

# **Učinak različitih osvjetljenja na rast i fotosintezu vodene leće (Lemma minor L.)**

---

**Lozić, Ivana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2010**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:341018>

*Rights / Prava:* [In copyright/Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-05-25**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
BIOLOŠKI ODSJEK

**Ivana Lozi**

**U INAK RAZLIČITIH OSVJETLJENJA NA RAST I  
FOTOSINTEZU VODENE LEDE (Lemna minor L.)**

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, 2010. godina

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

## Zahvala

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

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

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

I na kraju, hvala Nikoli na pomoći i podršci.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

### U INAK RAZLIČITIH OSVJETLJENJA NA RAST I FOTOSINTEZU VODENE LEDE (*Lemna minor* L.)

IVANA LOZI

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

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

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

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

**Ključne riječi:** svjetlost, rast, fotosinteza, vodena leda (*Lemna minor* L.)

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

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

Dr. sc. Dubravka Matković, alogović, redovni profesor

Dr. sc. Ines Radanović, izvanredni profesor

**Rad prihvaten:** 10.02. 2010.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Graduation Thesis

Faculty of Science

Department of Biology

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

IVANA LOZI

Department of Biology

Faculty of Science

University of Zagreb

Rooseveltov trg 6, Zagreb

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

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

**Thesis deposited** in Central biological library

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

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

**Reviewers:** Dr. Iva Juranović Cindrić, Asst. Prof.

Dr. Dubravka Matković -alogović, Prof.

Dr. Ines Radanović, Assoc. Prof.

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

## SADRŽAJ

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

## **POPIS KRATICA**

**CW** - CoolWhite žarulja

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

**GL** - GroLux žarulja

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

**NPQ** - nefotokemijsko gašenje

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

**PS** - Pirson i Seidel

**PSI** - fotositem I

**PSII** - fotositem II

**qP** - fotokemijsko gašenje

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

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

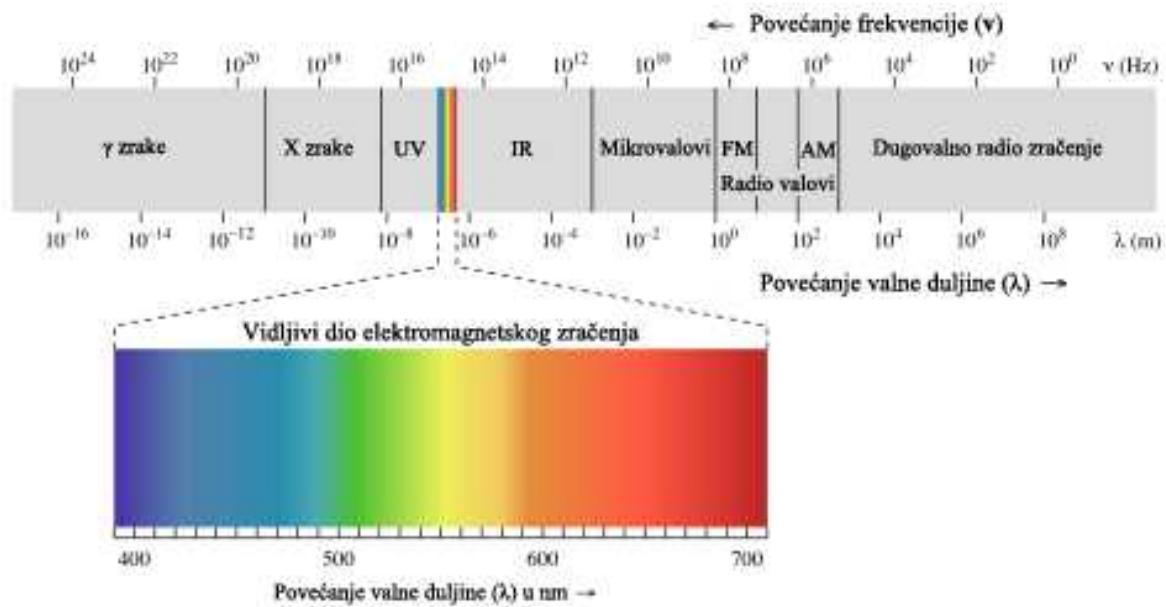
Biljke su statični organizmi kojima je za preživljavanje potrebna prilagodba na uvjete u kojima rastu. Kako se sunčeva svjetlost najviše sastoji od plavog i crvenog djela vidljivog spektra svjetlosti, biljke su se prilagodile na taj način da najefikasnije vrše fotosintezu koristeći upravo taj dio spektra.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

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

## 1. 1. SVJETLOST

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

Svetlost obuhva a transverzalno elektromagnetsko zračenje (električno i magnetsko polje mijenjaju se periodički u smjerovima okomitim na smjer gibanja vala) vidljivo ljudskom oku. Ovaj odlikuje razlike već vrlo male frekvencijske razlike (boje) u području vidljive svjetlosti. Najkratču valnu duljinu imaju ljubičasta i plava svjetlost, a najdulju crvena svjetlost. Bijela svjetlost sastavljena je od kontinuiranog niza svih boja vidljivog spektra.



**Slika 1.** Spektar elektromagnetskog zračenja

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

## 1.2. FOTOSINTEZA

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

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

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

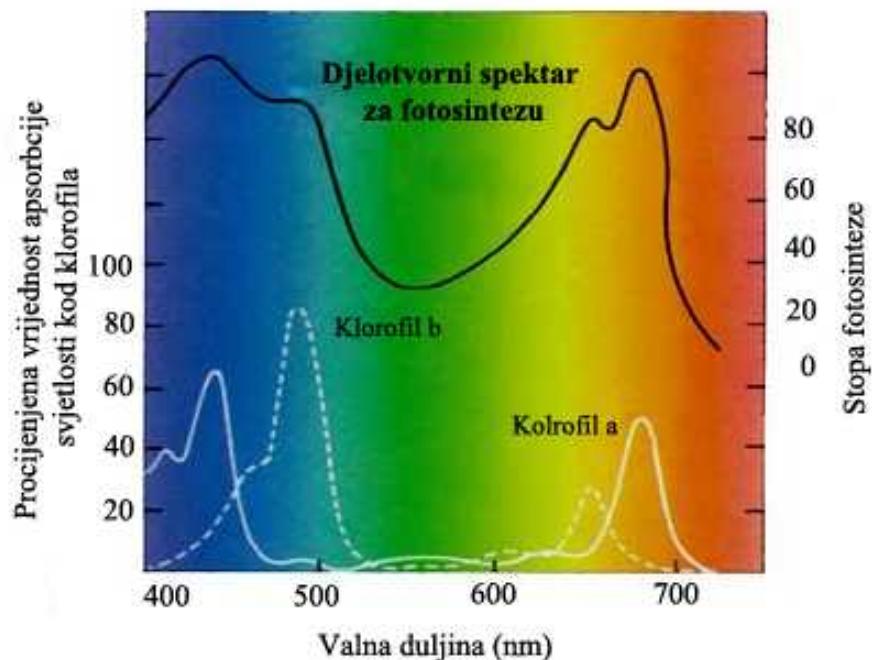
Svetlost koju apsorbira klorofil pokre e prijenos elektrona od vode do akceptora elektrona  $\text{NADP}^+$  i u tom se procesu cijepa voda te nastaje kisik i ATP. U reakcijama tame ATP se koristiti za redukciju  $\text{CO}_2$  i sintezu še era.

