplasta koje sadrže molekule klorofila i ostale komponente nužne za pretvorbu energije. Većinom svi kemijski procesi koji čine svjetlosne reakcije provode se preko sljedećih proteinskih kompleksa: fotosistema II, kompleksa citokroma, fotosistema I i NADP⁺- reduktaze. Elektron se iz PSII prvo prenosi na molekulu plastokinona, zatim na kompleks citokroma, na plastocijanin i s plastocijanina na PSI. U tom prijenosu elektrona od vodika iz vode na NADP⁺, nastaje NADPH u kojem se elektroni pohranjuju kako bi kasnije poslužili za reakcije redukcije u Calvinovom ciklusu. Prijenos elektrona dovodi do nastanka protonskog gradijenta koji pokreće sintezu ATPa koji se u reakcijama tame koristi kao izvor energije u reakcijama sinteze šećera (Pevalek- Kozlina, 2003).

U svjetlosnim reakcijama fotosinteze značajnu ulogu imaju fotosintetski pigmenti. U fotosintetske pigmente se ubrajaju klorofili i karotenoidi. Oni apsorbiraju svjetlosnu energiju i pretvaraju je u kemijsku energiju, koja se zatim pohranjuje u kemijskim vezama šećera i ostalih organskih molekula nastalih u procesu fotosinteze. Zeleni pigmenti, klorofili, apsorbiraju u plavom i crvenom dijelu spektra (Slika 2). U procesu fotosinteze najveće značenje ima klorofil *a*, dok su klorofil *b* i karotenoidi pomoćni fotosintetski pigmenti. Oni mogu apsorbirati svjetlost i prenositi energiju na klorofil *a*, koji tada djeluje kao da je sam apsorbirao foton.



Slika 2. Apsorpcijski spektar klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida. Maksimumi apsorpcije klorofila *a* su pri 430 nm i 662 nm, klorofila *b* pri valnim duljinama 453 nm i 642 nm a karotenoidi imaju apsorpcijski maksimum pri valnim duljinama između 380 i 550 nm. (<http://thesolarpowerexpert.com/>)

Strukturu klorofila čine četiri pirolova prstena povezana u prstenasti porfirinski sustav u čijem se središtu nalazi metal magnezij (Mg^{2+}). Prstenasta struktura sadrži labavo vezane elektrone i to je dio molekule koji sudjeluje u prijenosu elektrona i redoks-reakcijama. Za pirolov prsten br. IV porfirinskog sustava vezan je fitol. To je terpenoid koji se sastoji od četiri izoprenske jedinice i kao takav je vrlo hidrofoban i odgovoran za interakciju klorofila s tilakoidnim membranama. Klorofili *a* i *b* se međusobno razlikuju po skupinama vezanima na pirolov prsten br. II. Klorofil *a* na tom prstenu ima metilnu skupinu, a klorofil *b* aldehidnu skupinu (Slika 3) (Pevalek- Kozlina, 2003).



Slika 3. Struktura klorofila *a* i klorofila *b* (<http://blog.unila.ac.id/>)

Karotenoidi su linearne molekule ugljikovodika s brojnim konjugiranim dvostrukim vezama. Osim uloge pomoćnih pigmenata, imaju i važnu zaštitnu ulogu jer «gase» pobuđeno stanje klorofila i tako sprečavaju nastajanje singletnog kisika koji je vrlo reaktivan i može oštetiti mnoge stanične sastojke. Pobuđeno stanje karotenoida nema dovoljno energije za nastanak singletnog kisika te se vraća u osnovno stanje, oslobađajući višak energije u obliku topline (Mohr i Schopfer, 1995).

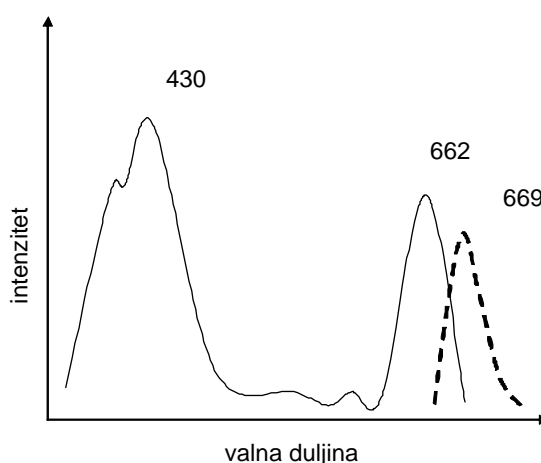
Fotosintetski pigmenti unutar tilakoidnih membrana vezani su na proteinske komplekse, PSI i PSII. Fotosistemi se sastoje od antenskog kompleksa u kojem se nalaze pigmenti i od reakcijskog središta u kojem je smješten klorofil *a* te od primarnog akceptora elektrona. PSI naziva se i P700 jer mu je apsorpcijski maksimum u tamnocrvenom području spektra pri valnoj duljini 700 nm, a PSII se naziva P680 jer mu je apsorpcijski maksimum u crvenom području spektra pri valnoj duljini 680 nm. PSI se uglavnom nalazi u stroma - tilakoidima i na rubovima grana-tilakoida, dok se PSII većinom nalazi u nakupinama tilakoida koji čine granum. Oni su međusobno kemijski i fizički odvojeni, a povezani su transportnim lancem elektrona (Pevalek- Kozlina, 2003).

1.4.1. Fluorescencija klorofila *a*

U ovom istraživanju mjerila sam fluorescenciju klorofila *a* kako bih istražila utjecaj različitih uvjeta osvjetljenja i koncentracija saharoze u podlozi na fotosintezu. Mjerenje fluorescencije se provodi uređajima koji se nazivaju fluorometri (Maxwell i Johnson, 2000). U području fiziologije i ekofiziologije bilja primjenjuje se nekoliko metoda mjerenja fluorescencije, a jedna od njih je metoda saturacijskog pulsa koju sam i ja koristila. Na temelju dobivenih rezultata mogu se izvesti zaključci o fiziološkom stanju fotosintetskog aparata. Promjene u fluorescenciji klorofila nakon osvjetljenja biljaka prilagođenih na tamu su prvi promatrali Kautsky i Hirsch (1931) (Goltseva i sur., 2003).

Apsorpcijom svjetlosti molekula klorofila prelazi iz osnovnog u pobuđeno stanje, a elektron prelazi na višu energetska razinu. Taj elektron ne može dugo ostati u pobuđenom stanju koje je izrazito nestabilno. U tom kratkom vremenu pobuđeni elektron gubi dio svoje energije pa zbog toga emitirana svjetlost uvijek ima nešto veću valnu duljinu (manju energiju) od apsorbirane svjetlosti. Pri povratku elektrona u osnovno stanje oslobađa se foton svjetlosti. Ta pojava se zove fluorescencija (Pevalek-Kozlina, 2003).

U optimalnim okolišnim uvjetima se najveći dio energije koju apsorbira molekula klorofila (oko 95%) koristi za fotokemijske reakcije fotosinteze. Od ukupne apsorbirane svjetlosti 1 do 2% energije se oslobađa u obliku fluorescencije a tek manji dio u obliku topline. Fluorescencijski spektar klorofila ima maksimum u crvenom području, pri nešto većoj valnoj duljini od maksimuma apsorpcijskog spektra klorofila (Slika 4).



Slika 4. Apsorpcijski spektar klorofila *a* (—) i spektar svjetlosti oslobodene fluorescencijom (----) (Regula i sur., 2006).

Od nekoliko načina oslobađanja apsorbirane svjetlosne energije dominirat će najbrži proces. Kod većine pigmenata u fotosintetskom aparatu fluorescencija se događa u nanosekundama ali se fotokemijske reakcije odvijaju brže, u pikosekundama i time će se vrlo malo energije osloboditi fluorescencijom, a učinkovitost fotosinteze će biti velika. Kod mjerenja fluorescencije koristi se jači intenzitet svjetlosti pa se ne može iskoristiti sva apsorbirana svjetlosna energija jer se brzo smanjuje broj slobodnih akceptora elektrona u primarnim reakcijama fotosinteze i tako se veći dio apsorbirane svjetlosne energije oslobađa u obliku fluorescencije (Mohr i Schopfer, 1995). Većina svjetlosne energije oslobodene fluorescencijom u intaktnim listovima potječe s fotosistema II (PSII) pa nam tako izmjerena fluorescencija daje informacije o stanju PSII. U lancu prijenosa

elektrona u tilakoidnim membranama PSII predaje elektrone molekulama plastokinona. Pri niskom intenzitetu svjetlosti molekule plastokinona su oksidirane i mogu primiti elektrone. Pritom se ekscitacijska energija s učinkovitošću većom od 95% troši na fotokemijske reakcije a intenzitet fluorescencije je vrlo nizak. Pri jačem intenzitetu osvjetljenja molekule plastokinona se reduciraju i da bi ponovo mogle primiti elektrone s PSII trebale bi se reoksidirati. U tim uvjetima ne može se iskoristiti sva apsorbirana svjetlosna energija pa se dio oslobađa u obliku fluorescencije. Nakon što se ustali stopa prijenosa elektrona kao i dinamika odvijanja Calvinovog ciklusa, dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije, tzv. gašenja fluorescencije („quenching“). Postoje dva tipa gašenja fluorescencije: fotokemijsko i nefotokemijsko gašenje. Fotokemijsko gašenje („photochemical quenching“) je pojava smanjenja intenziteta fluorescencije kada je većina akceptora elektrona oksidirana, tj. sposobna za primanje elektrona. Nefotokemijsko gašenje („nonphotochemical quenching“) je značajna u uvjetima visokih intenziteta osvjetljenja kada se apsorbirana energija ne može upotrijebiti za fotokemijske reakcije pa se oslobađa u obliku topline (Maxwell i Johnson, 2000).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj rada je bio istražiti učinak različitih uvjeta osvjetljenja te različitih koncentracija saharoze u hranjivoj podlozi na rast i fotosintezu vodene leće. U tu svrhu sam provela modificirani Lemna-test u sklopu kojega sam pratila prirast broja biljaka te učinkovitost fotosinteze mjerenjem fluorescencije klorofila. Kako bih istražila ovisnost kvalitete i intenziteta svjetlosti, dio biljaka je izložen osvjetljenju iz izvora svjetlosti „Cool White“ (Sylvania) $\text{PFD} = 38\text{-}40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a preostali dio biljaka osvjetljenju iz izvora svjetlosti GroLux (Sylvania) $\text{PFD} = 55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Osim po intenzitetu svjetlosti, ova dva izvora svjetlosti razlikuju se i po udjelu crvenog i plavog dijela spektra pri čemu GroLux ima veći udio plavog i crvenog dijela spektra. Za istraživanje učinka osmotske vrijednosti, u hranjivu podlogu po Pirsonu i Seidelu dodala sam saharozu u tri različite koncentracije: 5,0 g/L, 7,5 g/L i 10,0 g/L.

3. MATERIJIJAL I METODE

3.1 BILJNI MATERIJAL

Vodena leća *Lemna minor* L. je sakupljena u Botaničkom vrtu Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prilikom uvođenja u kulturu *in vitro* biljke su sterilizirane etanolom i živinim kloridom (Krajncić i Devidé, 1980). Dobivena aksenična kultura vodene leće već se niz godina održava u klima-komori u Botaničkom zavodu PMF-a.

3.1.1. Hranjiva podloga za održavanje kulture vodene leće u uvjetima *in vitro*

Za održavanje i razmnožavanje vodene leće (*L. minor* L.) u kulturi u uvjetima *in vitro* koristila sam hranjivu podlogu priređenu po uputama Pirsona i Seidela (PS) (Pirson i Seidel 1950; Tablica 1). pH vrijednost hranjive podloge sam podesila na 4,55 dodavanjem 0,1 M otopine kalijeva hidroksida. Biljke sam presađivala na svježije pripremljene hranjive podloge svakih 20 dana.

