

Učinak različitih osvjetljenja na rast i fotosintezu vodene leće (Lemna 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/urn:nbn:hr:217:341018>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-26**



Repository / Repozitorij:

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



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

Ivana Lozić

**UČINAK RAZLIČITIH OSVJETLJENJA NA RAST I
FOTOSINTEZU VODENE LEĆE (*Lemna minor* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2010. godina

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

Zahvala

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

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

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

I na kraju, hvala Nikoli na pomoći i podršci.

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

UČINAK RAZLIČITIH OSVJETLJENJA NA RAST I FOTOSINTEZU VODENE
LEĆE (*Lemna minor* L.)

IVANA LOZIĆ

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

U ovom radu je istraživana učinak različitih uvjeta osvjetljenja na rast i fotosintezu vodene leće (*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 žarulja „Cool White“, biljke su bile osvjetljene i fluorescentnom svjetlošću s većim udjelom crvenog i plavog dijela spektra žarulja „GroLux“. Rast vodene leće bio je nešto uspješniji pri višem intenzitetu svjetlosti dok razlike u rastu nisu zabilježene pri uvjetima osvjetljenja različitim 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. Učinkovitost fotosistema II na svijetlu nije se značajno razlikovala 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 značajnijih razlika u rastu i procesu fotosinteze između biljaka osvjetljivanih fluorescentnom svjetlošću s većim udjelom crvenog i plavog dijela u odnosu na hladnu bijelost svjetlost kao niti između dva primijenjena intenziteta osvjetljenja.

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

Rad je pohranjen u: Središnjoj biološkoj knjižnici

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

Voditelj: Dr. sc. Mirta Tkalec, doc.

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

Dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, redovni profesor

Dr.sc. Ines Radanović, izvanredan profesor

Rad prihvaćen: 10.02. 2010.

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 LOZIĆ

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

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

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

Thesis deposited in Central biological library

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

Supervisor: Dr. Mirta Tkalec, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Iva Juranović Cindrić, Asst. Prof.
Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Prof.
Dr. Ines Radanović, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 10th February 2010

SADRŽAJ

1. UVOD		1
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 leća (<i>Lemna minor</i> L.)		12
1.5. Lemna - test		12
2. CILJ ISTRAŽIVANJA		14
3. MATERIJALI I METODE		16
3.1. Materijal		17
3.1.1. Kultura vodene leće (<i>Lemna minor</i> L.) u uvjetima <i>in vitro</i>		17
3.1.2. Uvjeti osvjetljenja		18
3.2. Metode		20
3.2.1. Lemna - test		20
3.2.2. Sadržaj pigmenata		21
3.2.3. Mjerenje fluorescencije klorofila <i>a in vivo</i>		22
3.3. Statistička obrada		25
4. REZULTATI		26
4.1. Učinak različitih uvjeta osvjetljenja na stopu rasta vodene leće		27
4.2. Učinak različitih uvjeta osvjetljenja na sadržaj fotosintetskih pigmenata		31
4.3. Učinak različitih uvjeta osvjetljenja na fotosintezu		33
5. RASPRAVA		38
5.1. Učinak različitih uvjeta osvjetljenja na rast vodene leće		39
5.2. Učinak različitih uvjeta osvjetljenja na pigmente vodene leće		42
5.3. Utjecaj različitih uvjeta osvjetljenja na fotosintezu vodene leće		43
6. ZAKLJUČAK		48
7. LITERATURA		50

POPIS KRATICA

CW - CoolWhite žarulja

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

GL - GroLux žarulja

NADP⁺ - 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 koristeći svjetlosnu energiju.

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

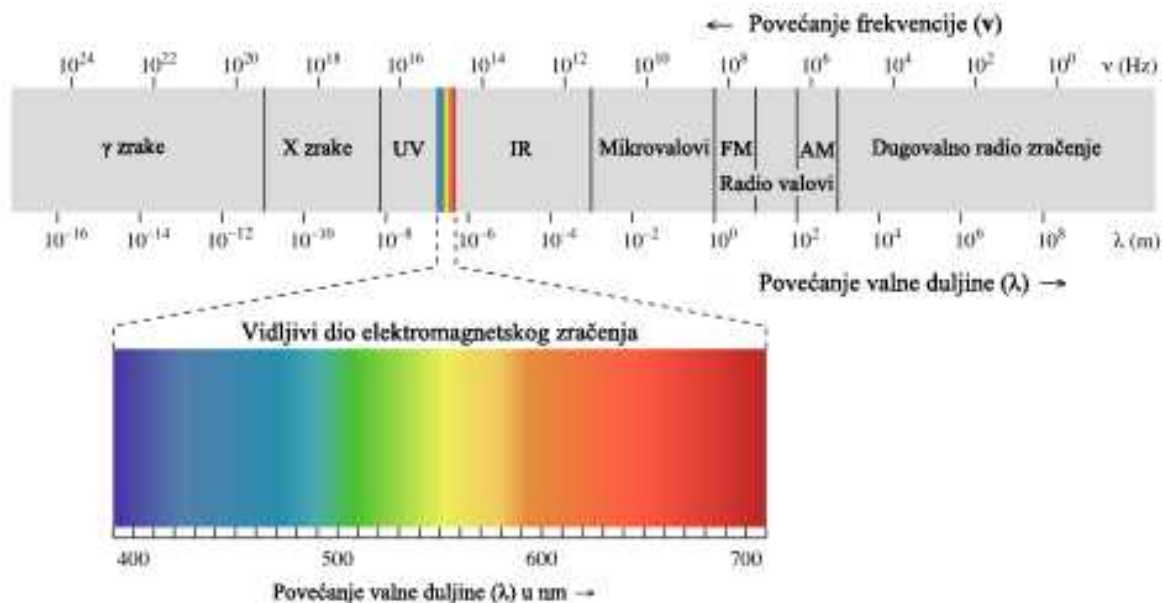
Biljke su statični organizmi kojima je za preživljavanje potrebna prilagodba na uvjete u kojima rastu. Kako se sunčeva svjetlost najviše sastoji od plavog i crvenog djela vidljivog spektra svjetlosti, biljke su se prilagodile na taj način da najefikasnije vrše fotosintezu koristeći upravo taj dio spektra. 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, čineći biljke zelenima.