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

### **1.2.1. Fotosintetski pigmenti**

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

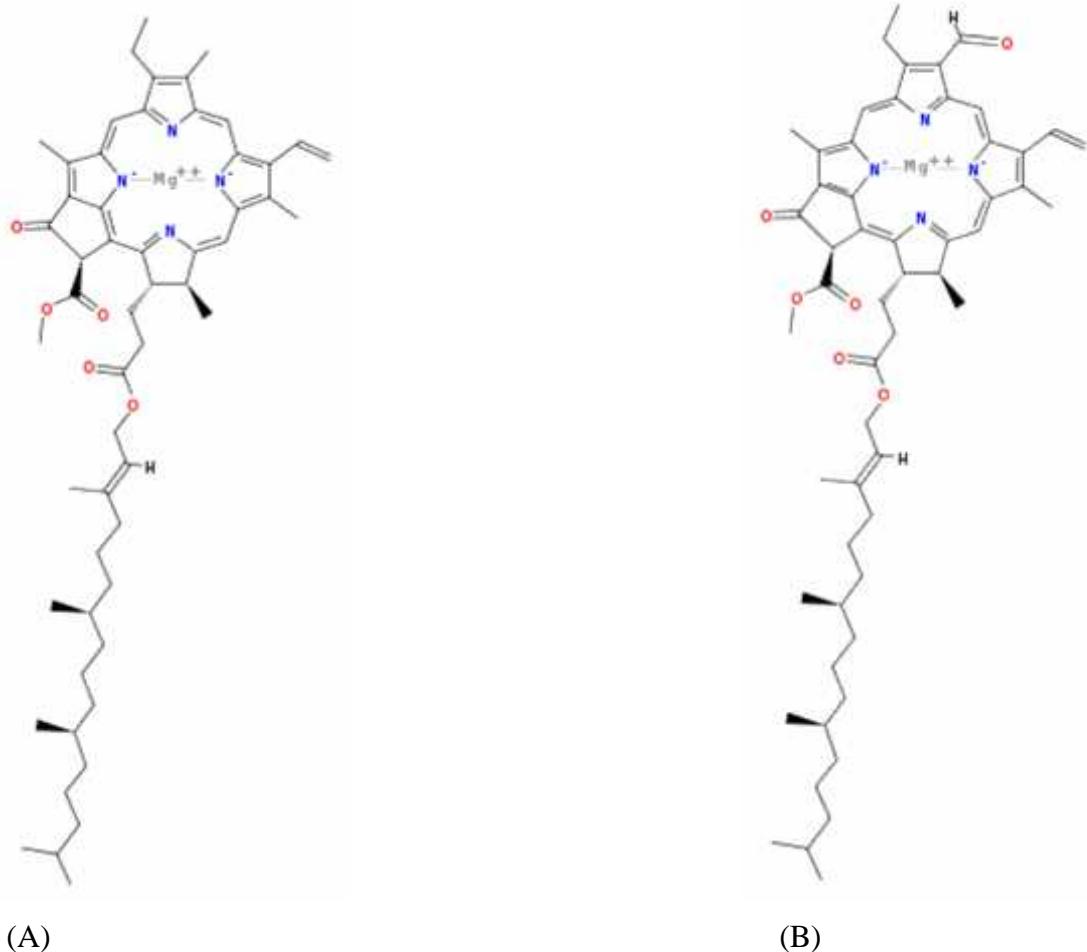
Najve e zna enje u fotosintezi ima klorofil *a* jer jedino on može sudjelovati u svjetlosnim reakcijama koje Sun evu energiju pretvaraju u kemijsku. Me utim, u fotosintezi sudjeluju i ostali pigmenti, zbog ega se djelotvorni spektar fotosinteze ne poklapa u potpunosti s djelotvornim spektrom klorofila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



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

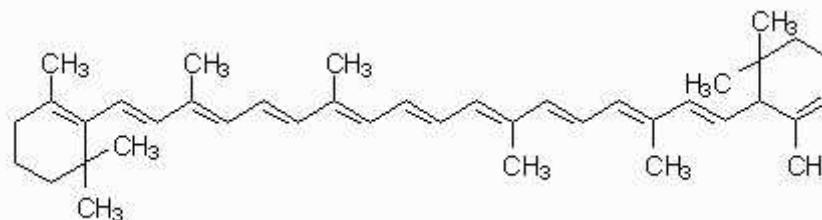
Klorofil *a* je plavozelene boje i maksimalno apsorbira svjetlost valnih duljina 430 nm i 662 nm, dok je klorofil *b* žutozelene boje, a maksimalno apsorbira svjetlost valnih duljina 453 nm i 642 nm. Osnovna struktura klorofila je porfirinski sustav koji ima etiri pirolska prstena koje su obično povezane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

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

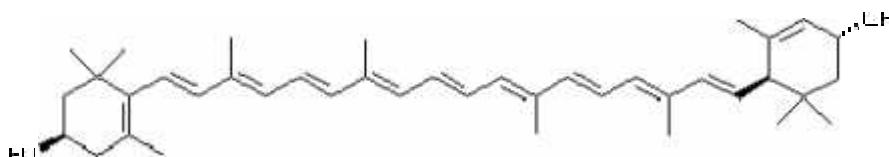


**Slika 3.** Klorofil *a* (A) i klorofil *b* (B) (Preuzeto sa internetske stranice [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org))

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



(A)



(B)

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

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

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

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

karotenoida da gase pobu eno stanje klorofila odlu ila sam mjeriti njihovu koli inu jer se porast koli ine karotenoida može uzeti kao indikator stresnih uvjeta.

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

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

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

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

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

Ovisnost fotosinteze o kvaliteti i koli ini svjetlosti je velika. Pove anjem intenziteta osvjetljenja brzina fotosinteze se u po etku linearno pove ava, zatim se postupno smanjuje i kona no, kada se fotosintetski aparat zasiti svjetloš u, poprima konstantnu vrijednost. U razli itih vrsta to se zasi enje pojavljuje razli itim brzinama. Još ja e osvjetljenje može uzrokovati svjetlosni stres (Pevalek- Kozlina, 2003).

Obzirom na intenzitet svjetlosti na kojem rastu, biljke možemo podijeliti na biljke sjene koje rastu u zasjenjenom okolišu i biljke sunca koje su prilago ene punoj sun evoj svjetlosti. Kod biljaka sjene zasi enje se pojavljuje relativno brzo, a kod biljaka sunca tek pri visokom intenzitetu osvjetljenja.

Svjetlosni stres prvo djeluje na fotosintezu što se može uo iti kod neprilago enih biljaka u kojima dolazi do ošte enja fotosintetskog aparata, uslijed ega intenzitet fotosinteze

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

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

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

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

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

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

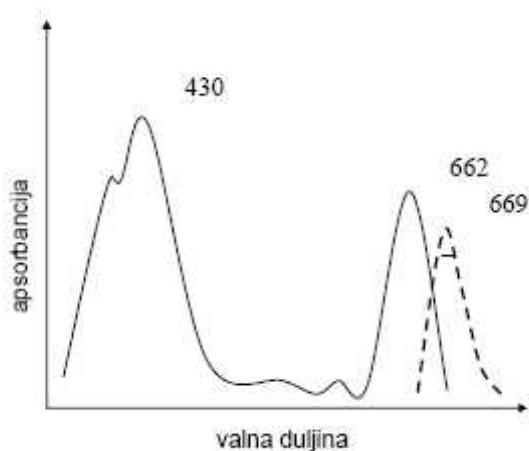
photosintetskog aparata za pretvorbu svjetlosne energije u kemijsku (Osmond, 1994; Valladares i Pearcy, 1997).

### 1.3. FLUORESCENCIJA KLOROFILA A

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

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

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



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

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

Pri niskom intenzitetu svjetlosti, molekule plastokinona su oksidirane, tj. mogu primati elektrone. U takvima uvjetima se ekscitacijska energija s velikom u inkovitoš u (ve om od 95%) troši na fotokemijske reakcije te je intenzitet fluorescencije vrlo nizak. Me utim, pri ja em intenzitetu svjetlosti ne može se iskoristiti sva apsorbirana svjetlosna energija zbog nedostatka oksidiranih plastokinona koji bi mogli primiti elektrone s PSII pa se u takvima uvjetima ve i dio apsorbirane svjetlosne energije osloba a u obliku fluorescencije (Quibit, 2006).