Za održavanje kulture rabila sam Erlenmayerove tikvice volumena 300 mL koje sam punila s oko 150 mL hranjive podloge. Tikvice sam zatim začepila vatom i aluminijskom folijom te ih sterilizirala autoklaviranjem pri temperaturi od 124 °C i tlaku od 0,15 MPa u trajanju od 18 minuta. Metalni i ostali pribor također sam sterilizirala autoklaviranjem. Pri presađivanju biljaka metalni pribor (ezu i pincetu) sam dodatno sterilizirala uranjanjem u 96%-tni etanol i spaljivanjem. Biljke sam nakon presađivanja u laminaru (komori s horizontalnim strujanjem zraka) prenijela u klima komoru, gdje su rasle u uvjetima dugog dana (16 sati osvjetljenja i 8 sati tame) pri temperaturi $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Pri održavanju kultura korišteno je osvjetljenje „Cool White”(CW) izvora svjetlosti (Sylvania) koje je davalo gustoću fotona (PFD – photon flux density) od 38 do 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ na razini biljaka.

Tablica 1. Sastav hranjive podloge po Pirsonu i Seidelu (PS)

Makroelementi	mg/L	mmol/L
KNO ₃	400	3,95
KH ₂ PO ₄	200	1,47
MgSO ₄ ×7H ₂ O	300	1,21
CaCl ₂ ×2H ₂ O	804	5,46
Mikroelementi	mg/L	mmol/L
MnCl ₂ ×4H ₂ O	0,3	0,0015
H ₃ BO ₃	0,5	0,0081
Na ₂ -EDTA×2H ₂ O	18,6	0,049
Željezni citrat	5,0	0,02
Organski dodaci	g/L	mmol/L
Saharoza	10,0	29,2
Asparagin	0,1	0,66

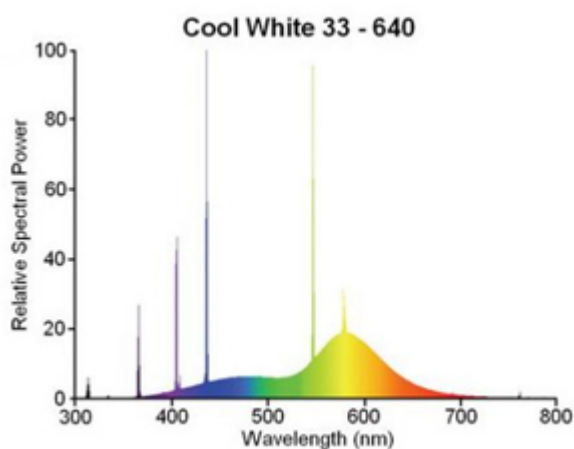
3.1.2. Hranjiva podloga za istraživanje osmotskog učinka i učinka tipa osvjetljenja

Za istraživanje učinka osmotske vrijednosti hranjive podloge na vodenu leću koristila sam hranjivu podlogu po Pirsonu i Seidelu (PS) u koju sam dodavala saharozu u tri različite koncentracije: 5,0 g/L, 7,5 g/L i 10,0 g/L.

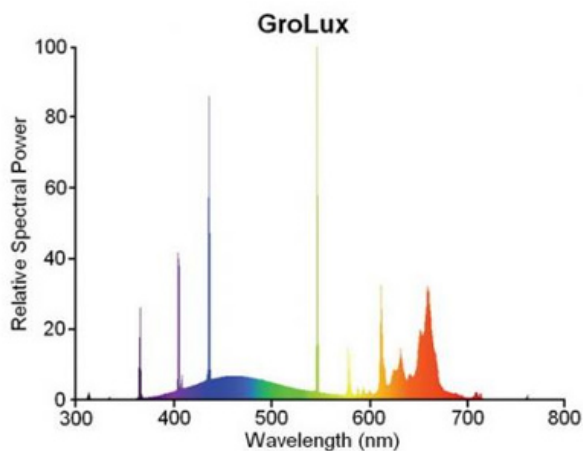
Za istraživanje učinka osvjetljenja, dio biljaka na PS podlogama s različitim osmotskim vrijednostima izložen je osvjetljenju Cool White (PFD = 38-40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a preostali dio biljaka osvjetljenju GroLux (GL) (Sylvania) (PFD = 55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Emisijski spektri izvora svjetlosti CW i GL prikazani su slikama 5 i 6. Iz emisijskih

spektara vidljivo je da GL snažnije emitira u plavom i crvenom dijelu spektra, gdje se nalaze maksimumi apsorpcije fotosintetkih pigmenata.

U pokusima sam koristila Erlenmayerove tikvice volumena 100 mL koje sam punila s oko 60 mL hranjive podloge. U svaku tikvicu nasadila sam po jednu koloniju vodene leće s 1-4 listića. Nakon nasadivanja u laminaru, biljke sam prenijela u klima komoru, gdje su 16 dana rasle u uvjetima dugog dana (16 sati osvjetljenja i 8 sati tame) pri temperaturi 24 ± 2 °C.



Slika 5. Emisijni spektar izvora svjetlosti Cool White (CW) (<http://vitawater.ru/>)



Slika 6. Emisijni spektar izvora svjetlosti GroLux (GL) (<http://vitawater.ru/>)

3.2. METODE

U okviru ovog istraživanja pratila sam rast biljaka i mjerila učinkovitost fotosinteze metodom fluorescencije klorofila.

3.2.1. Lemna-test

Za razliku od standardiziranog Lemna-testa u kojem se prati rast vodene leće na hranjivoj podlozi po Steinbergu 7 dana (ISO/CD 20079), u ovom istraživanju sam pratila rast na podlozi po Pirsonu i Seidlu 16 dana. Primjenom tog modificiranog Lemna-testa odredila sam stopu rasta i vrijeme udvostučenja broja biljaka pri različitim uvjetima osvjetljenja tijekom 16 dana uzgoja na hranjivoj podlozi po Pirsonu i Seidlu uz dodatak različitih koncentracija saharoze.

Relativna stopa rasta biljaka (RGR)

Stopu rasta biljaka određivala sam na temelju broja biljaka. Kako bi test bio valjan, prema preporuci ISO standarda (ISO/CD 20079), stopa prirasta broja biljaka mora biti veća od 0.275 d^{-1} , što znači da tijekom 7 dana uzgoja mora doći do sedmerostrukog povećanja broja biljaka. Relativnu stopu rasta biljaka (RGR – relative growth rate) odredila sam brojeći biljke tijekom 16 dana pokusa. Brojena je svaka biljka vidljiva golim okom. Dobivene podatke sam uvrstila u sljedeći izraz :

$$\text{RGR} = \frac{\ln(N_n) - \ln(N_0)}{n}$$

N_n = broj biljaka n-tog dana

N_0 = broj biljaka na početku pokusa (dan nasađivanja)

n = 2, 5, 7, 9, 12, 14 i 16

Svaki tretman istražen je na 20 replika (po 10 replika u 2 nezavisna pokusa).

Vrijeme udvostručenja broja biljaka (Td)

Kako bi test bio valjan prema ISO standardu, vrijeme udvostručenja broja biljaka tijekom 7 dana uzgoja mora iznositi $\leq 2,5$ dana (60 sati), što također odgovara sedmerostrukom povećanju broja biljaka tijekom 7 dana. Vrijeme udvostručenja (Td - doubling time) sam određivala prema sljedećem izrazu:

$$Td = \ln 2 / RGR$$

ln – prirodni logaritam baze 2

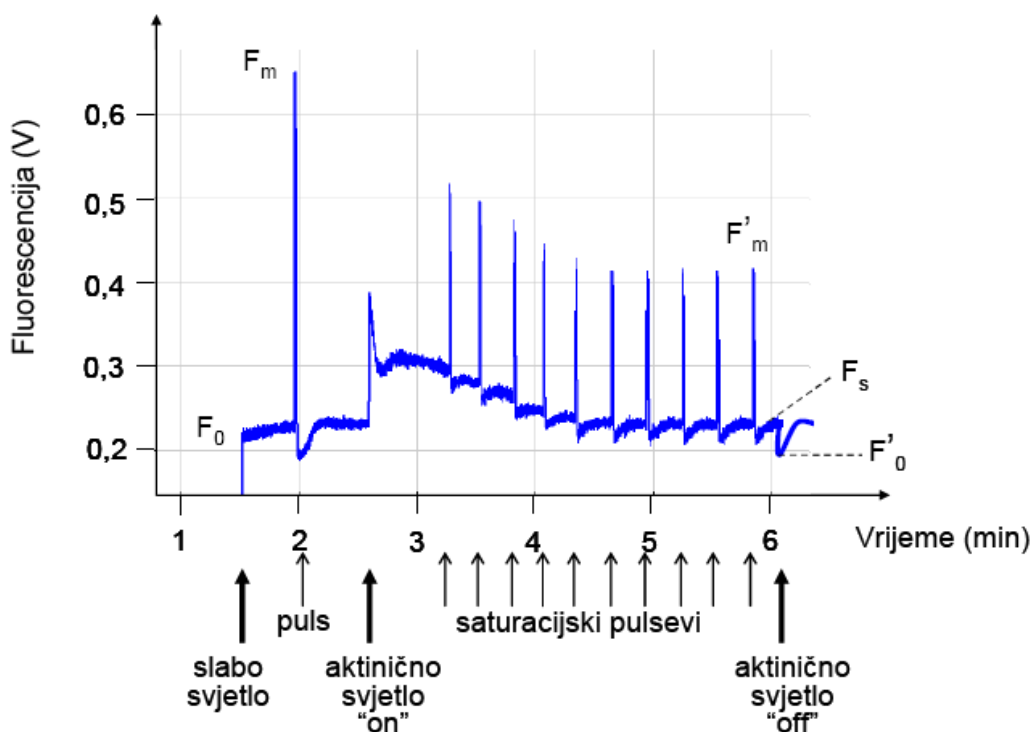
RGR – relativna stopa rasta

Svaki tretman istražen je na 20 replika (po 10 replika u 2 nezavisna pokusa).

3.2.2. Mjerenje fluorescencije klorofila *a*

Fluorescenciju klorofila *a* u uvjetima *in vivo* mjerila sam sedmi i šesnaesti dan pokusa metodom saturacijskog pulsa pomoću Qubit sustava za mjerenje fluorescencije (Kanada). Za obradu podataka sam koristila program Logger Pro. Ukupno sam imala 24 replike po tretmanu (po 12 replika u 2 nezavisna pokusa). Na svakoj replici provela sam dva mjerenja. Biljke sam prije mjerenja držala u tami (30 min) da bi se plastokinon u tilakoidnoj membrani u potpunosti oksidirao jer tada svi reakcijski centri plastokinona mogu primiti elektrone. Listiće biljke prilagođene uvjetima tame postavila sam na držač uzorka te osvijetlila crvenom svjetlošću niskog intenziteta ($PFD \approx 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nedovoljnog za pokretanje fotokemijskih reakcija, ali dovoljnog za povećanje brzine prijenosa elektrona kroz fotosintetski aparat. Nakon što sam očitala minimalnu fluorescenciju lista prilagođenog na uvjete tame (F_0), primijenila sam jednokratni saturacijski puls ($\approx 3760 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) uslijed čega je došlo do „zatvaranja“ tj. redukcije reakcijskih centara fotosistema II i do pojave maksimalne vrijednosti fluorescencije (F_m). Nakon toga sam uključila kontinuiranu bijelu aktiničnu svjetlost čiji je intenzitet dovoljno visok za pokretanje fotosinteze. Kad se signal fluorescencije ustalio, uključila sam

automatsku kontrolu saturacijskih pulseva ($\text{PFD} \approx 3600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $v \approx 40 \text{ sek}$). Opetovana primjena saturacijskih pulseva prouzročila je pad maksimalne razine fluorescencije (F'_m). Vrijednosti maksimalne fluorescencije (F'_m) i fluorescencije ravnotežnog stanja (F_s) očitane su tek pri kraju mjerenja, kada se vrijednost maksimalne vrijednosti fluorescencije (F'_m) ustalila. Na samom kraju mjerenja, ugasila sam aktinično bijelo osvjetljenje pri čemu je biljka ostala osvjetljena samo crvenim osvjetljenjem niskog intenziteta. U takvim uvjetima očitala sam minimalnu razinu fluorescencije u listu prilagođene uvjetima svjetla (F_0') (Regula i sur. 2006). Tijek mjerenja fluorescencije klorofila *a* prikazan je na Slici 7.