Biljke se uzgajaju u različite svrhe, među ostalim i za istraživanje. Za uspješniji uzgoj biljaka razvijeni su izvori svjetlosti koji daju specifične svjetlosne spektre za najširu moguću uporabu, koji, samostalno ili u kombinaciji, daju najbolje rezultate za kompleksne biološke zahtjeve. Iz tog razloga odlučila sam istražiti njihov utjecaj na rast i fotosintezu vodene 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 (γ), rendgensko (X), ultraljubičasto (UV), vidljivo (VIS), infracrveno (IR), mikrovalno i radiovalno zračenje (Slika 1).

Svjetlost obuhvaća transversalno elektromagnetsko zračenje (električno i magnetsko polje mijenjaju se periodički u smjerovima okomitim na smjer gibanja vala) vidljivo ljudskom oku. Čovjek odlično razaznaje već vrlo male frekvencijske razlike (boje) u području vidljive svjetlosti. Najkraću 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 ljubičasti dio vidljivog spektra se najbolje apsorbira u biljku. Plava i ljubičasta svjetlost potrebne su za vegetativni rast i rast korijena, kao i mali, ali neznatjan, dio fotosinteze. Ubrzava fototropizam, koji daje usmjereni rast biljke prema izvoru svjetlosti. Plava svjetlost igra ulogu u modulaciji otvaranja i zatvaranja puči, a također je važna u fotoperiodizmu i pokretanju sezonskog cvjetanja. Samo u plavoj svjetlosti, bez crvenog dijela za fotosintezu, biljke otežano rastu dok ne potroše rezerve hrane nakon čega venu unatoč izloženosti plavoj svjetlosti (www.mobot.org...).

1.2. FOTOSINTEZA

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

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

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

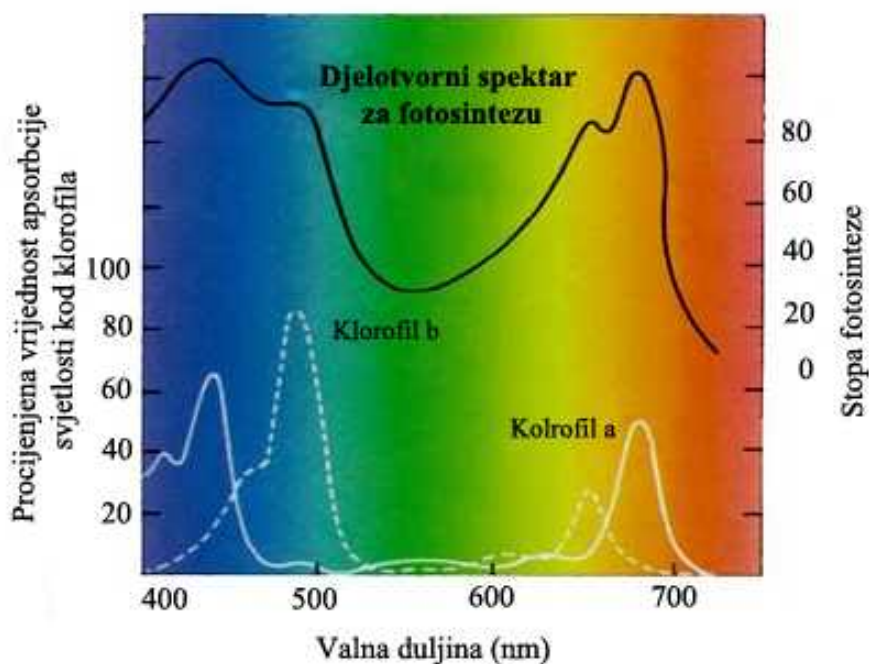
Svjetlost koju apsorbira klorofil pokreće prijenos elektrona od vode do akceptora elektrona NADP^+ i u tom se procesu cijepa voda te nastaje kisik i ATP. U reakcijama tame ATP se koristiti za redukciju CO_2 i sintezu šećera.

Djelotvoran dio spektra za fotosintezu je u području crvene i plave svjetlosti, dok se središnji dio spektra, koji odgovara zelenoj svjetlosti, ne koristi za fotosintezu. Iz toga se može zaključiti da u fotosintezi sudjeluju zeleni pigmenti, klorofili, koji apsorbiraju plavu i crvenu svjetlost. Središnji dio spektra, zelena svjetlost, ne koristi se u fotosintezi pa će 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 najveću ulogu klorofili, zeleni pigmenti u biljci. Razlikujemo četiri tipa klorofila, klorofil *a*, *b*, *c* i *d*.