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

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

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

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

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

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

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

#### **1.5. LEMNA -TEST**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 3.1. MATERIJAL

#### 3.1.1. Kultura vodene leće (Lemna minor L.) u uvjetima in vitro

*Lemna minor* je sakupljena u Botaničkom vrtu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prilikom uvođenja vodene leće u kulturu *in vitro* biljke su sterilizirane etanolom i živinim kloridom (Krajin i Devidé, 1980) i dalje uzgajane u sterilnim uvjetima. Za dugotrajnu kultivaciju vodene leće korištena je Pirson i Seidel (PS) hranjiva podloga (Pirson i Seidel, 1950), a za eksperimentalnu analizu hranjiva podloga po Steinbergu (ISO/CD 20079). Sastav hranjivih podloga prikazuje Tablica 1.

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

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

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

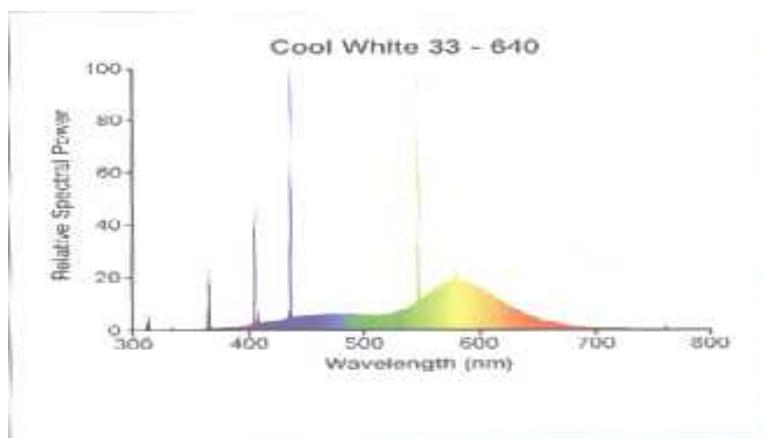
U pokusima sam koristila Erlenmeyerove tikvice od 100 ml koje sam punila s oko 60 ml hranjive podloge, za epila vatom i aluminijskom folijom te sterilizirala autoklaviranjem pri temperaturi od  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  i tlaku od 0,15 MPa u trajanju od 18 minuta. Metalni i ostali pribor sterilizirala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

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

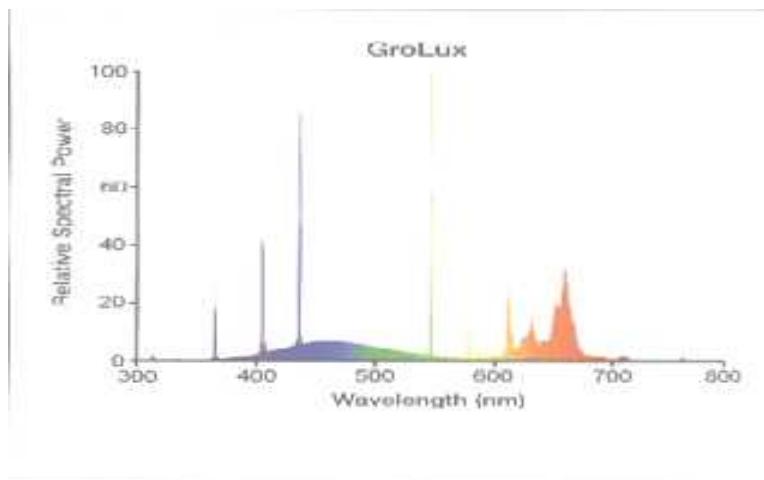
### **3.1.2. Uvjeti osvjetljenja**

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

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



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



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

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

**Tablica 2.** Istraživani uvjeti osvjetljenja

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

### 3.2. METODE

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

#### 3.2.1. LEMNA-TEST

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

#### Stopa rasta vodenih leđenja - broj biljaka

U inak različitim uvjetima osvjetljenja na rast vodenih leđenja *Lemna minor* L. procijenjen je određivanjem stope rasta broja listova vodenih leđenja tijekom 14 dana.

Stopa rasta broja biljaka određena je brojanjem listova vodenih leđenja tijekom 14 dana rasta, pri čemu je brojana svaka pa i najmanja biljka vidljiva golim okom. Dobiveni podaci uvrštavani su u sljedeći izraz:

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

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

$N_n$  = broj biljaka n-ti dan

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

#### Stopa rasta vodenih leđenja - masa svježe tvari

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

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

$m_0$  = broj biljaka nulti dan

$m_n$  = broj biljaka n-ti dan

nulti dan = dan nasa ivanja

$n = 7$

### Omjer mase suhe i svježe tvari

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

### 3.2.2 SADRŽAJ PIGMENATA

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

a) za klorofil *a*:

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

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

$A_X$  = apsorbancija uzorka pri odre enim valnim duljinama

$V$  = volumen uzorka (ml)

$l$  = duljina opti kog puta = 1 cm

$m$  = masa uzorka = 0,03 g

b) za klorofil *b*:

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

- $c_b$  = sadržaj klorofila *b* (mg / g svježe tvari)  
 $A_X$  = apsorbancija uzorka pri odre enim valnim duljinama  
 $V$  = volumen uzorka (ml)  
 $l$  = duljina opti kog puta = 1 cm  
 $m$  = masa uzorka = 0,03 g

c) za ukupne karotenoide:

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

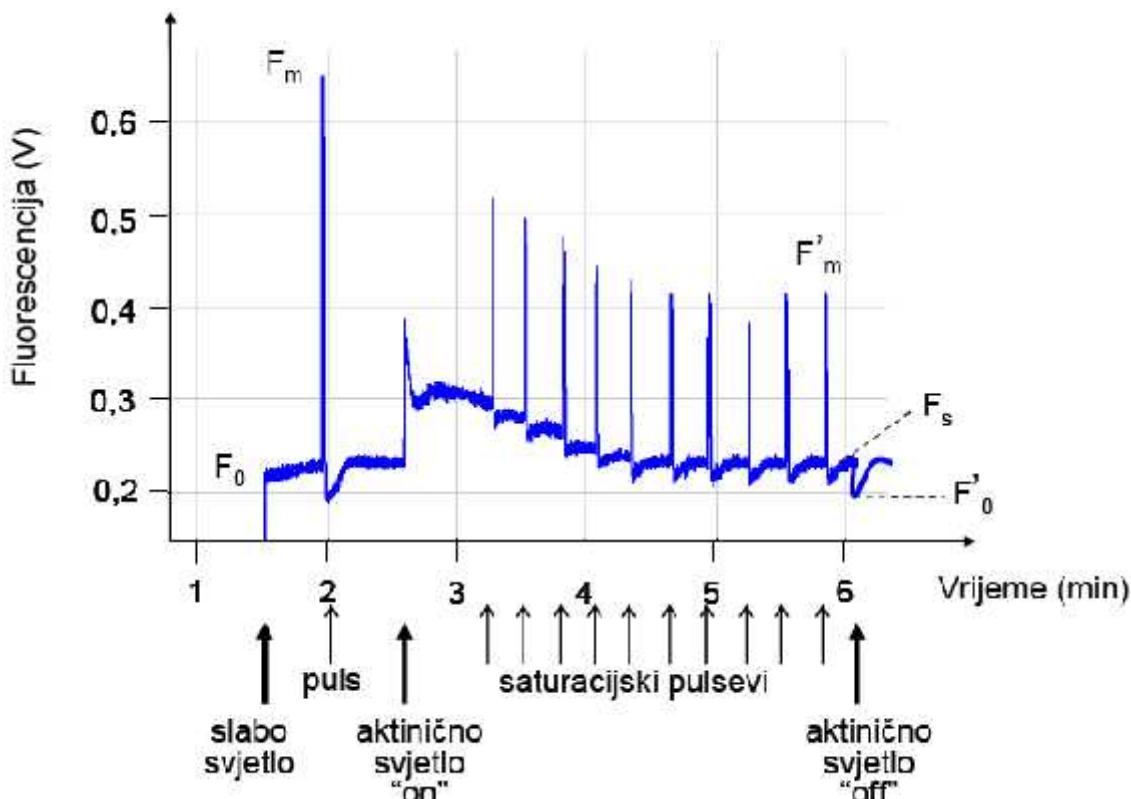
- $c_k$  = sadržaj ukupnih karotenoida (mg / g svježe tvari)  
 $A_X$  = apsorbancija uzorka pri odre enim valnim duljinama  
 $V$  = volumen uzorka (ml)  
 $l$  = duljina opti kog puta = 1 cm  
 $m$  = masa uzorka = 0,03 g