Slika 7. Mjerenje fluorescencije klorofila metodom saturacijskog pulsa
(Regula i sur., 2006)

Iz očitanih vrijednosti odredila sam sljedeće parametre:

1. Optimalni prinos PSII

Razlika između maksimalne (F_m) i minimalne fluorescencije (F_0) u listu prilagođenom tami naziva se varijabilnom fluorescencijom (F_v). Optimalni prinos PSII (maksimalna učinkovitost PSII ili F_v/F_m) predstavlja omjer varijabilne i maksimalne fluorescencije u listu prilagođenoj na uvjete tame, kada su svi reakcijski centri otvoreni. Optimalni prinos PSII koristi se kao pokazatelj učinkovitosti fotosinteze biljaka te za većinu biljnih vrsta iznosi oko 0,83 (Maxwell i Johnson, 2000). Računa se prema sljedećem izrazu:

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

F_v = varijabilna fluorescencija
 F_m = maksimalna fluorescencija
 F_0 = minimalna fluorescencija

2. Efektivna učinkovitost PSII (Φ_{PSII}):

Fluorescencija ravnotežnog stanja (F_s) je prinos fluorescencije u listu prilagođenom određenom intenzitetu svjetlosti. Maksimalna fluorescencija (F'_m) mjeri se nakon primjene saturacijskog pulsa svjetlosti u listu prilagođenom uvjetima svjetla. Iz ovih podataka računa se efektivna učinkovitost PSII (Φ_{PSII}). Efektivna učinkovitost PSII (Φ_{PSI}) daje informaciju o udjelu fotona apsorbiranih klorofilom vezanim uz PSII koji su iskorišteni u fotokemijskim reakcijama (Maxwell i Johnson, 2000). Računa se prema sljedećem izrazu:

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

F'_m = maksimalna fluorescencija
 F_s = fluorescencija ravnotežnog stanja

3. Fotokemijsko gašenje (qP):

Fotokemijsko gašenje (qP) odražava redoks-stanje primarnog akceptora elektrona PSII (plastokinona), tj. pokazatelj je udjela otvorenih centara u fotosistemu II, a računa se prema sljedećem izrazu:

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

4. Nefotokemijsko gašenje (NPQ):

Nefotokemijsko gašenje (NPQ) predstavlja gubitak energije u obliku topline koji se računa prema sljedećem izrazu:

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

5. Stopa prijenosa elektrona (ETR - electron transport rate):

Budući da Φ_{PSII} predstavlja efektivnu učinkovitost fotokemijske reakcije na PSII, ta se vrijednost može koristiti za izračun stope necikličkog prijenosa elektrona. Vrijednost PFD („photon flux density”) je izražena u jedinicama $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a faktor 0,5 uzima se zbog pretpostavke o podjednakoj ekscitaciji PSI i PSII.

Stopa necikličkog prijenosa elektrona (ETR - electron transport rate) računa se prema izrazu:

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

PFD - intenzitet osvjetljenja ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Φ_{PSII} - efektivna učinkovitost PSII

0,5 - faktor koji se uzima zbog pretpostavke o podjednakoj ekscitaciji PS I i PS II

3.3. STATISTIČKA ANALIZA

Svaki prikazani rezultat aritmetička je sredina 24 replika dobivenih iz dva nezavisna pokusa (po 12 replika u svakom od 2 nezavisna pokusa) Odstupanje od aritmetičke sredine izraženo je kao standardna pogreška. Usporedba dobivenih rezultata provedena je analizom varijance (one-way ANOVA), te uporabom Newman-Keuls testa pomoću računalnog programa STATISTICA 7.0 (Stat Soft Inc., SAD). Statistički značajnim smatrala sam rezultate koji su se razlikovali na razini $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. LEMNA TEST

U okviru Lemna testa pratila sam stopu rasta na temelju broja biljaka i vrijeme udvostručenja broja biljaka.

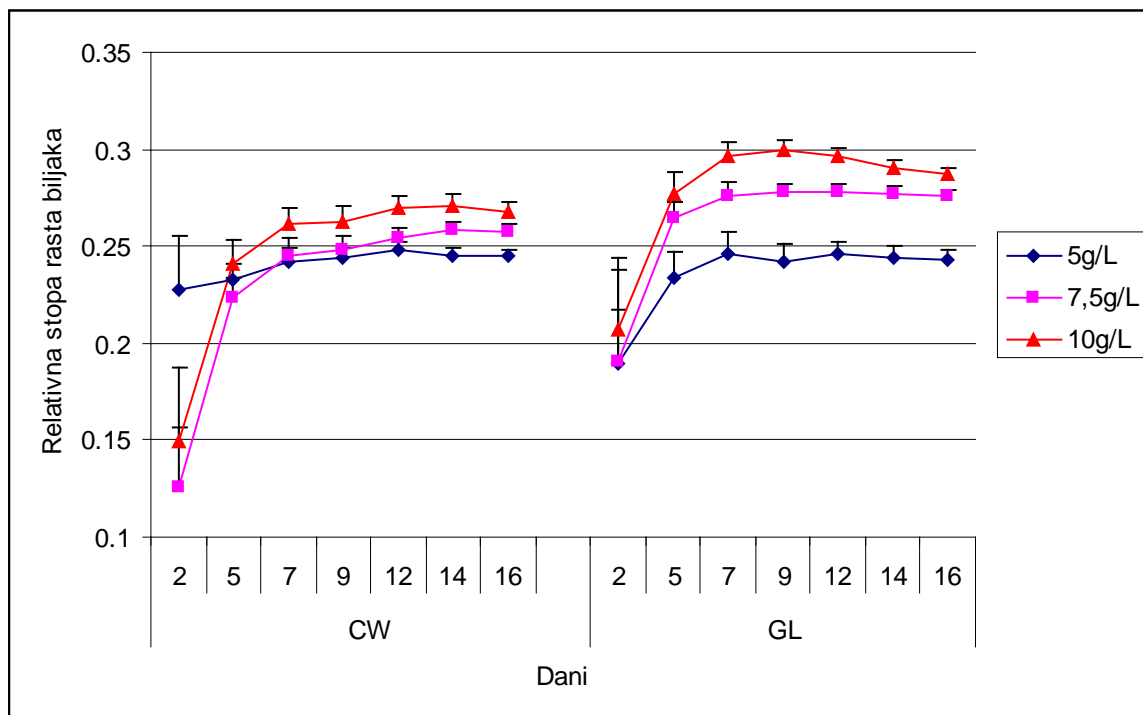
4.1.1. Relativna stopa rasta (RGR)

Kod svih primjenjenih tretmana primijećen je eksponencijalni porast broja biljaka vodene leće. Stopa rasta broja biljaka bila je veća na podlogama s višom koncentracijom saharoze u hranjivoj podlozi, s tim da su u biljaka osvijetljenih s izvorom svjetlosti GL zabilježene više vrijednosti stope rasta biljaka nego u onih osvijetljenih s izvorom svjetlosti CW.

Biljke osvijetljene svjetlošću GL pokazuju statistički značajan porast stope rasta na podlozi sa 7,5 g/L saharoze počevši sa sedmim danom pokusa, odnosno na podlozi s dodatkom 10 g/L saharoze počevši petim danom pokusa. U biljaka osvijetljenih izvorima svjetlosti CW značajan porast stope rasta u odnosu na druge tretmane zamijećen je samo u biljaka uzgojenih na najvišoj koncentraciji saharoze počevši s 12. danom pokusa (Slika 8, Tablica 2).

4.1.2. Vrijeme udvostručenja broja biljaka (Td)

Vrijeme udvostručenja broja biljaka određeno je nakon 2, 5, 7, 9, 12, 14 i 16 dana pokusa. U Tablici 3 je prikazano Td, izračunato na temelju srednje vrijednosti RGR-a za sedmi dan pokusa. Rezultati su pokazali da vrijeme udvostručenja raste s padom koncentracije saharoze u hranjivoj podlozi. Osim toga, vrijeme udvostručenja broja biljaka veće je u biljaka koje su rasle pod osvijetljenjem CW lampi.



Slika 8. Relativna stopa rasta biljaka uzgajanih na hranjivoj podlozi po Pirsonu i Seidlu tijekom 16 dana pri različitim koncentracijama saharoze (5,0 g/L, 7,5 g/L, 10 g/L) i različitim osvjetljenjima - „Cool White“ (CW), PFD $\approx 38\text{-}40$ fotona $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i „GroLux“ (GL), PFD ≈ 55 fotona $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Rezultati statističke obrade podataka su prikazani u Tablici 2.

Tablica 2. Statističke razlike između tretmana tijekom 16 dana za RGR. Tretmani označeni različitim slovima se značajno razlikuju ($p \leq 0,05$, Newman-Keuls test).

RGR	CW5	CW7,5	CW10	GL5	GL7,5	GL10
2	/	/	/	/	/	/
5	a	a	ab	a	ab	b
7	a	a	ab	a	bc	c
9	a	a	ab	a	b	c
12	a	a	b	a	b	c
14	a	ab	bc	a	c	d
16	a	ab	bc	a	cd	d

U biljaka osvjetljenih svjetlošću CW značajan porast stope rasta u odnosu na druge tretmane bio je od 12.dana pokusa. U biljaka osvjetljenih svjetlošću GL značajan porast stope rasta bio je sedmog dana pokusa na podlozi sa 7,5 g/L saharoze i petog dana pokusa na podlozi sa 10 g/L saharoze.

Tablica 3. Vrijeme udvostručenja biljaka (Td) izračunato na temelju srednje vrijednosti relativne stope rasta (RGR) za sedmi dan pokusa.

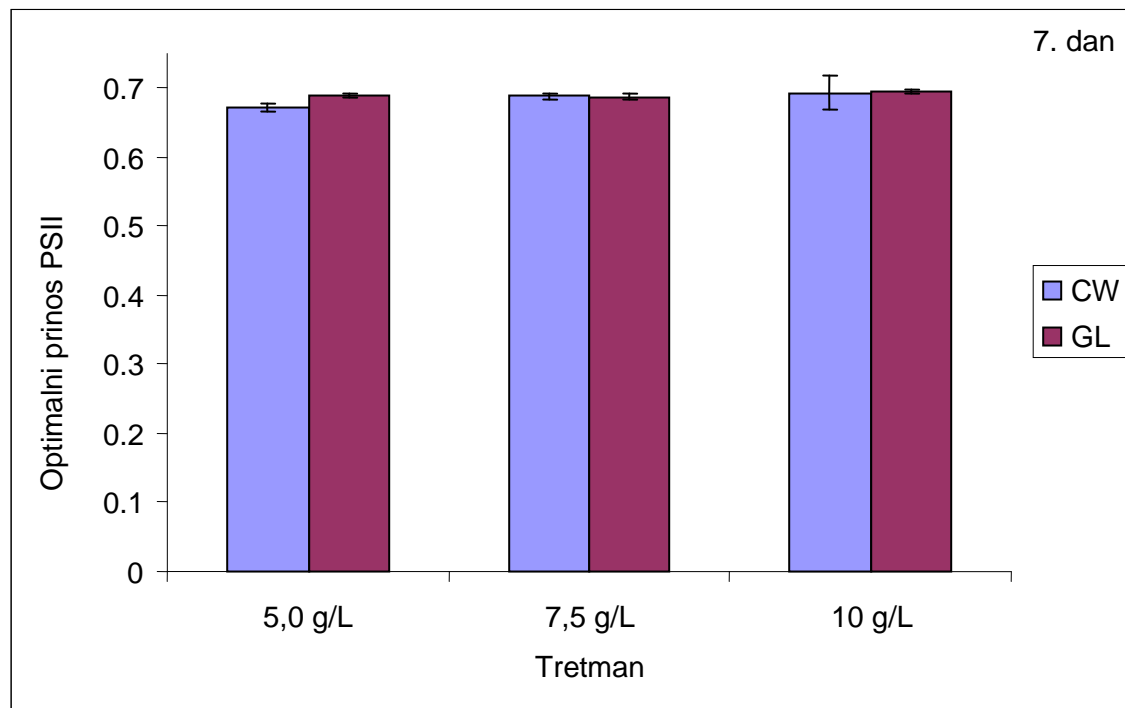
Tretmani	CW10	CW7,5	CW5	GL10	GL7,5	GL5
Td	2.65	2.82	2.86	2.33	2.51	2.82