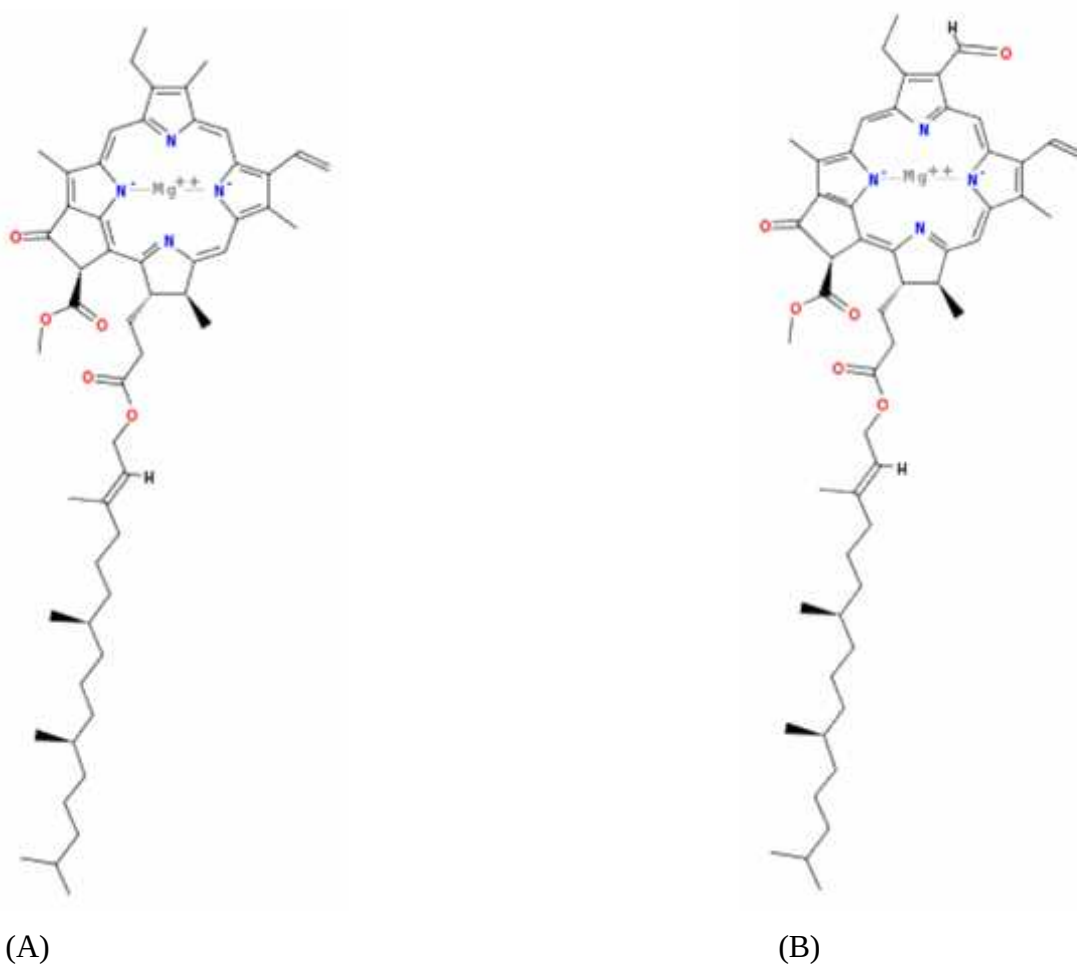
Najveće značenje u fotosintezi ima klorofil *a* jer jedino on može sudjelovati u svjetlosnim reakcijama koje Sunčevu energiju pretvaraju u kemijsku. Međutim, u fotosintezi sudjeluju i ostali pigmenti, zbog čega se djelotvorni spektar fotosinteze ne poklapa u potpunosti s djelotvornim spektrom klorofila *a* (Slika 2). Takvi pomoćni pigmenti su klorofil *b* i karotenoidi. Oni mogu apsorbirati svjetlost i prenositi energiju na klorofil *a*, koji se onda ponaša kao da je sam apsorbirao foton.



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

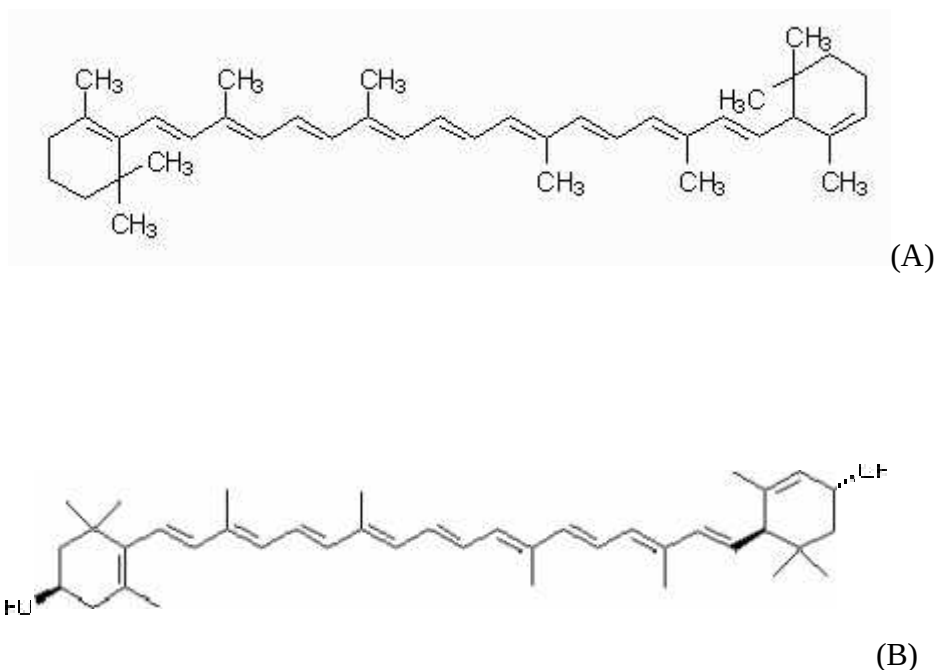
Klorofil *a* je plavozelene boje i maksimalno apsorbira svjetlost valnih duljina 430 nm i 662 nm, dok je klorofil *b* žutozelene boje, a maksimalno apsorbira svjetlost valnih duljina 453 nm i 642 nm. Osnovna struktura klorofila je porfirinski sustav koji čine četiri pirolska prstena međusobno povezana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