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

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

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

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



Slika 8. Mjerenje fluorescencije klorofila metodom saturacijskog pulsa

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

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

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

Aktini no svjetlo ostaje uključeno do kraja pokusa, tijekom kojeg se u određenim intervalima primjenjuju saturacijski pulsevi, pri čemu se bilježe vrijednosti maksimalne fluorescencije ( $F'_m$ ) te fluorescencije ravnotežnog stanja ( $F_s$ ) u listu prilagođenome na uvjete svjetla. Kao izvor bijele aktini ne svjetlosti te saturacijskih pulseva koristi se halogena lampa, čiji je intenzitet osvjetljenja moguće podesiti pomoću odgovarajućeg potenciometra. Mjerenje traje 10 minuta, odnosno dok se vrijednosti  $F_s$  i  $F'_m$  ne ustale. Nakon toga opet slijedi obasjavanje lista crvenom svjetlošću u vrlo niskog intenziteta kako bi se dobila vrijednost  $F'_0$ .

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

Posljednje mjerenje za svaku količinu aplicirane svjetlosti uzela sam kao relevantno za izračun vrijednosti  $\Phi_{PSII}$ , rel. ETR i NPQ.

Pokazatelji fluorescencije klorofila *a* određeni su prema sljedećim izrazima:

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

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

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

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

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

$F_s$  (fluorescencija ravnotežnog stanja) je prinos fluorescencije lista prilagođenog određenoj količini svjetlosti.  $F'_m$  (maksimalna fluorescencija) mjeri se nakon primjene impulsne saturacijske svjetlosti u listu prilagođenom uvjetima svjetla. Iz ovih podataka računa se efektivna u inkovitost PSII ( $\Phi_{PSI}$ ), koji je mjera udjela svjetlosti apsorbirane klorofilom

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

### 3. Stopa prijenosa elektrona (ETR):

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

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

### 4. Fotokemijsko gašenje (qP):

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

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

### 5. Nefotokemijsko gašenje (NPQ):

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

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

### 3.3. Statistička obrada podataka

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

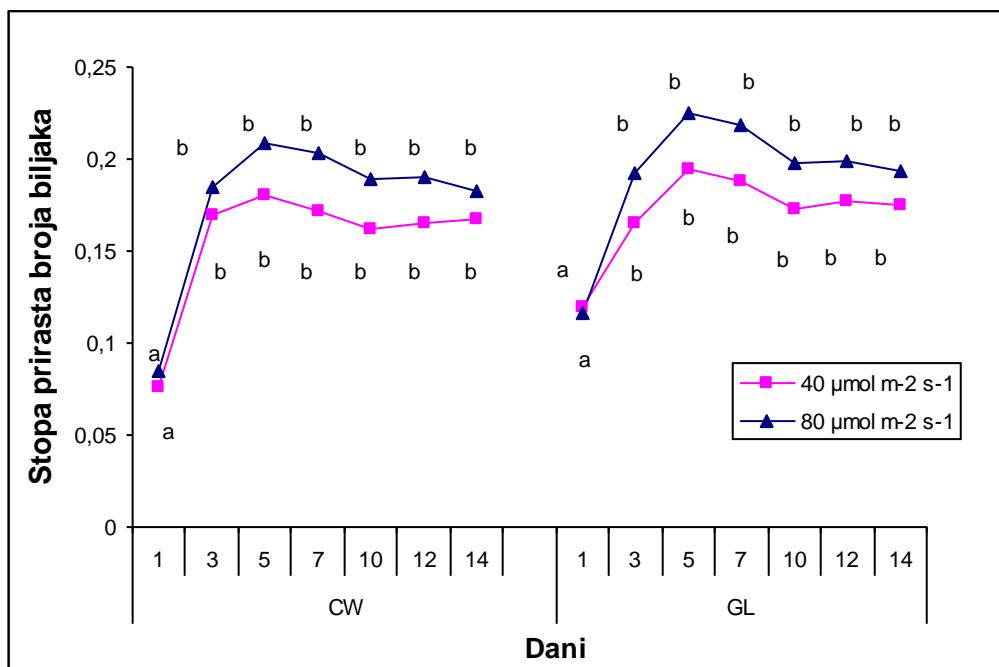
#### 4.1. U INAK RAZLIČITIH UVJETA OSVJETLJENJA NA STOPU RASTA VODENE LEPE

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

##### Stopa prirasta broja listi a

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

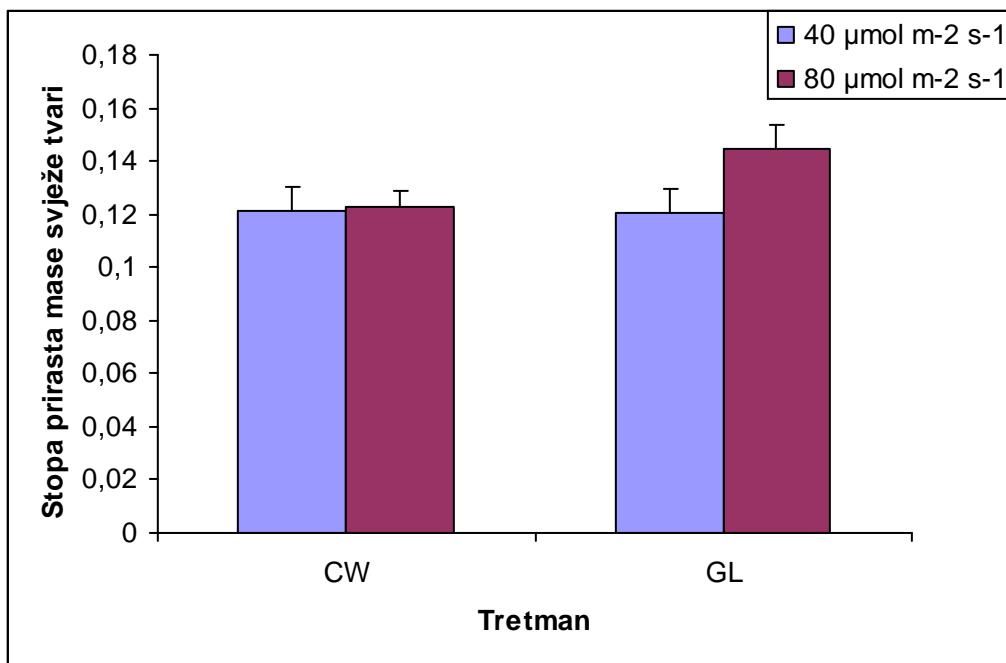
Neovisno o tipu i intenzitetu osvjetljenja, vodene lepe su pokazale znatan porast broja listi a većeg dana pokusa (pri osvjetljenju CW40 za 123%, CW80 za 118%, GL40 za 38% i GL80 za 65%). Slična stopa prirasta broja biljaka zadržala se svih 14 dana pokusa, bez znatnije razlike između pojedinih dana. Vidljiva je blaga tendencija pada stope rasta nakon petog dana pokusa (pri osvjetljenju CW40 za 5-9%, CW80 za 2-14%, GL40 za 3-12%, te GL80 za 3-16%). Pri oba tipa osvjetljenja (CW i GL) zabilježene su više stope prirasta broja biljaka pri višem intenzitetu osvjetljenja iako porast nije bio statistički značajan (Slika 9).