4.2. FLUORESCENCIJA KLOROFILA

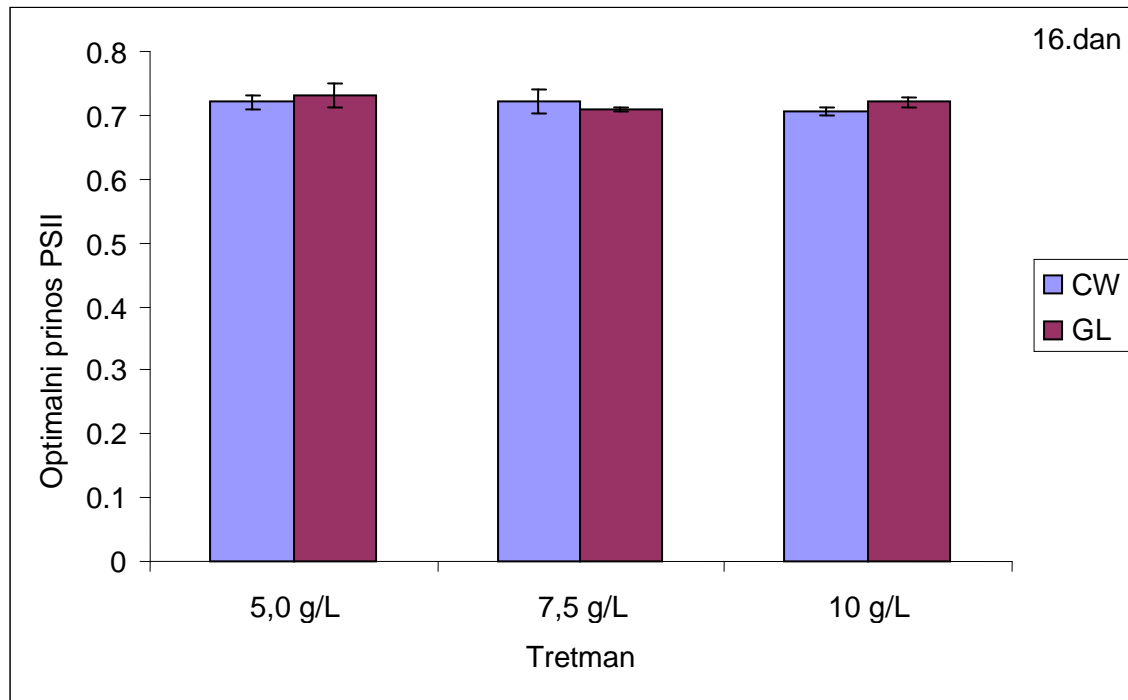
Na temelju parametara dobivenih mjerenjem fluorescencije klorofila metodom saturacijskog pulsa izračunala sam optimalni prinos fotosustava II, fotokemijsko gašenje, nefotokemijsko gašenje, efektivni prinos PSII i stopu transporta elektrona.

4.2.1. Optimalni prinos fotosistema II

Mjerenjem fluorescencije klorofila *a* metodom saturacijskog pulsa utvrdila sam da optimalni prinos PSII za sedmi dan pokusa iznosi kod izvora svjetlosti CW od 0,67 do 0,69 a kod osvjetljenja GL od 0,68 do 0,69 (Slika 9). Maksimalna vrijednost optimalnog prinosa PSII bila je u biljaka osvjetljenih s GL i uzgojenih na podlozi s 10 g/L saharoze. Šesnaestog dana pokusa optimalni prinos PSII u biljaka osvjetljenih CW svjetlom iznosio je od 0,7 do 0,72 a u biljaka osvjetljenih GL svjetlom od 0,7 do 0,73 (Slika 10). Maksimalna vrijednost optimalnog prinosa PSII bila je u biljaka osvjetljenih GL svjetlom i uzgojenih uz dodatak 5,0 g/L saharoze. Iz rezultata je vidljivo da ne postoji statistički značajna razlika obzirom na osmotsku vrijednost hranjive podloge kao ni izvor svjetlosti.



Slika 9. Optimalni prinos PSII (F_v/F_m) sedmog dana pokusa u biljaka uzgajanih na hranjivoj podlozi po Pirsonu i Seidlu tijekom 16 dana pri različitim vrijednostima saharoze (5,0 g/L, 7,5 g/L, 10 g/L) i izvoru svjetlosti „Cool White“ (CW), PFD ~ 38-40 $\mu\text{mol fotona m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i „GroLux“ (GL), PFD ~ 55 $\mu\text{mol fotona m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti od 8 replika \pm standardna devijacija.

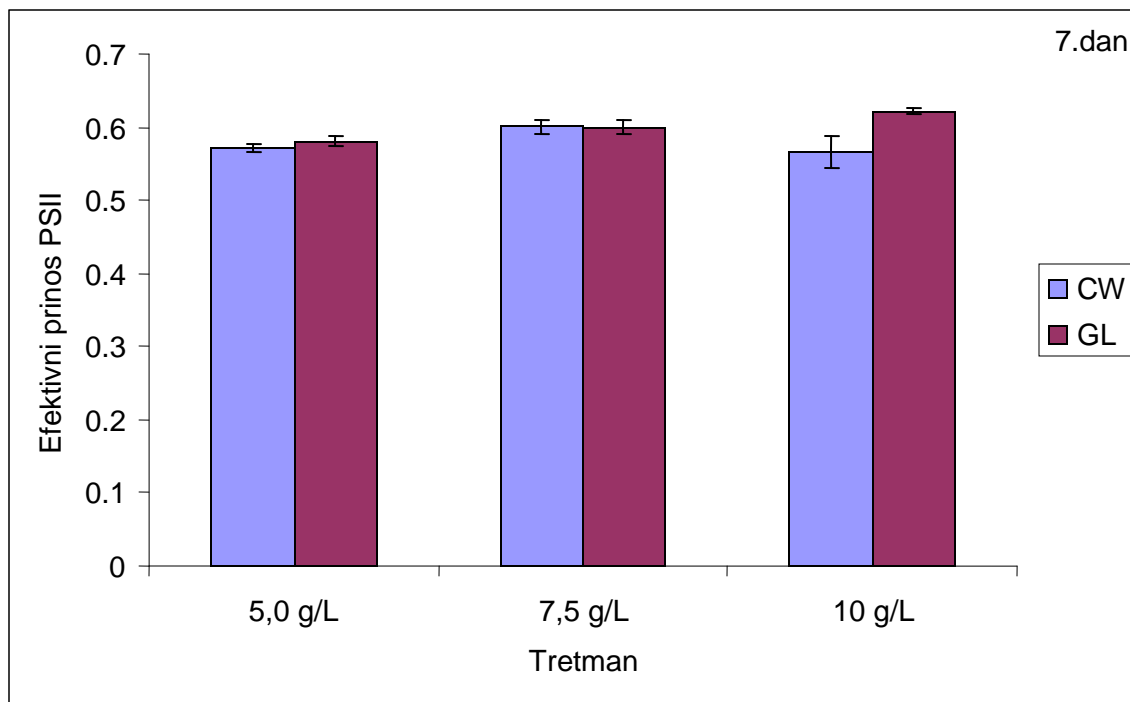


Slika 10. Optimalni prinos PSII (F_v/F_m) šesnaestog dana pokusa u biljaka uzgajanih na hranjivoj podlozi po Pirsonu i Seidlu tijekom 16 dana pri različitim vrijednostima saharoze (5,0 g/L, 7,5 g/L, 10 g/L) i izvoru svjetlosti „Cool White“ (CW), PFD ~ 38-40 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i „GroLux“ (GL), PFD ~ 55 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti od 8 replika \pm standardna devijacija.

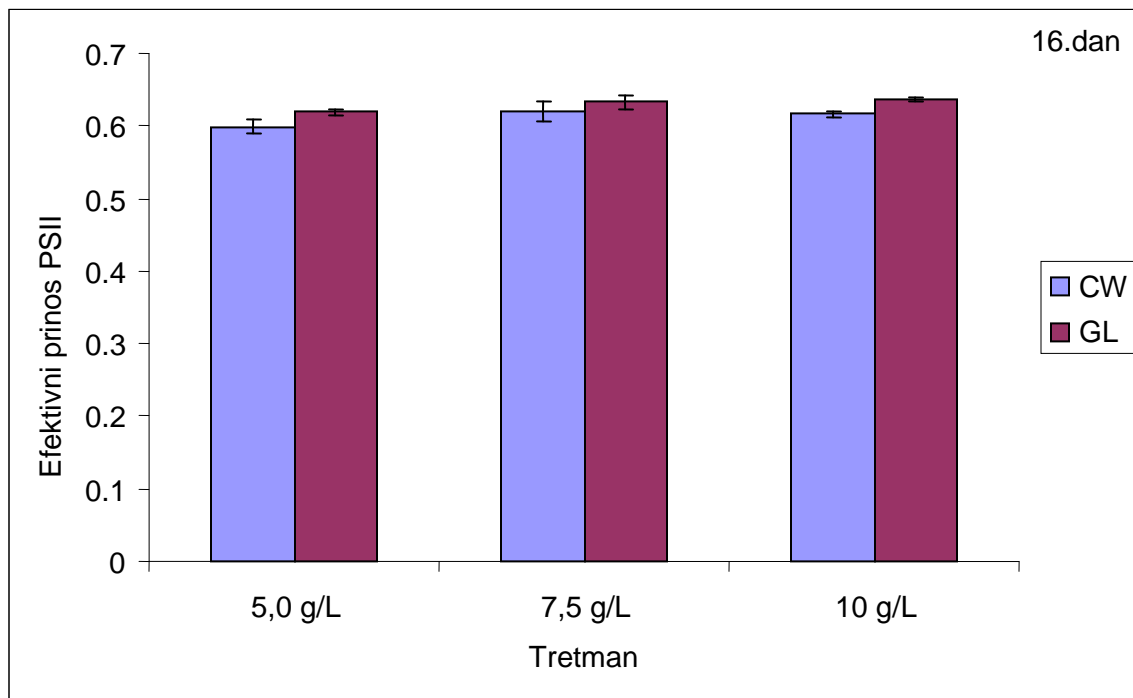
4.2.2. Efektivni prinos fotosistema II

Mjerenjem fluorescencije klorofila *a* metodom saturacijskog pulsa utvrdila sam da efektivni prinos PSII za sedmi dan pokusa iznosi kod osvjetljenja CW od 0,56 do 0,6 a kod osvjetljenja (GL) od 0,58 do 0,62 (Slika 11). Maksimalna vrijednost efektivnog prinosa PSII bila je u biljaka osvjetljenih s GL i uzgojenih na podlozi s 10 g/L saharoze. Šesnaestog dana pokusa efektivni prinos PSII u biljaka osvjetljenih svjetlom CW iznosio je od 0,59 do 0,62 a u biljaka osvjetljenih svjetlom GL od 0,61 do 0,63 (Slika 12). Maksimalna vrijednost efektivnog prinosa PSII bila je u biljaka osvjetljenih izvorom svjetlosti GL i uzgojenih uz dodatak 10 g/L saharoze. Iz rezultata je vidljivo da ne postoji

statistički značajna razlika obzirom na osmotsku vrijednost hranjive podloge kao ni izvor svjetlosti.



Slika 11. Efektivni prinos PSII sedmog dana u biljaka uzgajanih na hranjivoj podlozi po Pirsonu i Seidlu tijekom 16 dana pri različitim vrijednostima saharoze (5,0 g/L, 7,5 g/L, 10 g/L) i izvoru svjetlosti „Cool White“ (CW), PFD ~ 38-40 $\mu\text{mol fotona m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i „GroLux“ (GL), PFD ~ 55 $\mu\text{mol fotona m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti od 8 replika \pm standardna devijacija.