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



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

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



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

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

Karotenoidi se sintetiziraju isključivo u biljkama i gljivama, a prisutni su u svim fotosintetskim organizmima te imaju važnu ulogu u fotosintezi. Imaju karakterističnu žuto-narančastu boju, a najjače apsorbiraju svjetlost valnih duljina između 380 nm i 550 nm, proširujući 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. Učinkovitost tog prijenosa energije obično je niža nego kad se energija prenosi sa klorofila na klorofil. U većini biljaka, karotenoidi su slabo učinkoviti prenositelji energije.

Karotenoidi imaju i zaštitnu ulogu. Pigmenti apsorbiraju velike količine energije, što može oštetiti fotosintetske membrane ako se ta energija ne pohrani fotokemijski. Ako pobuđeno stanje klorofila brzo ne prestane, dolazi do reakcije s molekulom kisika i nastaje singletni kisik koji je vrlo reaktivan i može oštetiti mnoge stanične sastojke, osobito lipide. Karotenoidi djeluju zaštitno tako da brzo „ugase“ pobuđeno stanje klorofila. Pobuđeno 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 pobuđeno stanje klorofila odlučila sam mjeriti njihovu količinu jer se porast količine karotenoida može uzeti kao indikator stresnih uvjeta.

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

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

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

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

1.2.2. Utjecaj svjetlosti na stopu fotosinteze

Ovisnost fotosinteze o kvaliteti i količini svjetlosti je velika. Povećanjem intenziteta osvjetljenja brzina fotosinteze se u početku linearno povećava, zatim se postupno smanjuje i konačno, kada se fotosintetski aparat zasiti svjetlošću, poprima konstantnu vrijednost. U različitih vrsta to se zasićenje pojavljuje različitim brzinama. Još jače 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 prilagođene punoj sunčevoj svjetlosti. Kod biljaka sjene zasićenje se pojavljuje relativno brzo, a kod biljaka sunca tek pri visokom intenzitetu osvjetljenja.

Svjetlosni stres prvo djeluje na fotosintezu što se može uočiti kod neprilagođenih biljaka u kojima dolazi do oštećenja fotosintetskog aparata, uslijed čega 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 puči u uvjetima suše ili inaktivacija enzima uslijed visokih ili niskih temperatura, snažno pojačavaju fotoinhibiciju. Fotoinhibicija je posljedica svjetlosnog prezasićenja fotosintetskog aparata, što može dovesti do stvaranja toksičnih fotoprodukata kao što su singletni kisik, hidroksilni radikali i superoksidni anion.

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

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

U biljaka koje su bile izložene višem intenzitetu osvjetljenja uočeno je sniženje stope fotosinteze, smanjuje se prijenos elektrona i fotofosforilacija. Biljka se pokušava zaštititi tako da povećava količinu 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 također može biti štetan za biljke sunca koje onda ne mogu vršiti fotosintezu, ali i za biljke sjene kada apsorbirana svjetlost prevrši kapacitet

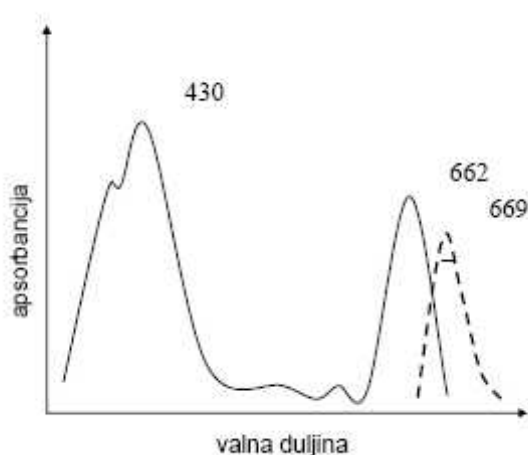
fotosintetskog aparata za pretvorbu svjetlosne energije u kemijsku (Osmond, 1994; Valladares i Pearcy, 1997).

1.3. FLUORESCENCIJA KLOROFILA A

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

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

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



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

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

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

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

Promatranja fluorescencije su prvi objavili Kautsky i Hirsch (1931) i pokazali da fluorescencija klorofila *a* ima brzi rast do maksimalne vrijednosti. Zatim slijedi polagani pad dok se nakon nekoliko minuta ne postigne stabilna razina. Također su pokazali da je polagani pad fluorescencije povezan s povećanjem asimilacije CO₂. Od otkrića „Kautsky efekta“ mjerenje fluorescencije klorofila razvijeno je kao jedna od najčešće korištenih metoda u istraživanju fotosinteze te fizičkog stanja fotosintetskog aparata u biljci. Danas se brojni pokazatelji fluorescencije klorofila koriste za određivanje fotosintetskog kapaciteta lista i funkcije fotosintetskog aparata, a promjena krivulje fluorescencije kod listova adaptiranih na mrak daje važne informacije o sakupljanju svjetlosne energije, transportu elektrona, energetici tilakoidne membrane i procesima CO₂ fiksacije (Babani i Lichtenthaler, 1996).