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

### Stopa prirasta mase svježe tvari

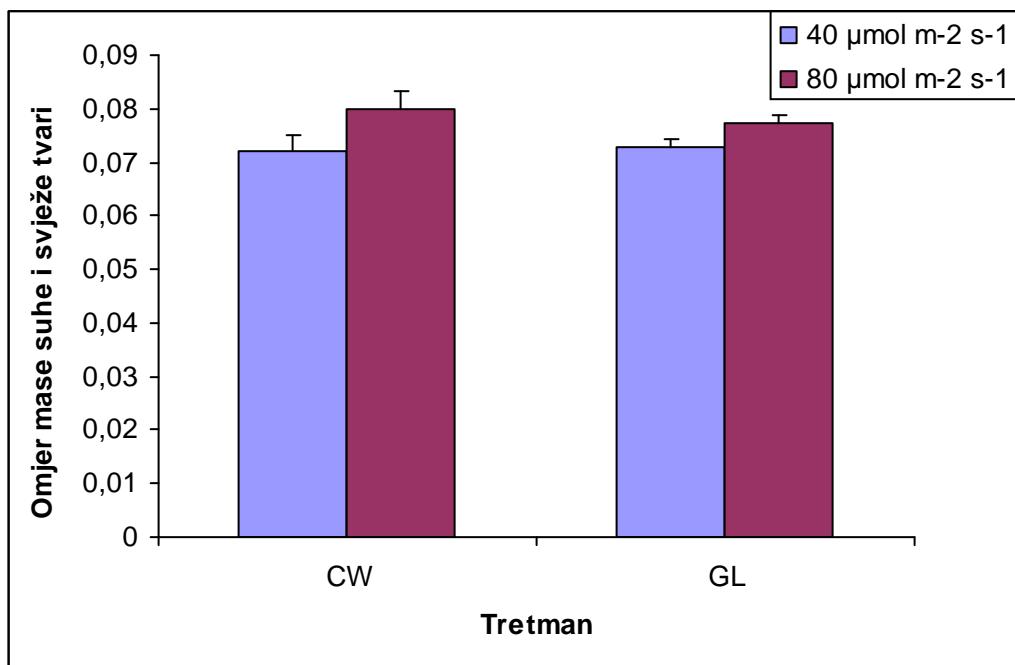
Izlaganje različitim uvjetima osvjetljenja nije znatno utjecalo na stopu prirasta mase svježe tvari. Nakon 7 dana uzgoja uz osvjetljenje „Cool White“ žaruljama prirast mase svježe tvari bio je podjednak pri oba istražena intenziteta osvjetljenja. Uz osvjetljenje „GroLux“ žaruljama s velikim udjelom crvenog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



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

### Omjer mase suhe i svježe tvari

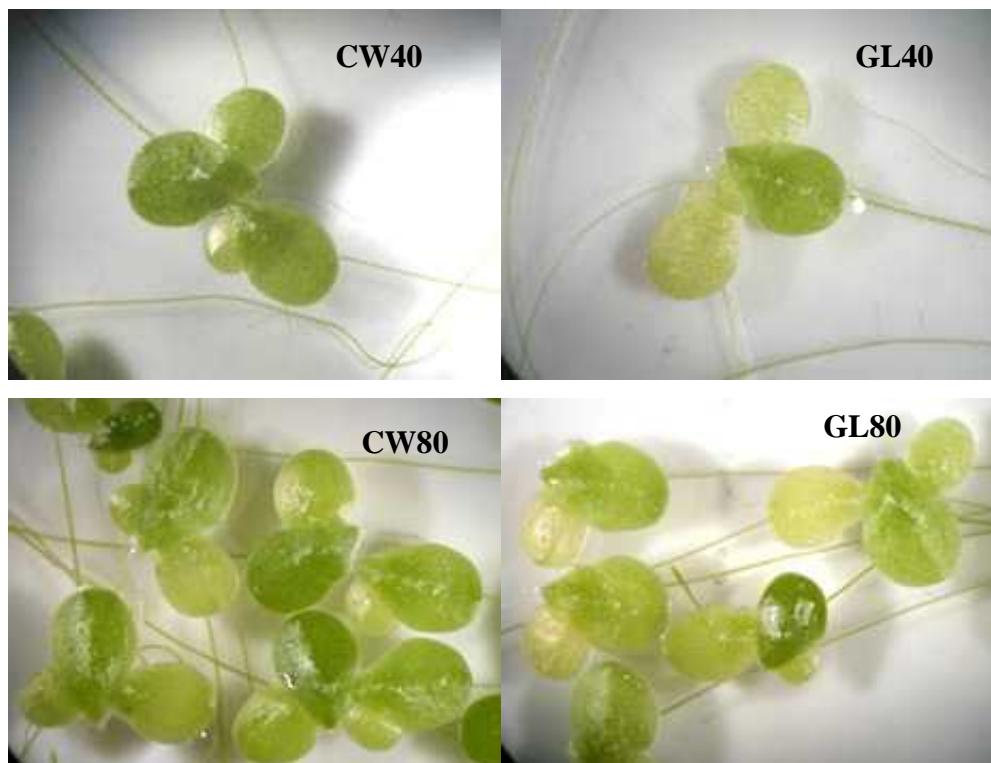
Omjer mase suhe i svježe tvari nakon 7 dana uzgoja pri osvjetljenju GroLux žaruljom nije se značajno razlikovao od onog u biljaka osvijetljenih „Cool White“ žaruljom (Slika 11). Izlaganje višim intenzitetima (80  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) oba tipa osvjetljenja rezultiralo je jedva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



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

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

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



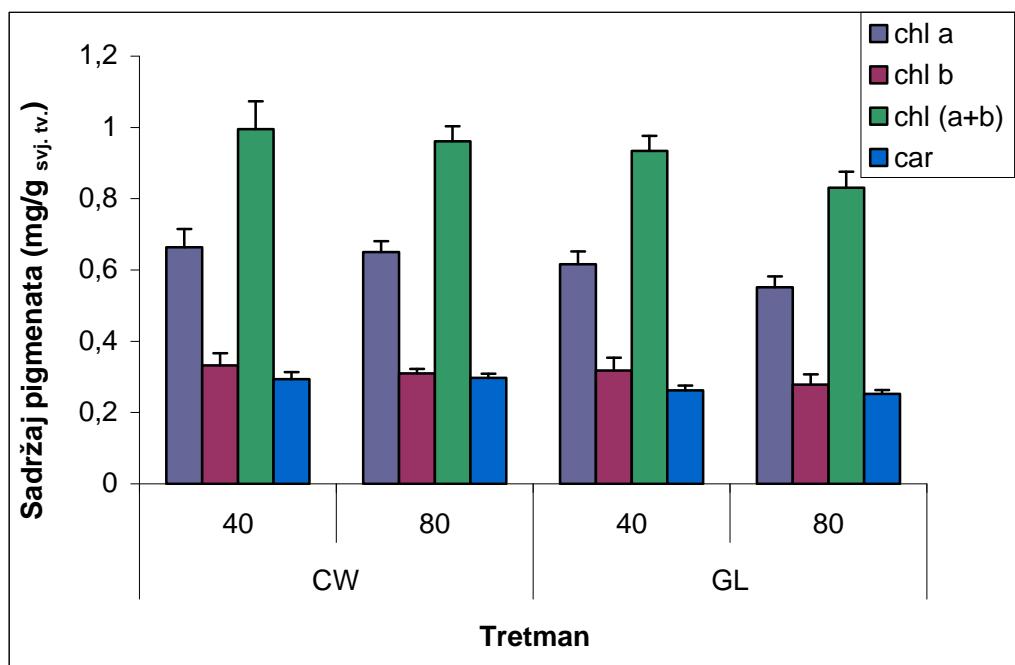
**Slika 12.** Vodene leme nakon 7 dana uzgoja na hranjivoj podlozi po Steinbergu pri uvjetima višeg i nižeg intenziteta ( $40$  i  $80 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) bijele svjetlosti „Cool White“ žarulja (CW40 i CW80) te crvene svjetlosti „GroLux“ žarulja (GL40 i GL80).