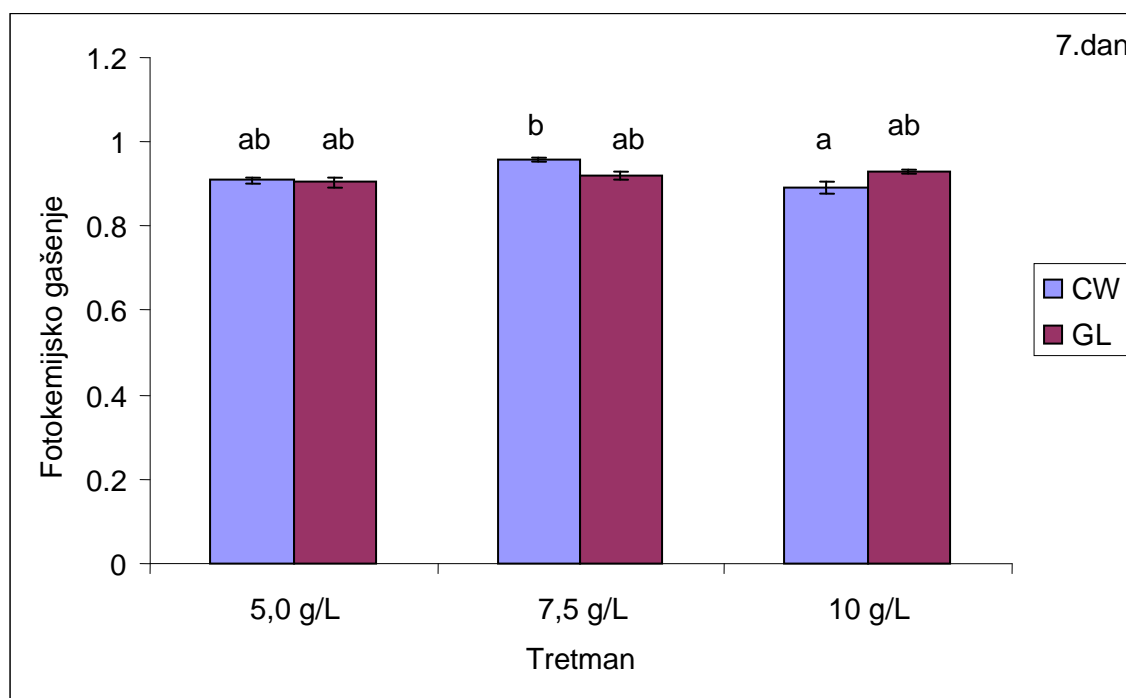


Slika 12. Efektivni prinos PSII šesnaestog dana u biljaka uzgajanih na hranjivoj podlozi po Pirsonu i Seidlu tijekom 16 dana pri različitim vrijednostima saharoze (5,0 g/L, 7,5 g/L, 10 g/L) i izvoru svjetlosti „Cool White“ (CW), PFD ~ 38-40 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i „GroLux“ (GL), PFD ~ 55 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti od 8 replika \pm standardna devijacija.

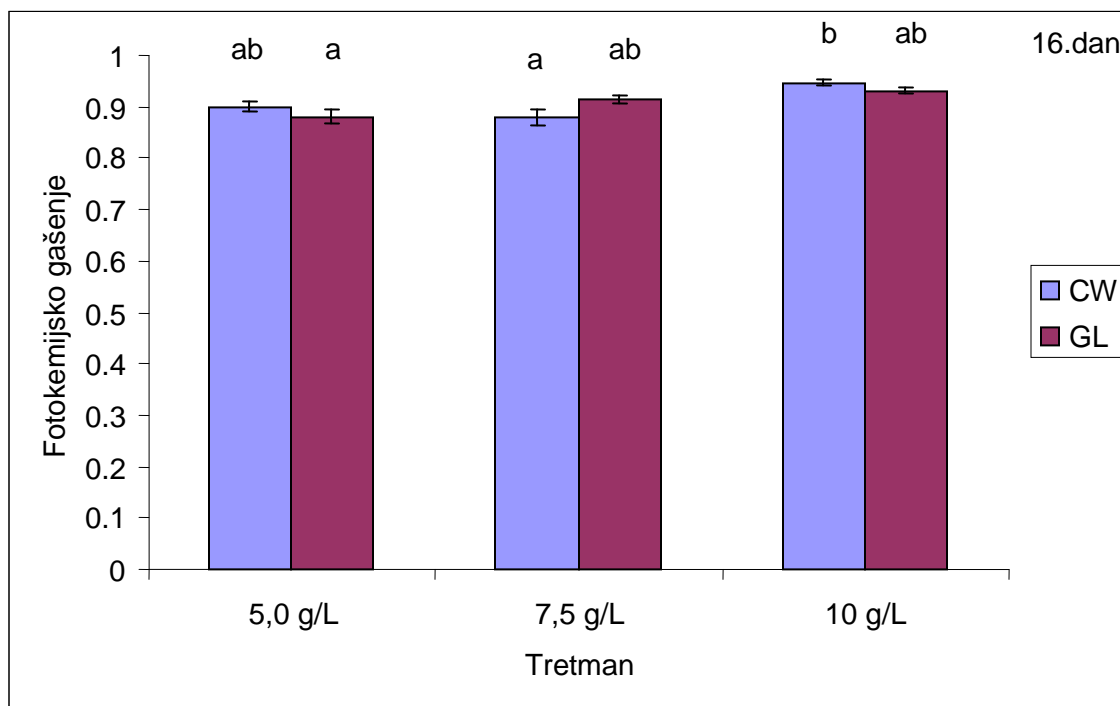
4.2.3. Fotokemijsko gašenje

Mjerenjem fluorescencije klorofila *a* metodom saturacijskog pulsa utvrdila sam da fotokemijsko gašenje za sedmi dan pokusa iznosi kod hladno bijelog izvora svjetlosti CW od 0,89 do 0,95 a kod GL od 0,9 do 0,93 (Slika 13). Maksimalna vrijednost fotokemijskog gašenja se javlja u biljaka osvjetljenih s CW i uzgojenih na podlozi sa 7,5 g/L saharoze. Statistički značajna razlika je zabilježena između biljaka osvjetljenih izvorom svjetlosti CW na podlozi sa 7,5 g/L saharoze i biljaka osvjetljenih s CW uz dodatak 10 g/L saharoze. Šesnaestog dana pokusa fotokemijsko gašenje u biljaka osvjetljenih hladnim bijelim svjetlom CW iznosilo je od 0,87 do 0,94 a u biljaka

osvjetljenih GL svjetlom od 0,88 do 0,93 (Slika 14). Statističke značajne razlike su zabilježena između biljaka osvjetljenih izvorom svjetlosti CW na podlozi sa 7,5 i 10 g/L saharoze te biljaka osvjetljenih s CW na podlozi sa 10 g/L saharoze i GL sa dodatkom 5 g/L saharoze. Maksimalna vrijednost fotokemijskog gašenja se javlja u biljaka osvjetljenih svjetlom CW i uzgojenih uz dodatak 10g/L saharoze.



Slika 13. Fotokemijsko gašenje fluorescencije (qP) sedmog dana pokusa u biljaka uzgajanih na hranjivoj podlozi po Pirsonu i Seidlu tijekom 16 dana pri različitim vrijednostima saharoze (5,0 g/L, 7,5 g/L, 10 g/L) i izvoru svjetlosti „Cool White“ (CW), PFD ~ 38-40 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i „GroLux“ (GL), PFD ~ 55 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Rezultati označeni različitim slovima se značajno razlikuju ($p \leq 0,05$, Newman Keuls test).

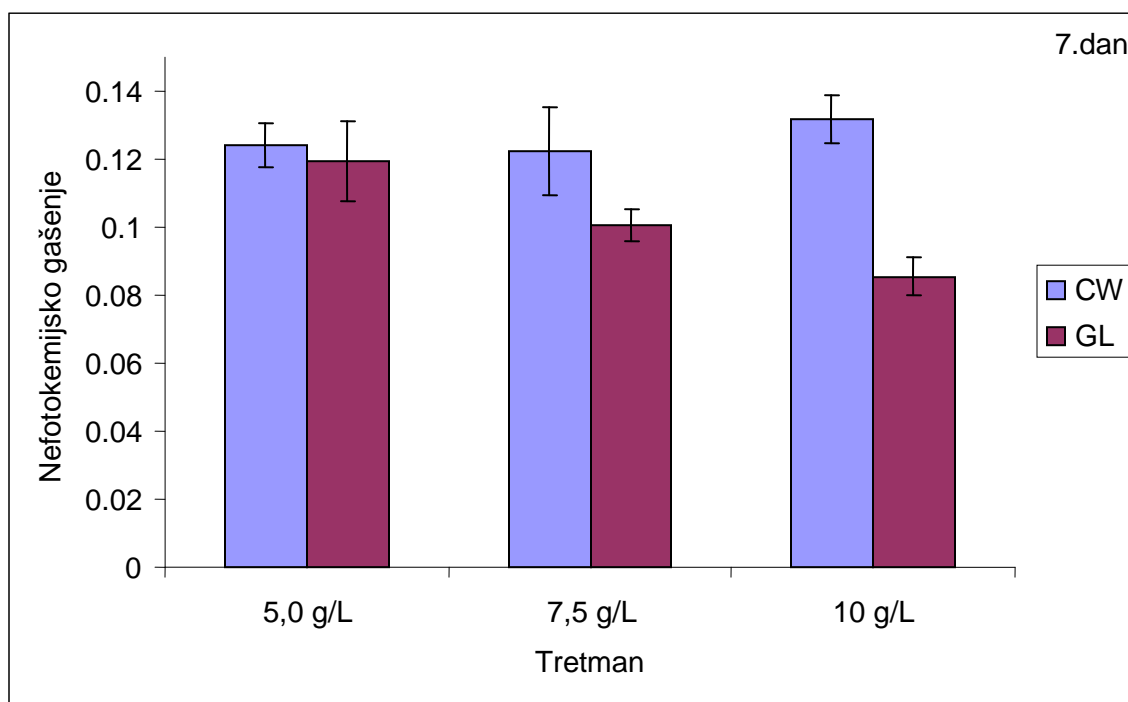


Slika 14. Fotokemijsko gašenje fluorescencije (qP) šesnaestog dana pokusa u biljaka uzgajanih na hranjivoj podlozi po Pirsonu i Seidlu tijekom 16 dana pri različitim vrijednostima saharoze (5,0 g/L, 7,5 g/L, 10 g/L) i izvoru svjetlosti „Cool White“ (CW), PFD $\sim 38\text{-}40 \mu\text{mol fotona m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i „GroLux“ (GL), PFD $\sim 55 \mu\text{mol fotona m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Rezultati označeni različitim slovima se značajno razlikuju ($p \leq 0,05$, Newman Keuls test).