1.4. VODENA LEĆA (*Lemna minor* L)

Vodene leće su kozmopolitske biljke iz porodice *Lemnaceae*. To su male vodene biljke koje rastu slobodno plivajući na površini vode ili neposredno ispod nje, ali nisu nikada pričvršćene 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 četiri roda: *Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia* i *Wolffiella* (Boniardi i sur., 1994).

Biljke iz porodice *Lemnaceae* imaju tri važne karakteristike. Prva je poseban način njihovog vegetativnog razmnožavanja. Svaki listić ima dvije meristemske regije koje stvaraju nove listiće. Svaki listić može stvoriti 10-20 novih biljaka nakon čega tkivo matične biljke propada. Druga karakteristika je ta što listići ne ostaju trajno povezani sa majčinskom biljkom čineći kompleksne strukture, već se odvajaju u kolonije koje predstavljaju svega nekoliko vegetativnih generacija. Treća karakteristika je značajna progresivna redukcija svih struktura koje nisu esencijalne za život na površini ili neposredno ispod površine stajaćih voda te gotovo potpuno odsustvo drvenastog tkiva (Hillman i Culley, 1978).

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

Lemna minor ima samo jedan korijen koji vjerojatno služi za održavanje ravnoteže pri blagim strujanjima vode te sprječava sljepljivanje i preklapanje listića što bi smanjilo količinu svjetlosti u koloniji (Landolt, 1986).

1.5. LEMNA -TEST

Kao pokazatelj učinka različitih uvjeta osvjetljenja, u ovom istraživanju sam koristila Lemna-test koji se često koristi za procjenu stresnih učinaka (Wang, 1991).

Od viših biljaka se kao testni organizmi često koriste vodene biljke, i to osobito iz porodice vodenih leća, *Lemnaceae*. Razlog tome je što su vodene leće 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 građe i imaju vegetativan način razmnožavanja kojim nastaju genetički identične biljke (klonovi). Također, sterilni i dobro definirani uvjeti

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

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

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

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

Fotosinteza je biološki važan proces u kojem fotoautotrofni organizmi koriste energiju Sunčevog zračenja 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 utječu brojni vanjski čimbenici, među kojima su kvaliteta i intenzitet osvjetljenja, odlučila sam istražiti kakav će učinak na fotosintezu imati izlaganje biljke različitim svjetlosnim uvjetima.

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

Kako bih istražila učinak različitih uvjeta osvjetljenja na rast vodene leće provela sam standardizirani Lemna-test u sklopu kojeg sam pratila prirast broja listića te biomase vodene leće *Lemna minor* L. Učinak svjetlosti na fotosintezu pratila sam određujući 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 (Krajncić 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 ₃	400	3,95	KNO ₃	350	3,46
KH ₂ PO ₄	200	1,47	KH ₂ PO ₄	90	0,66
			K ₂ HPO ₄	12,6	0,072
MgSO ₄ ×7H ₂ O	300	1,21	MgSO ₄ ×7H ₂ O	100	0,41
CaCl ₂ ×2H ₂ O	804	5,46	Ca(NO ₃) ₂ ×4H ₂ O	295	1,25
MIKROELEMENTI	µg/L	µmol/L	MIKROELEMENTI	µg/L	µmol/L
MnCl ₂ ×4H ₂ O	300	1,5	MnCl ₂ ×4H ₂ O	180	0,91
H ₃ BO ₃	500	8,1	H ₃ BO ₃	120	1,94
Na ₂ -EDTA×2H ₂ O	1860	4,99	Na ₂ -EDTA×2H ₂ O	1500	4,03
željezni citrat	5000	20	FeCl ₃ ×6H ₂ O	760	2,81
			Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	44	0,18
			ZnSO ₄ ×7H ₂ O	180	0,63
ORGANSKI DODACI	g/L	mmol/L			
saharoza	10	29,2			
asparagin	0,1	0,66			

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

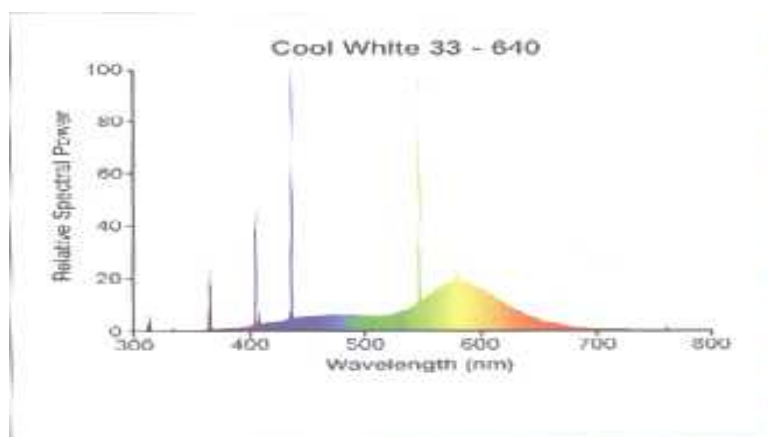
U pokusima sam koristila Erlenmeyerove tikvice od 100 ml koje sam punila s oko 60 ml hranjive podloge, začepila vatom i aluminijskom folijom te sterilizirala autoklaviranjem pri temperaturi od 120 °C i tlaku od 0,15 MPa u trajanju od 18 minuta. Metalni i ostali pribor sterilizirala sam autoklaviranjem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

Biljke sam presađivala u laminaru (komori s horizontalnim strujanjem zraka). U svaku Erlenmeyerovu tikvicu sam inokulirala po jednu koloniju vodene leće (s 3-5 listića) iz prethodno uzgojene kulture na podlozi za prilagodbu. Biljke sam nakon presađivanja prenijela u klima komoru gdje su rasle uz fotoperiod od 16 sati svjetla i 8 sati tame. Temperatura u komori iznosila je 24 ± 2 °C.