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

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

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

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



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

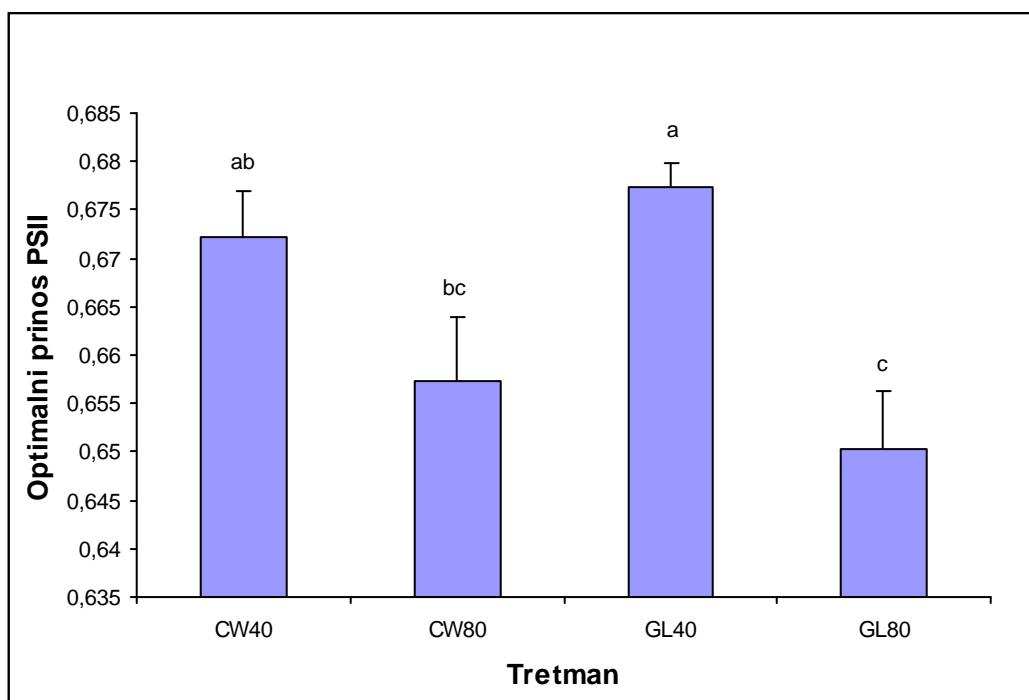
### 4.3. U INAK RAZLIČITIH UVJETA OSVJETLJENJA NA FOTOSINTEZU

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

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

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

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

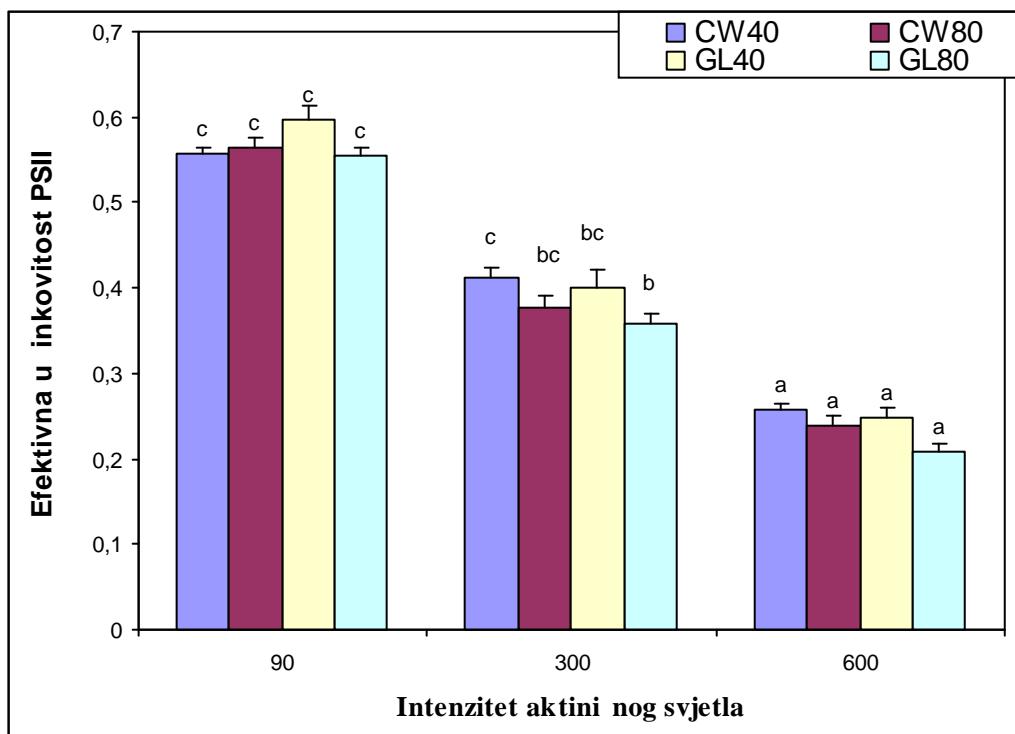


**Slika 14.** Optimalni prinos PSII (Fv/Fm) u biljaka uzgajanih na hranjivoj podlozi po Steinbergu pri intenzitetu 40 i 80  $\mu\text{mol}$  fotona  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  bijele svjetlosti „Cool White“ žarulja (CW) i crvene svjetlosti „GroLux“ žarulja (GL) tijekom sedam dana. Rezultati prikazuju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

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

### Efektivna u inkovitost PSII

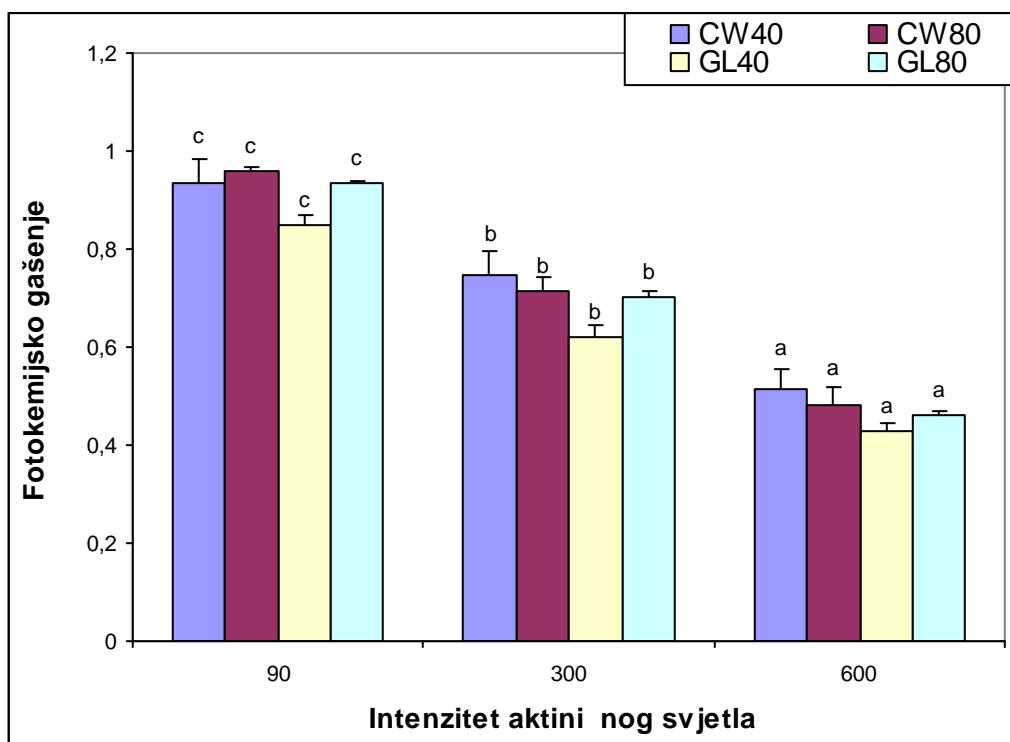
S poveanjem intenziteta aktini kog svjetla dolazi do smanjenja efektivne u inkovitosti PSII kod svih tretmana (za 35-118% kod CW40, 50-137% kod CW80, 49-140% kod GL40 te za 55-165% kod GL80). Pri razliitim intenzitetima aktini nog svjetla nema statisti ki zna ajne razlike u efektivnoj u inkovitosti PSII između pojedinih tretmana. (Slika 15).