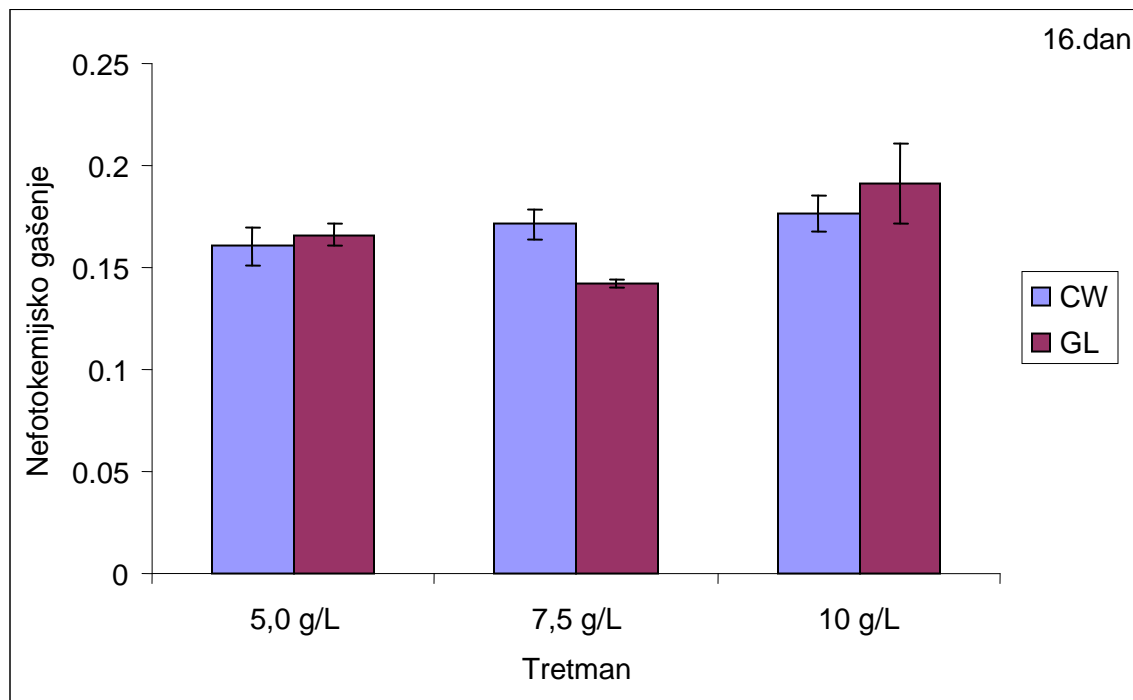
4.2.4. Nefotokemijsko gašenje

Mjerenjem fluorescencije klorofila *a* metodom saturacijskog pulsa utvrdila sam da nefotokemijsko gašenje za sedmi dan pokusa iznosi kod osvjetljenja CW od 0,12 do 0,13 a kod GL od 0,08 do 0,11 (Slika 15). Maksimalna vrijednost nefotokemijskog gašenja se javlja u biljaka osvjetljenih izvorom svjetlosti CW i uzgojenih na podlozi s 10g/L saharoze. Šesnaestog dana pokusa nefotokemijsko gašenje u biljaka osvjetljenih svjetlom CW iznosio je od 0,16 do 0,17 a u biljaka osvjetljenih GL svjetlom od 0,14 do 0,19 (Slika 16.). Maksimalna vrijednost nefotokemijskog gašenja se javlja u biljaka osvjetljenih GL

svjetlom i uzgojenih uz dodatak 10 g/L saharoze. Iz rezultata je vidljivo da ne postoji statistički značajna razlika obzirom na osmotsku vrijednost hranjive podloge kao ni izvor svjetlosti.



Slika 15. Nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ) sedmog dana pokusa u biljaka uzgajanih na hranjivoj podlozi po Pirsonu i Seidlu tijekom 16 dana pri različitim vrijednostima saharoze (5,0 g/L, 7,5 g/L, 10 g/L) i izvoru svjetlosti „Cool White“ (CW), PFD ~ 38-40 $\mu\text{mol fotona m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i „GroLux“ (GL), PFD ~ 55 $\mu\text{mol fotona m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti od 8 replika \pm standardna devijacija.

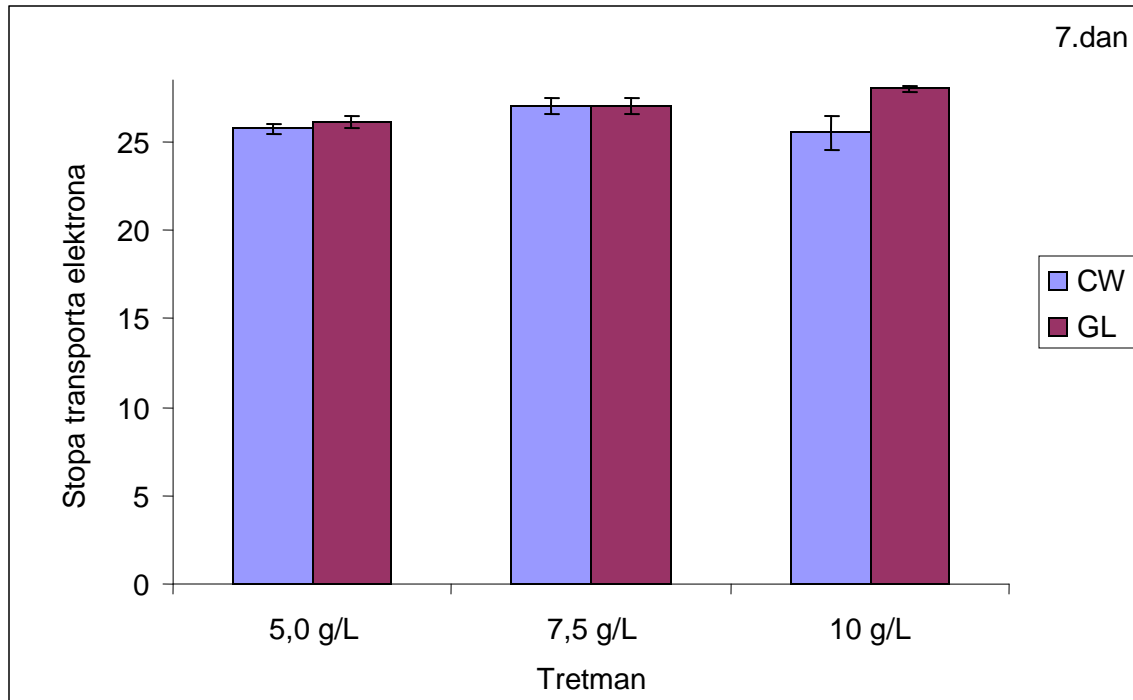


Slika 16. Nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ) šesnaestog dana pokusa u biljaka uzgajanih na hranjivoj podlozi po Pirsonu i Seidlu tijekom 16 dana pri različitim vrijednostima saharoze (5,0 g/L, 7,5 g/L, 10 g/L) i izvoru svjetlosti „Cool White“ (CW), PFD ~ 38-40 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i „GroLux“ (GL), PFD ~ 55 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti od 8 replika \pm standardna devijacija.

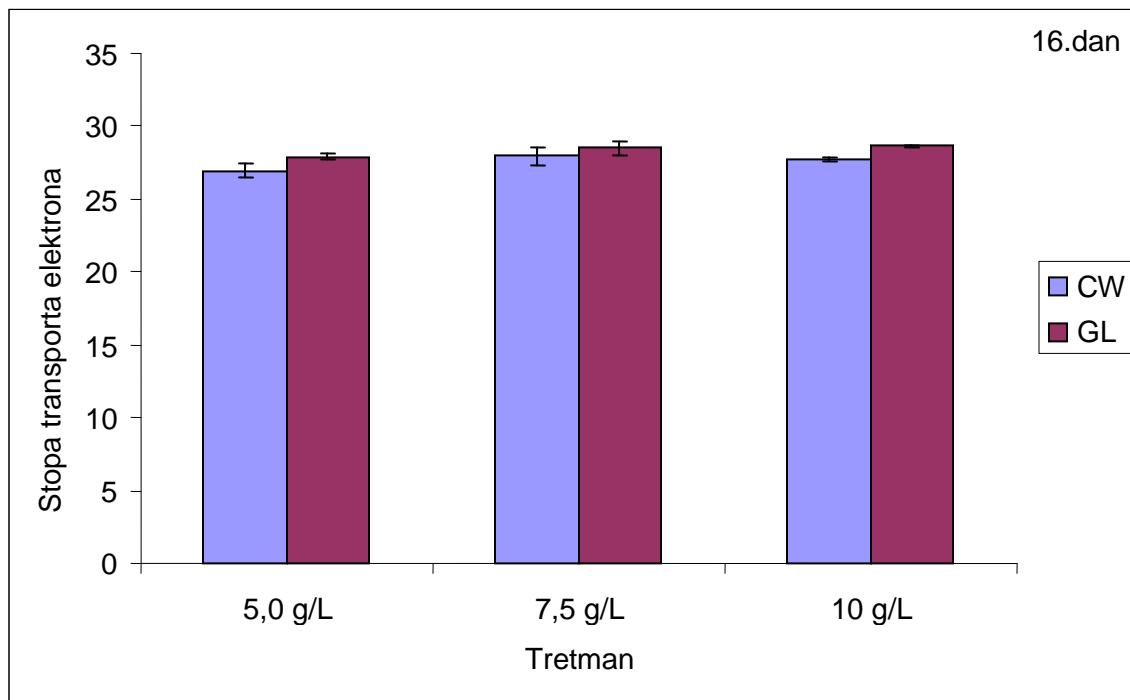
4.2.5. Stopa transporta elektrona

Mjerenjem fluorescencije klorofila *a* metodom saturacijskog pulsa utvrdila sam da stopa transporta elektrona za sedmi dan pokusa iznosi kod izvora svjetlosti CW od 25,51 do 27,01 a kod GL od 26,14 do 27,99 (Slika 17). Maksimalna vrijednost stope transporta elektrona se javlja u biljaka osvjetljenih svjetlošću GL i uzgojenih na podlozi s 10 g/L saharoze. Šesnaestog dana pokusa stopa transporta elektrona u biljaka osvjetljenih svjetlom CW iznosi od 26,96 do 27,93 a u biljaka osvjetljenih s GL od 27,89 do 28,65 (Slika 18). Maksimalna vrijednost stope transporta elektrona se javlja u biljaka osvjetljenih izvorom svjetlosti GL i uzgojenih uz dodatak 10 g/L saharoze. Iz rezultata je

vidljivo da ne postoji statistički značajna razlika obzirom na osmotsku vrijednost hranjive podloge kao ni izvor svjetlosti.



Slika 17. Relativna stopa transporta elektrona (ETR) sedmog dana u biljaka uzgajanih na hranjivoj podlozi po Pirsonu i Seidlu tijekom 16 dana pokusa pri različitim vrijednostima saharoze (5,0 g/L, 7,5 g/L, 10 g/L) i izvoru svjetlosti „Cool White“ (CW), PFD ~ 38-40 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i „GroLux“ (GL), PFD ~ 55 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti od 8 replika \pm standardna devijacija.



Slika 18. Relativna stopa transporta elektrona (ETR) šesnaestog dana pokusa u biljaka uzgajanih na hranjivoj podlozi po Pirsonu i Seidlu tijekom 16 dana pri različitim vrijednostima saharoze (5,0 g/L, 7,5 g/L, 10 g/L) i izvoru svjetlosti „Cool White“ (CW), PFD ~ 38-40 $\mu\text{mol fotona m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i „GroLux“ (GL), PFD ~ 55 $\mu\text{mol fotona m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti od 8 replika \pm standardna devijacija.

5. RASPRAVA

5.1. OVISNOST RELATIVNE STOPE RASTA O OSMOTSKOJ VRIJEDNOSTI PODLOGE I OSVJETLJENJU

Relativna stopa rasta biljaka je glavni parametar Lemna-testa zbog mogućnosti kontinuiranog praćenja tijekom pokusa. Izvedba Lemna testa po ISO standardu (ISO/CD 20079) podrazumijeva uzgoj biljaka na podlozi po Steinbergu u periodu od 7 dana tijekom kojega broj biljaka raste eksponencijalno. U ovom istraživanju Lemna-test je izveden na hranjivoj podlozi po Pirsonu i Seidelu u trajanju od 16 dana. Kako ta hranjiva podloga sadrži saharozu, asparagin te više koncentracije makro- i mikroelemenata od hranjive podloge po Steinbergu, pretpostavila sam da bi korištena hranjiva podloga mogla pogodovati produljenom eksponencijalnom rastu. Rezultati istraživanja uistinu su potvrdili eksponencijalnu stopu rasta biljaka uzgajanih na svim istraživanim tretmanima tijekom svih 16 dana pokusa.

U ovom istraživanju u podlogu po Pirsonu i Seidelu sam dodavala različite koncentracije saharoze (5; 7,5 i 10 g/L). Stopa rasta biljaka je rasla proporcionalno s povećanjem koncentracije saharoze u hranjivoj podlozi bez obzira kojem su od dva izvora svjetlosti bile izložene. U istraživanju utjecaja saharoze na rast i anatomiju lista krumpira, Mohamed i Alsdon (2009) su uočili da je saharoza poboljšala vegetativni rast biljčica krumpira proporcionalno povećanju koncentracije saharoze, na što su ukazali i rezultati ovog istraživanja. Iako saharoza djeluje stimulirajuće na rast, određene koncentracije mogu izazvati osmotski stres koji se očituje padom stope rasta biljaka (Javed i Ikram, 2008) i smanjenim rastom stanica biljke *Eleutherococcus sessiliflorus* (Shohael i sur., 2006).