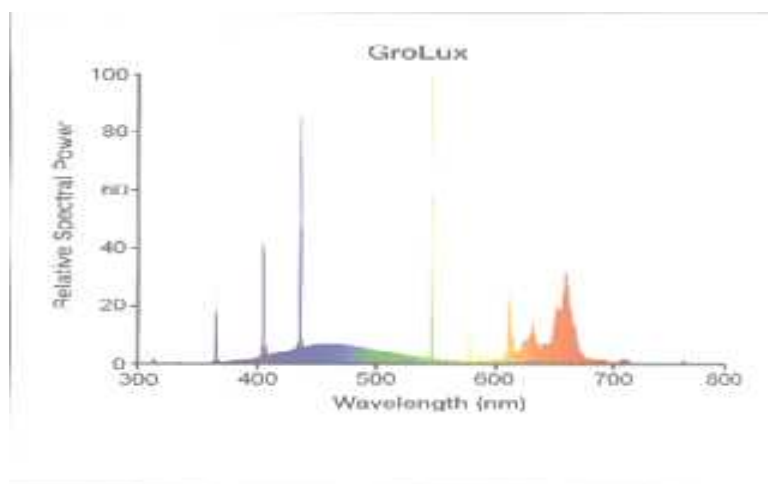
3.1.2. Uvjeti osvjetljenja

Kako bih ispitala učinak različitih intenziteta fluorescentnog osvjetljenja s različitim djelotvornim spektrom osvjetljenja, biljke su u klima komori podvrgnute različitim uvjetima osvjetljenja.

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



Slika 6. Spektar hladne bijele svjetlosti žarulje „Cool White“ (Preuzeto sa internetske stranice www.sylvania-lamps.com)



Slika 7. Spektar „GroLux“ žarulje s većim udjelom crvenog i plavog dijela spektra (Preuzeto sa internetske stranice 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

Učinak različitih uvjeta osvjetljenja određivala sam prateći rast biljaka *Lemna* testom, a učinak na fotosintezu određivala sam mjereći sadržaj fotosintetskih pigmenata i pokazatelje fluorescencije klorofila.

3.2.1. LEMNA-TEST

Rast vodenih leća praćen je korištenjem standardiziranog statičnog Lemna testa (ISO/CD 20079). Za razliku od standardiziranog Lemna testa koji prati rast biljaka kroz 7 dana, u ovom istraživanju sam pratila rast vodene leće 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 masa svježe i suhe tvari.

Stopa rasta vodene leće- broj biljaka

Učinak različitih uvjeta osvjetljenja na rast vodene leće *Lemna minor* L. procijenjen je određivanjem stope rasta broja listića vodene leće tijekom 14 dana.

Stopa rasta broja biljaka određena je brojanjem listića vodene leće 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 nasađivanja)

N_n = broj biljaka n-ti dan

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

Stopa rasta vodene leće- masa svježe tvari

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

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

m_0 = broj biljaka nulti dan

m_n = broj biljaka n-ti dan

nulti dan = dan nasađivanja

$n = 7$

Omjer mase suhe i svježe tvari

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

3.2.2 SADRŽAJ PIGMENATA

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

a) za klorofil *a*:

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

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

A_X = apsorbancija uzoraka pri određenim valnim duljinama

V = volumen uzorka (ml)

l = duljina optičkog puta = 1 cm

m = masa uzorka = 0,03 g

b) za klorofil *b*:

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

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

c) za ukupne karotenoide:

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

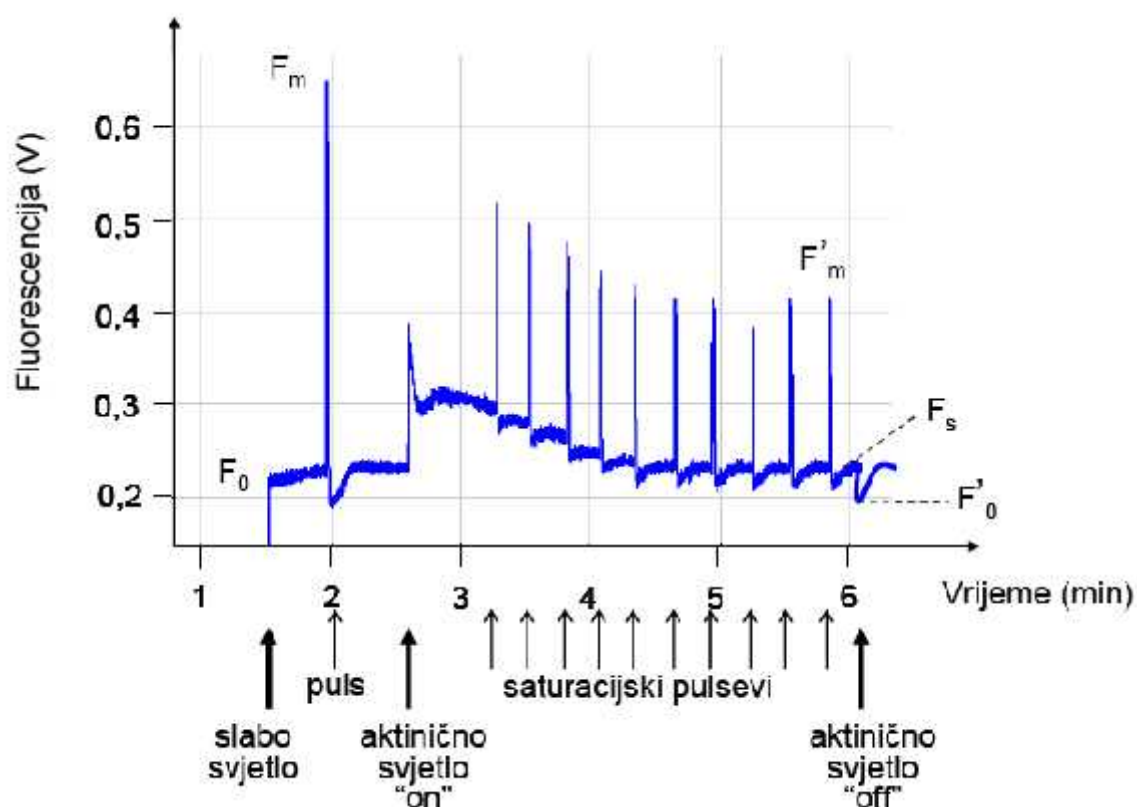
- c_k = sadržaj ukupnih karotenoida (mg / g svježe tvari)
 A_X = apsorbancija uzoraka pri određenim valnim duljinama
 V = volumen uzorka (ml)
 l = duljina optičkog puta = 1 cm
 m = masa uzorka = 0,03 g

3.2.3. Mjerenje fluorescencije klorofila *a in vivo*

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

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

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



Slika 8. Mjerenje fluorescencije klorofila metodom saturacijskog pulsa

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

strane PSII i rezultat koje je maksimalna vrijednost fluorescencije, F_m . U tom trenutku nije prisutno fotokemijsko gašenje fluorescencije. Iz izmjerenih vrijednosti F_0 i F_m izračunava se optimalna učinkovitost PSII.

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

Aktinično 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 aktinične svjetlosti te saturacijskih pulseva koristi se halogena lampa, čiji je intenzitet osvjtljenja 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 vrlo niskog intenziteta kako bi se dobila vrijednost F_0 .

Ista mjerenja sam izvela pri aktiničkom 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 Φ_{PSII} , rel. ETR i NPQ.

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

1. Optimalni prinos PSII (maksimalna učinkovitost 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 učinkovitosti u uvjetima kada su svi reakcijski centri oksidirani. Za većinu biljnih vrsta optimalna vrijednost iznosi $\approx 0,83$.

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

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

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

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

3. Stopa prijenosa elektrona (ETR):

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

Budući da Φ_{PSII} predstavlja efektivnu učinkovitost fotokemijske reakcije na PSII, ta se vrijednost može koristiti za izračun stope necikličkog 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 računalnog programa STATISTICA 8.0 (Stat Soft Inc., SAD).

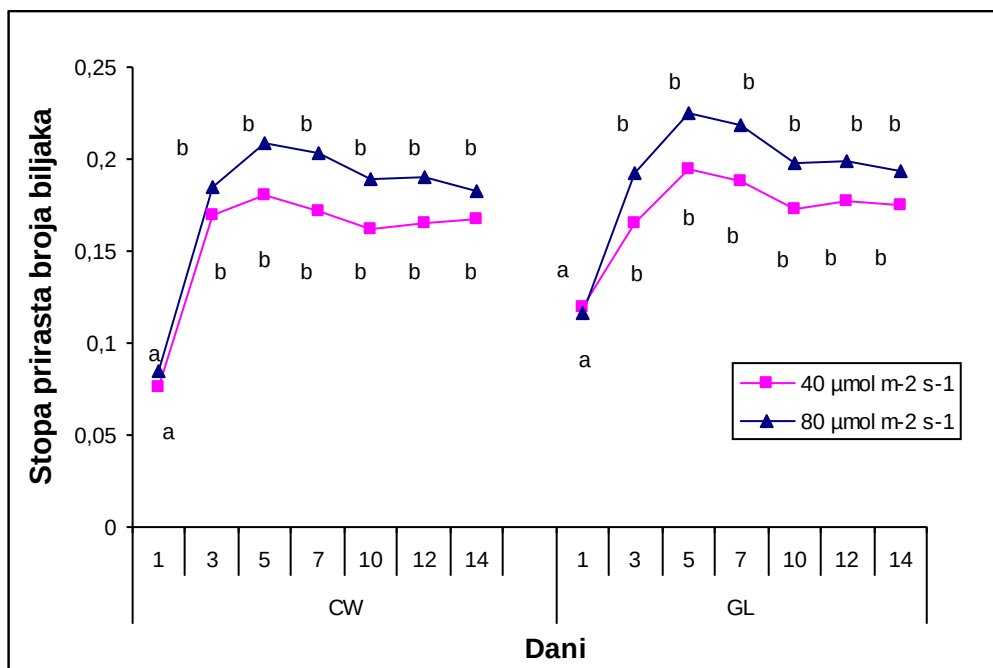
4.1. UČINAK RAZLIČITIH UVJETA OSVJETLJENJA NA STOPU RASTA VODENE LEĆE

Učinak različitih uvjeta osvjetljenja na vodenu leću *Lemna minor* L. istražen je provođenjem statičkog Lemna- testa. Biljke su nasadene na hranjivu podlogu po Steinbergu te inkubirane u klima komori pri 4 različita 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 listića

Broj listića vodene leće eksponencijalno je rastao pri svim istraženim uvjetima osvjetljenja tijekom 14 dana uzgoja.