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

### Fotokemijsko gašenje

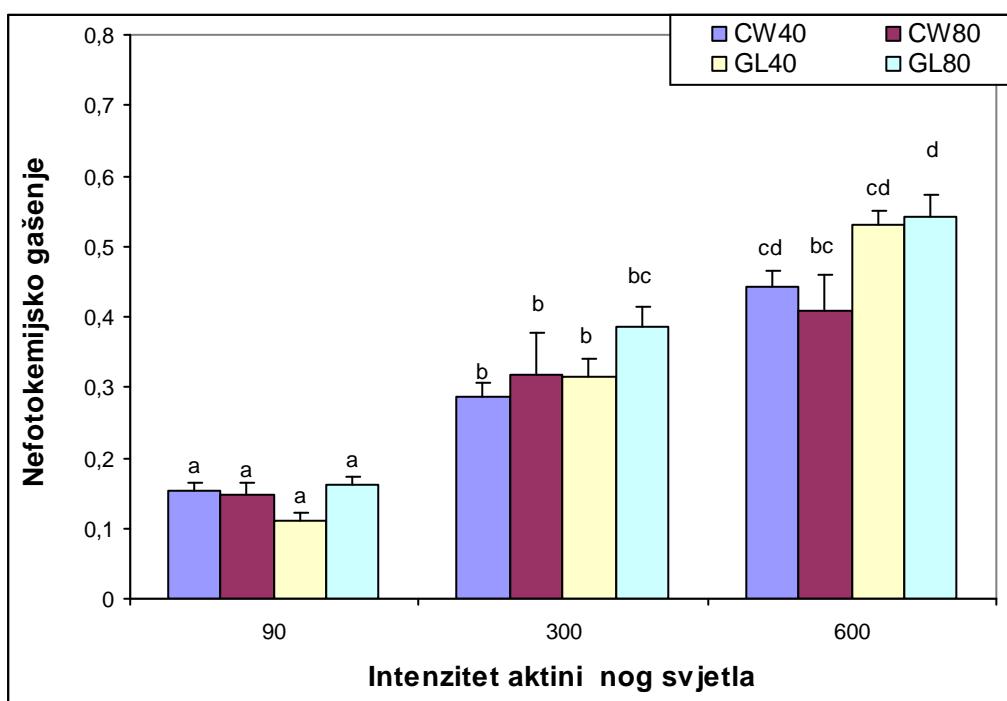
S porastom intenziteta aktini nog svjetla fotokemijsko gašenje (Slika 16) se smanjuje (za 25-81% kod CW40, 34-99% kod CW80, 37-97% kod GL40 i za 33-102% kod GL80) pri emu nema zna ajne razlike izme u pojedinih tretmana pri pojedinom intenzitetu aktini ke svjetlosti. Vrijednosti su nešto malo ve e u biljaka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



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

### Nefotokemijsko gašenje

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

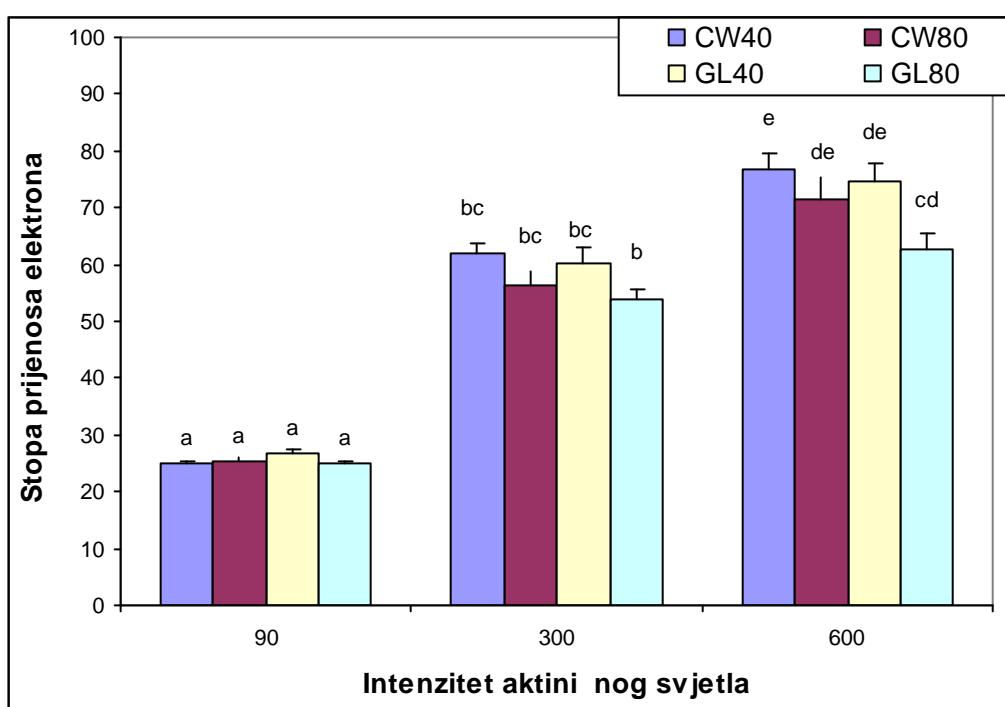


**Slika 17.** Nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ) u biljaka uzgajanih na hranjivoj podlozi po Steinbergu tijekom sedam dana pri razli itim intenzitetima svjetlosti ( $40$  i  $80 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) „Cool White“ (CW) i „GroLux“ (GL) žarulja. Rezultati prikazuju srednje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

### Stopa prijenosa elektrona

S poveanjem intenziteta aktini nog svjetla značno se povećava stopa prijenosa elektrona; tako se pri osvjetljenju GL40 povećava za 123-178%, GL80 za 116-151%, CW40 za 147-206% i CW80 za 123-182% (Slika 18).

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



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

## 5.1. U INAK RAZLIČITIH UVJETA OSVJETLJENJA NA RAST VODENE L. E

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

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

Bolji rast na PS podlozi dobiven je također i u istraživanju u inka kadmija na vodenu leću (Šarić, 2001). Vodene leće su bile užgajane na PS podlozi gdje su jako dobro napredovale. Broj biljaka u kulturi se povećao, a listovi su bili intenzivno zelene boje. U ovom radu listovi i biljaka koje su rasle na podlozi po Steinbergu bili su svjetlijе zelene boje te slabijeg rasta. To vodi do zaključka da podloga koju sam koristila u svom radu nije optimalnog sastava. PS podloga, za razliku od podloge po Steinbergu, sadrži saharozu i neke druge organske dodatke kao što je asparagin, a također su i koncentracije makro- i mikroelemenata više.