Najviše vrijednosti stope rasta biljaka zabilježene su u biljaka osvjetljenih izvorom svjetlosti GL uzgojenim na podlozi s dodatkom 7,5 g/L saharoze gdje je stopa rasta iznosila $0,27 \text{ d}^{-1}$ i na podlozi s 10 g/L saharoze sa stopom rasta biljaka od $0,29 \text{ d}^{-1}$. Nakon 7 dana uzgoja jedino su ovi tretmani zadovoljili normu ISO standarda za minimalnom stopom rasta biljaka ($\geq 0,275 \text{ d}^{-1}$). Vjerojatni razlog tomu je što izvor svjetlosti GL snažnije emitira u plavom i crvenom dijelu spektra gdje se nalaze maksimumi apsorpcije

fotosintetskih pigmenata pa je prema tome i očekivan bolji rast biljaka izloženih izvoru svjetlosti GL.

Kada se govori o vremenu udvostručenja broja biljaka, ISO i OECD standard (ISO/CD 20079, OECD 2002) za valjani Lemna-test predviđaju vrijeme udvostručenja ≤ 2,5 dana, što zadovoljava jedino tretman s GL, uz dodatak 10 g/L saharoze u hranjivoj podlozi. Prema istraživanjima koje je proveo Wang (1990) vrijeme udvostručenja broja biljaka u vrste *Lemna minor* varira od 1,3 do 2,8 dana, što odgovara i rezultatima ovog istraživanja. Vrijeme udvostručenja broja biljaka smanjilo se s porastom koncentracije saharoze u hranjivoj podlozi, što ukazuje na stimulirajući učinak saharoze na rast i razmnožavanje biljaka. Također je utvrđeno produljeno vrijeme udvostručenja u biljaka osvjetljenih CW lampama, što je u skladu s rezultatima stope rasta biljaka koja je u tih biljaka bila manja nego u biljaka osvjetljenih GL lampama.

Apsolutni iznos stope rasta u biljaka koje su rasle pri osvjetljenju CW, intenziteta $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ na podlozi po Pirsonu i Seidelu iznosio je 0.27 d^{-1} . Lozić (2010) je u biljaka uzgojenih na podlozi po Steinbergu pri istim uvjetima osvjetljenja izmjerila stopu rasta biljaka od $0,18 \text{ d}^{-1}$. Pri osvjetljenju GL lampama intenziteta 40 i $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ iznosi stope rasta biljaka također su bili niži u biljaka uzgojenih na podlozi po Steinbergu (Lozić, 2010) nego u biljaka uzgojenih na podlozi po Pirsonu i Seidelu, iako je u ovom istraživanju primijenjen intenzitet niži od $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Razlog tomu najvjerojatnije je bogatija hranidbena podloga po Pirsonu i Seidelu koja osim mineralnih tvari sadrži organske dodatke saharozu i asparagin.

U ovom istraživanju pratila sam rast biljaka izloženih izvorima svjetlosti GL i CW, intenziteta $38-40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, odnosno $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, što je niže od intenziteta osvjetljenja preporučenih ISO standardom. U standardiziranom Lemna-testu preporuča se primjena osvjetljenja intenziteta od $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ do $125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (ISO/CD 20079). Usporedbom stope rasta biljaka uzgojenih pri osvjetljenju CW i GL utvrđen je bolji rast u biljaka osvjetljenih izvorom svjetlosti GL. Bez obzira na vrstu osvjetljenja, stopa rasta biljaka se povećavala s porastom intenziteta osvjetljenja. Manja stopa rasta biljaka koja je ustanovljena u biljaka koje su rasle pod osvjetljenjem CW može biti posljedica nedovoljnog intenziteta crvene svjetlosti. Slični rezultati su dobiveni u istraživanju

utjecaja različitih dijelova svjetlosnog spektra na rast dijatomeje *Cheratoceros sp.* (Sánchez-Saavedra i Voltolina, 2006) u kojem su korištene tri vrste izvora svjetlosti - CW, GL i GL širokog spektra. Autori su ustanovili da je kultura dijatomeja bolje rasla pri osvjetljenju GL zbog spektra svjetlosti koji je više odgovarao uvjetima potrebnim za fotosintezu u dijatomeja.

5.2. OVISNOST UČINKOVITOSTI FOTOSINTEZE O OSMOTSKOJ VRIJEDNOSTI PODLOGE I OSVJETLJENJU

Fotosinteza pokazuje snažnu ovisnost o količini i kvaliteti svjetlosti. Pri porastu intenziteta osvjetljenja dolazi do proporcionalnog porasta intenziteta fotosinteze. Kod određenog porasta intenziteta svjetlosti postiže se svjetlosno zasićenje i daljnji porast intenziteta svjetlosti više ne utječe na stopu fotosinteze, osim pri prejakom osvjetljenju pri čemu se oštećuje fotosintetski aparat i tako smanjuje stopa fotosinteze. Ta se pojava zove svjetlosni stres (Pevalek-Kozlina, 2003). Poznato je da *Lemna minor* L. pokazuje znakove oštećenja pri intenzitetima svjetlosti iznad 15000 luxa (iznad $278 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Landolt i Kandeler, 1987). Svjetlosni stres je dokazan i u istraživanju fluorescencije klorofila hrasta (Quiles i López, 2003). U tom istraživanju se fluorescencija klorofila koristila za istraživanje fotoinhibicije u listovima koji su rasli pri visokim intenzitetima svjetlosti. Autori su ustanovili da je efektivna učinkovitost PSII i relativna stopa transporta elektrona (ETR) niža u onih biljaka koje su rasle pod jakim intenzitetom bijele svjetlosti (300 Wm^{-2} , $\text{PAR} = 64 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nego u biljaka koje su rasle pod slabijim intenzitetom svjetlosti (13 Wm^{-2} , $\text{PAR} = 2.77 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Efektivni prinos PSII je iznosio 0,7 pri niskom intenzitetu svjetlosti, dok je pri visokom intenzitetu prinos bio smanjen za 9% (0,63). Također se qP fluorescencije smanjilo a NPQ povećalo s povećanjem intenziteta primjenjenog osvjetljenja. Tim istraživanjem je dokazano da je PSII najosjetljivije mjesto za fotoinhibiciju dok je PSI puno stabilniji u tretmanima pod jakim osvjetljenjem. Ipak, kroz dulji period jakog osvjetljenja oba su fotosistema bila fotoinhibirana. U istraživanju na reznicama ruže Dieleman i Meinen (2007) dokazali su

da je stopa fotosinteze 70% učinkovitija pri osvjetljenju intenziteta od $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nego pri intenzitetu od $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Rezultati ovog istraživanja nisu pokazali statistički značajne razlike optimalnog i efektivnog prinosa fotosinteze, NPQ i ETR obzirom na osmotsku vrijednost hranjive podloge te tip i intenzitet osvjetljenja testiranih biljaka. Iako GL lampe snažnije emitiraju u plavom i crvenom dijelu spektra njihova primjena nije promijenila rezultate u odnosu na one zabilježene u biljaka uzgojenih pod izvorom svjetlosti CW. Najvjerojatniji razlog je primjena svjetlosti preniskih intenziteta. Optimalni prinos PSII koristi se kao pokazatelj učinkovitosti fotosinteze biljaka te za većinu biljnih vrsta iznosi oko 0,83 (Maxwell i Johnson, 2000). U ovom istraživanju se ta vrijednost nakon sedmog dana pokusa kretala od 0,67 do 0,69 za biljke koje su rasle pod osvjetljenjem CW, te od 0,68 do 0,69 u biljaka uzgojenih pod osvjetljenjem GL. Nakon 16 dana pokusa, optimalan prinos PSII u biljaka osvjetljenih CW lampama iznosio je od 0,7 do 0,72, te u biljaka osvjetljenih GL lampama od 0,7 do 0,73. Smanjen optimalni prinosi PSII su vjerojatno posljedica slabog intenziteta svjetlosti koji nije bio dovoljan za optimalno odvijanje fotosinteze.

Efektivna učinkovitost daje informaciju o udjelu fotona apsorbiranih klorofilom vezanim uz PSII koji su iskorišteni u fotokemijskim reakcijama (Maxwell i Johnson, 2000). Normalne vrijednosti efektivne učinkovitosti iznose između 0,4 i 0,6 (Ritchie, 2006) što odgovara rezultatima dobivenim u ovom istraživanju. Maksimalna efektivna učinkovitost je zabilježena u biljaka uzgojenim pod osvjetljenjem GL iz čega se može zaključiti da je pod GL lampama bila bolja iskorištenost fotona i da je pod tim uvjetima efikasnost fotosinteze veća.

Nefotokemijsko gašenje (NPQ) ukazuje na rasipanje energije u obliku topline. Normalne vrijednosti za NPQ iznose od 0,4 do 0,6 (Ritchie, 2006) dok vrijednosti izmjerene u ovom istraživanju iznose između 0,08 i 0,19. Maksimalna vrijednost NPQ nakon sedam dana pokusa zabilježena je u biljaka osvjetljenih CW lampama, a nakon šesnaest dana pokusa u biljaka osvjetljenih GL lampama. Obzirom da su biljke bile izložene preniskom intenzitetu osvjetljenja nisu zabilježene statistički značajne razlike.

Stopa transporta elektrona (ETR) predstavlja relativnu količinu elektrona koji prolaze kroz PSII tijekom ravnotežnog stanja fluorescencije. Dobiveni rezultati ukazuju na nešto veći prijenos elektrona u biljaka uzgojenih pod osvjetljenjem GL lampi što se poklapa s činjenicom da GL lampe emitiraju više u plavom i crvenom dijelu spektra što bolje odgovara procesu fotosinteze.

Fotokemijsko gašenje fluorescencije (qP) odražava redoks-stanje primarnog akceptora elektrona PSII (plastokinona), te se smatra pokazateljem udjela otvorenih centara u PSII. Pri niskom intenzitetu svjetlosti molekule plastokinona su oksidirane i kao takve mogu primiti elektrone (Regula i sur., 2006). U uvjetima višeg intenziteta svjetlosti je veći udio molekula plastokinona reduciran zbog čega dolazi do povećanja fluorescencije i smanjenja vrijednosti qP (Quiles i Lopez, 2006). Osim o količini raspoloživih primarnih akceptora elektrona qP ovisi o stopi prijenosa elektrona (Frankart, 2003) i fotokemijskoj reakciji (pretvorbi svjetlosne energije u kemijsku) u reakcijskom centru PSII (Schreiber i Rienits, 1987). U mojem istraživanju qP je bio jedini parametar koji je ukazao na značajniju razliku među promatranim tretmanima. Značajno su se razlikovale biljke izložene različitim koncentracijama saharoze i izvoru svjetlosti CW. Najviša vrijednost qP je zabilježena u biljaka osvjetljenih izvorom svjetlosti CW sedmog dana kod biljaka uzgojenih na 7,5 g/L saharoze, što se slaže s činjenicom da CW ne emitira u crvenom dijelu spektra i time nije optimalna za proces fotosinteze. Ritchie (2006) je u svom radu iznio uobičajene vrijednosti qP za većinu biljaka, a čija normalna vrijednost iznosi od 0,7 do 0,8, a qP u ovom istraživanju je nešto viši od tih vrijednosti. Najvjerojatnije je intenzitet svjetlosti bio suboptimalan za normalno odvijanje fotosinteze u vodene leće. Moguće je da se fotosinteza normalno odvijala ali je isto tako moguće da je stopa fotosinteze bila malo smanjena ne samo zbog slabog intenziteta svjetlosti nego i prisutnosti šećera u podlozi. U uvjetima niskog intenziteta svjetlosti ne očekuje se pojava fotoinhibicije pa stoga niti smanjenje qP ili povećanje NPQ. Međutim, prisustvo saharoze u podlozi može dovesti do inhibicije fotosinteze zbog smanjene sinteze nekih sastavnica fotosintetskog aparata, npr. proteina D1 (Godde, 1999) i smanjene količine enzima Rubisco (Premkumar i sur., 2001). Obzirom na koncentraciju saharoze u hranjivoj podlozi, utvrđena je viša qP vrijednost u biljaka na podlozi s 10 g/L nego na 7,5 g/L

saharoze. Ovaj rezultat je u suprotnosti sa saznanjima da je stopa fotosinteze niža u biljaka koje rastu na podlogama obogaćenim šećerima. Kadleček i sur. (2003) su istraživali fotosintezu na duhanu koji je bio uzgajan pri dva intenziteta svjetlosti ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i $380 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) na podlogama s različitim koncentracijama saharoze (0 %, 3 % i 5 %). Dokazali su da višak saharoze može smanjiti potrebu za energijom koju biljka dobiva fotosintezom i na taj način inhibirati proces fotosinteze. Međutim, utvrdili su da prisutnost 5% saharoze u podlozi stimulira stopu fotosinteze i da je pri tom povećana aktivnost nekih od fotosintetskih enzima te sadržaj klorofila. Takav učinak povišene koncentracije saharoze na fotosintezu pada nakon što je postignuta maksimalna vrijednost (Kadleček i sur., 2003). Koeficijenti gašenja fluorescencije (qP i NPQ) su vrlo osjetljivi pokazatelji stresa. qP često pada tijekom ili nakon stresnih događaja, ali se može, ovisno o jačini stresa, brzo vratiti na normalnu vrijednost, što je i dokazano u nekoliko istraživanja učinka osmotskog stresa (Zhao i sur., 2005).