Poznato je da *Lemnaceae* mogu rasti u širokom rasponu koncentracija hranjivih tvari, akci u destiliranoj vodi. Iako mogu preživjeti danima i tjednima, koristeći hranjive tvari akumulirane u starijim listovima, dugotrajni kontinuirani prirast rasta mogu je samo u otopinama s relativno visokom koncentracijom hranjivih tvari. Također, uočeno je da u

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 5.2. U INAK RAZLIČITIH UVJETA OSVJETLJENJA NA PIGMENTE VODENE LEVE

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

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

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

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

### **5.3. UTJECAJ RAZLIČITIH UVJETA OSVJETLJENJA NA FOTOSINTEZU VODENE LEĐE**

Lee et al. (2007) pokazali su da fluorescentno osvjetljenje sa visokim udjelom plave i crvene svjetlosti potiče fotosintezu. Zaključili su da količina i kvaliteta svjetlosti utječe na razvoj putem, i fiziološke odgovore, ovisno o intenzitetu i valnoj duljini svjetlosti.

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

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

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

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

Rezultati mjerjenja klorofila to donekle i potvr uju jer je koli ina klorofila niža u odnosu na rezultate dobivene na PS podlozi (Šarić, 2001). Pri uvjetima osvjetljenja GL80 došlo je do dalnjeg značajnog smanjenja optimalnog prinosa, iako od samo 4% u odnosu na bijelu svjetlost. Pri tim uvjetima primije ena je i blaga tendencija smanjenja sadržaja ukupnog klorofila što je izgleda bilo dovoljno za promjene u fotosintezi.

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

Dobivene vrijednosti za efektivnu u inkovitost PSII koristila sam za izračun stopi neprekidnog prijenosa elektrona. Sa povećanjem intenziteta aktini ke svjetla značajno se povećava stopa prijenosa elektrona. Ovi rezultati su zanimljivi jer pokazuju da se stopa prijenosa elektrona zasićuje kod većih vrijednosti intenziteta aktini ke svjetla nego stopa fotosinteze. Stopa prijenosa elektrona (ETR) predstavlja relativnu kolici elektrona koji prolaze kroz PSII tijekom ravnotežnog stanja fluorescencije. Primjećeno smanjenje stopi prijenosa elektrona kod biljaka koje su rasle pri  $80 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$  u odnosu na biljke koje su rasle pri  $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , osobito kod „GroLux“ žarulja, može se opet povezati sa smanjenom kolici inom klorofila i smanjenom u inkovitosti hrvatanja energije.

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

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

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

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

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

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

---

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

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

Sadržaj fotosintetskih pigmenata klorofila *a*, klorofila *b* te ukupnih karotenoida bio je nešto ve i u biljaka osvijetljenih hladnom bijelom svjetloš u „Cool White“ žarulja u odnosu na biljke osvijetljene crvenom svjetloš u „GroLux“ žarulja. Me utim primije eni porast nije bio statisti ki zna ajan.

U biljaka izloženih crvenoj svjetlosti višeg intenziteta primije eno je statisti ki zna ajno smanjenje optimalnog prinosa PSII .U inkovitost PSII na svjetlu, kao ni stopa prijenosa elektrona, nije se zna ajno razlikovala pri istraživanim uvjetima osvjetljenja. Nešto ve e vrijednosti fotokemijskog gašenja uo ene su pri izlaganju biljaka hladnoj bijeloj svjetlosti „Cool White“ žarulja dok su nešto ve e vrijednosti nefotokemijskog gašenja primije ene pri izlaganju biljaka crvenoj svjetlosti „GroLux“ žarulja, osobito kod viših intenziteta aktini kog svjetla. S pove anjem intenziteta aktini nog svjetla u inkovitost PSII i fotokemijsko gašenje su se zna ajno smanjili kod svih istraživanih uvjeta osvjetljenja , a nefotokemijsko gašenje i stopa prijenosa elektrona se pove ali, što ukazuje da su *Lemna minor* i njezin fotosintetski aparat prilago eni rastu kod vrlo niskog intenziteta osvjetljenja

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

Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993): Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. Chem. **12**: 481-483.

ISO/CD 20079 (2001) Water quality – Determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed growth inhibition test. International Organization for Standardization, Geneve, Switzerland.

Kadle ek, P., Rank, B., Ticha, I. J. (2003): Photosynthesis and photoprotection in *Nicotiana tabacum* L. in vitro grown plantlets. Plant Physiol. **130**: 1017–1024.

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

Kenrick, P. R., Crane, P. (1997): The origin and early diversification of land plants. A cladistic study. Smithsonian Institution Press, Washington & London. Washington: Smithsonian Inst. Press.

Krajn i , B., Devidé, Z. (1980): Report on photoperiodic responses in Lemnaceae from Slovenia, Berichte des Geobot. Inst. **47**: 75-86.

Lakatos, G., Mészáros, I., Bohátka, S., Szabó, S., Makadi, M., Csaltós, M., Langer, G. (1993): Application of *Lemna* species in ecotoxicological studies of heavy metals and organic biocides. Sci. Tot. Environ. Supplement: 773-778.

Landolt, E. (1986): The family of *Lemnaceae*: A monographic study (Vol. 1) Veröffentlichungen des Geobotanischen Institute des Eidg. Tech. Hochschule, Stiftung Rübel. Zürich. 71. Heft.

Landolt, E., Kandeler, R. (1987): Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae) (vol. 4). The family of Lemnaceae – A monographic study, vol.2. Veröff. Geobot. Inst. ETH, Zürich.

Lewis, M. A. (1995): Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: A review. Environ. Pollut. **87**: 319-336.

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

Osmond, C. B. (1994): What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. U: Bake N. R., Bowyer J. R. (ur.), Photoinhibition of Photosynthesis from Molecular Mechanisms to the Field. Bios Scientific Publisher, Oxford, UK, str. 1–24.

Perks, M. P., Monaghan, S., O'Reilly, C., Mitchell, D. T. (2001): Chlorophyll fluorescence characteristics, performance and survival of freshly lifted and cold stored Douglas-fir seedlings. Ann. Forest Sci. **58**: 225-235.

Perks, M. P., Osborne, B. A., Mitchell, DT. (2004): Rapid predictions of cold tolerance in Douglas-fir seedlings using chlorophyll fluorescence after freezing. New Forest. **28**: 49-62.

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

Pirson, A., Seidel, F. (1950): Zell- und stoffwechselphysiologische Untersuchungen an der Wurzel von *Lemna minor* unter besonderer Berücksichtigung von Kalium- und Calciummangel. Planta **38**: 431-473.

Quibit Systems Inc. (2006): Chlorophyll fluorescence Logger Pro 3 Version. Instructors manual, Kanada.

Ritchie, G. A. (2006): Chlorophyll Fluorescence: What Is It and What Do the Numbers Mean? USDA For. Serv. Proceedings RMRS-P **43**: 34-43.

Ritz, M., Thomas, J. C., Spilar A., Etienne, A. L. (2000): Kinetics of Photoacclimation in Response to a Shift to High Light of the Red Alga *Rhodella violacea* Adapted to Low Irradiance. Plant Physiol. **123**: 1415–1425.

Roger, R. R., Weiss, O. (2001): Fluorescence techniques, U: Reigosa R.M. (ur.) Handbook of Plant ecophysiology techniques, Kluwer Academic Publisher, The Netherlands.

Schreiber, U., Klughammer, C. (1994): An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700+-absorbance changes at 830 nm. Planta **192**: 261- 268.

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

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

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

Toth, N., Žutić, I., Novak, B., Benko, B., Herak-ustić, M. (2005): Utjecaj organskih mala eva na rast salate. Zbornik radova XL. znanstvenog skupa hrvatskih agronomova s međunarodnim sudjelovanjem, Osijek..

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

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

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

Internet:

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

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

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

<http://www.wikipedia.org>