Klorofil u listovima ima ključnu ulogu u apsorpciji svjetlosti u procesu fotosinteze. Koncentracija klorofila u biljčica uzgojenih u uvjetima *in vitro* može biti pod utjecajem raznih čimbenika, a jedna od njih je i koncentracija saharoze u hranjivom mediju. U istraživanju utjecaja saharoze (0; 9,9; 19,8 i 30 g/L) na biljku *Samanea saman* koja je rasla u atmosferi obogaćenoj s CO₂ te intenzitetu osvjetljenja od $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ dokazana je redukcija koncentracije klorofila *a* i klorofila *b* zbog čega je bila smanjena i stopa fotosinteze (Mosaleeyanon i sur., 2004). Huylenbroeck i Debergh (2006) ustanovili su da je saharoza u koncentracijama od 3% i 6% u mediju potakla fotoinhibiciju u biljaka roda *Spathifillum*. Rezultati istraživanja Kadleček i sur. (2003) na duhanu su pokazali da saharoza dodana u medij poboljšava otpornost biljčica na jače svjetlosno zračenje i oksidacijski stres, ali i da je učinak saharoze ovisan o njenoj koncentraciji.

Najbolji rezultati rasta vodene leće su postignuti na hranjivoj podlozi uz dodatak 10 g/L saharoze. No, valja uzeti u obzir da su testirane biljke rasle u uvjetima slabog osvjetljenja, te su vjerojatno djelomično prilagođene heterotrofnim uvjetima prehrane. Kako im je omogućeno uzimanje saharoze kao izvora hrane iz hranjive podloge, prisutnost više koncentracije pogoduje boljem rastu u uvjetima slabog osvjetljenja. Istraživanje je posebno nastaviti pri intenzitetima osvjetljenja pogodnim za autotrofan

način ishrane biljaka, te pri tim uvjetima također istražiti učinak različitih osmotskih vrijednosti hranjive podloge, kao i različitih tipova i intenziteta osvjetljenja.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata ovisnosti rasta i fotosinteze vodene leće (*Lemna minor* L.) o osmotskoj vrijednosti podloge i osvjetljenju mogu zaključiti da je tijekom 16 dana zabilježena eksponencijalna stopa rasta biljaka kod svih istraživanih tretmana. Najviša vrijednost stope rasta zabilježena je u biljaka osvjetljenih izvorom svjetlosti GL na podlozi s dodatkom 7,5 i 10,0 g/L saharoze. Stopa rasta biljaka je rasla proporcionalno s povećanjem koncentracije saharoze u hranjivoj podlozi bez obzira kojem su od dva izvora svjetlosti bile izložene. Kod usporedbe stope rasta biljaka u uvjetima izvora osvjetljenja CW i GL, bolji rast je zabilježen pod GL lampama a stopa rasta se povećala proporcionalno s intenzitetom svjetlosti.

Među svim pokazateljima učinkovitosti fotosinteze koje smo određivali mjerenjem fluorescencije jedino je fotokemijsko gašenje bilo značajno različito u pojedinim tretmanima. Pritom su se značajno razlikovale biljke izložene različitim koncentracijama saharoze i izvoru svjetlosti CW.

7. LITERATURA

- Dieleman, J.A. i Meinen, E. (2007): Interacting effects of temperature integration and light intensity on growth and development of single-stemmed cut rose plants. *Scientia Horticulturae* 113, 182–187.
- Drøbak, B. K. i Watkins, P. A. C. (2000): Inositol(1,4,5)trisphosphate production in plant cells: an early response to salinity and hyperosmotic stress. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 481, 240-244.
- Farrar, J., Pollock, C. i Gallagher, J. (2000): Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Science* 154, 1–11.
- Godde, D. (1999): Adaptations of the photosynthetic apparatus to stress conditions. In: Lerner HR (ed) *Plant Responses to Environmental Stresses*. Marcel Dekker, New York, p 449-474.
- Goltseva, V., Zaharievaa, I., Lambreva, P., I. Yordanov, I. i Strasser, R. (2003): Simultaneous analysis of prompt and delayed chlorophyll *a* fluorescence in leaves during the induction period of dark to light adaptation. *Journal of Theoretical Biology* 225, 171–183.
- Graça, M. M. C. S. (2004): Salt stress response of the extremely halotolerant yeast *Candida halophila* (syn *versatilis*) CBS 4019, Doctoral thesis, University of Minho, Braga, Portugal.
- Hilyard, N. C. i Biggin, H. C. (1994): *Fizika za biologe*, Školska knjiga, Zagreb.
- Holm, L., Doll, J., Holm, E., Pancho, J. i Herberger, J. (1997): *World Weeds, Natural Histories and Distribution*. John Wiley & Sons, New York, USA.

- Huylenbroeck, J.M. i Debergh, P.C. (2006): Impact of sugar concentration in vitro on photosynthesis and carbon metabolism during ex vitro acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. *Physiologia Plantarum* 96, 298–304.
- ISO- International Organization for Standardization (2001): Water quality - determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*). Duckweed growth inhibition test, ISO/CD 20079.
- Javed, F. i Ikram, S. (2008): Effect of sucrose induced osmotic stress on callus growth and biochemical aspects of two wheat genotypes. *Pakistan Journal of Botany* 40, 1487-1495.
- Kadleček, P., Rank, B. i Ticha, I. J. (2003): Photosynthesis and photoprotection in *Nicotiana tabacum* L. in vitro grown plantlets. *Plant Physiology* 160, 1017-1024.
- Krajnčič, B. (1972): Fotoperiodične reakcije Lemnacej severovzhodne Slovenije, magisterski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Krajnčič, B. i Devidé, Z. (1980): Report on photoperiodic responses in *Lemnaceae* from Slovenia. *Berichte des Geobotanische Institut ETH, Stiftung Rübel, Zurich* 47, 75-86.
- Landolt, E. (1986): The family of Lemnaceae: A monographic study (Vol. 1) Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der Edig. Tech. Hochschule, Stiftung Rübel. Zürich. 71. Heft.
- Landolt, E., Kandeler, R. (1987): Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae). The family of Lemnaceae – A monographic study, (Vol. 2) Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der Edig. Tech. Hochschule, Stiftung Rübel. Zürich. 95. Heft.

- Les, D. H. i Crawford, D. J. (1999): *Landoltia (Lemnaceae)* a new genus of duckweeds. *Novon* 9, 530-533.
- Lewis, M. A. (1995): Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: A review. *Environmental Pollution* 87, 319-336.
- Lozić, I. (2010): Učinak različitih osvjetljenja na rast i fotosintezu vodene leće (*Lemna minor* L.), Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu.
- Maxwell, K. i Johnson, G. N. (2000): Chlorophyll fluorescence - a practical guide, *Journal of Experimental Botany*. 51, 659-668.
- Mkandawire, M. i Dudel, E. G. (2007): Are *Lemna spp.* Effective phytoremediation agents?. *Bioremediation, biodiversity and bioavailability*, Global science books 1, 56-71
- Mohamed, M.A.-H. i Alsdon, A.A. (2009): Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. *Scientia Horticulturae* 123, 295–300.
- Mohr, H. i Schopfer, P. (1995): *Plant Physiology*, Springer-Verlag Berlin.
- Mosaleeyanon, K, Cha-um, S. i Kirdmanee, C. (2004): Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO₂-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. *Scientia Horticulturae* 103, 51–63.
- Munnik, T. i Meijer, H. J. G. (2001): Osmotic stress activates distinct lipid and MAPK signalling pathways in plants. *FEBS Letters* 498, 172-178.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (2002): Revised proposal for a new guideline 221, *Lemna* sp. Growth inhibition test. Draft Guideline 221.

Pevalek-Kozlina, B. (2003): Fiziologija bilja, Profil, Zagreb.

Pirson, A. i Seidel, F. (1950): Zell- und stoffwechselphysiologische untersuchungen an der wurzel von *Lemna minor* unter besonderer berücksichtigung von kalium- und kalziummangel. *Planta* 38, 431-473.

Premkumar, A. Mercado, J.A. i Quesada, M.A. (2001): Effects of *in vitro* tissue culture conditions and acclimatization on the contents of Rubisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments, and C/N ratio. *Journal of Plant Physiology* 158:835-840.

Quiles, M.J. i López, N.I. (2003): Photoinhibition of photosystems I and II induced by exposure to high light intensity during oat plant growth. Effects on the chloroplast NADH dehydrogenase complex. *Plant Science* 166, 815–823.

Ralph, P. J. (1998): Photosynthetic responses of *Halophila ovalis* (R. Br.) Hook. *f.* to osmotic stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 227, 203–220.

Regula, I., Pevalek-Kozlina, B., Vidaković-Cifrek, Ž. i Jelenčić, B. (2006): Praktikum iz fiziologije bilja, Skripta za internu upotrebu, Zagreb.

Ritchie, G. A. (2006): Chlorophyll fluorescence: what is it and what do the numbers mean? *USDA Forest Service Proceedings RMRS-P.* 43, 34-43.

Sánchez-Saavedra, M. P. i Voltolina, D. (2006): The growth rate, biomass production and composition of *Chaetoceros* sp. grown with different light sources. *Aquacultural Engineering* 35, 161–165.

Shohael, A.M., Chakrabarty, D., Ali, M.B., Yu, K.W., Hahn, E.J., Lee, H.L. i Paek, K.Y. (2006): Enhancement of eleutherosides production in embryogenic cultures of *Eleutherococcus sessiliflorus* in response to sucrose-induced osmotic stress. *Process Biochemistry* 41, 512–518.

Vidaković-Cifrek Ž. (1999): Učinak kalcij (II)-klorida i kalcij (II)-bromida na fiziološke procese u vodenoj leći (*Lemna minor* L.) i korijenu luka (*Allium ascalonicum* auct.), Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

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

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

Zhao, L. Deng, X. i Shan, L.(2005): Effects of osmotic stress on chlorophyll fluorescence parameters of wheat seedling, *Ying yong sheng tai xue bao* 16, 1261-4.

Internet:

<http://blog.unila.ac.id/>

<http://glossary.periodni.com/>

<http://thesolarpowerexpert.com/>

<http://vitawater.ru/>

POPIS KRATICA

ABA - abscizinska kiselina

ATP - adenzin-trifosfat

CW - izvor svjetlosti Cool White

ETR (electron transport rate) - stopa prijenosa elektrona

GL - izvor svjetlosti GroLux

IAA - indol-3-octena kiselina

NADP⁺ - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NPQ - nefotokemijsko gašenje fluorescencije

PFD (photon flux density) - gustoća svjetlosnog toka ($\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

PS - Pirson i Seidel (hranjiva podloga priređena po uputama Pirsona i Seidela)

PSI - fotosistem I

PSII - fotosistem II

qP - fotokemijsko gašenje fluorescencije

Td (doubling time) - vrijeme udvostručenja broja biljaka