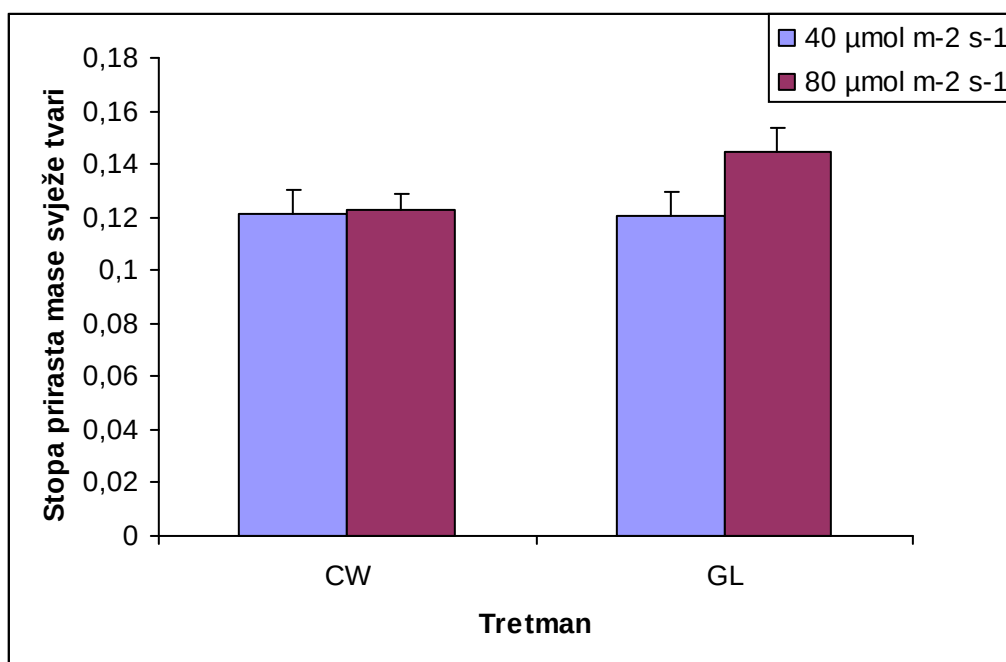
Neovisno o tipu i intenzitetu osvjetljenja, vodene leće su pokazale značajan porast broja listića već trećeg dana pokusa (pri osvjetljenju CW40 za 123%, CW80 za 118%, GL40 za 38% i GL80 za 65%). Slična stopa prirasta broja biljaka zadržala se svih 14 dana pokusa, bez značajnije razlike između pojedinih 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. Različita slova označavaju statistički značajne rezultate ($p \leq 0,05$, Newman Keuls).

Stopa prirasta mase svježe tvari

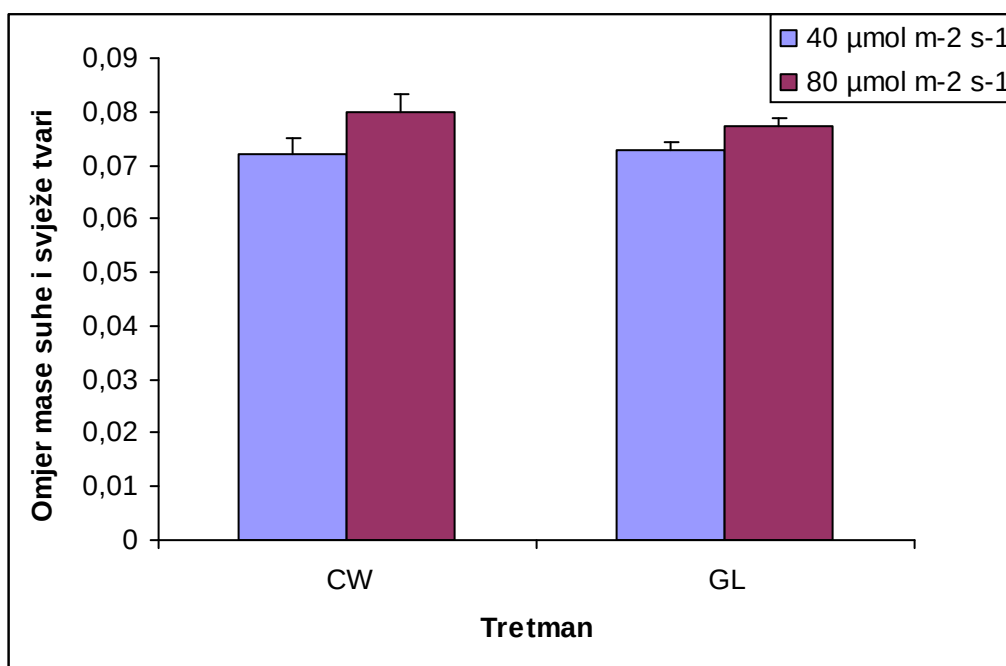
Izlaganje različitim uvjetima osvjetljenja nije značajno utjecalo na stopu prirasta mase svježe tvari. Nakon 7 dana uzgoja uz osvjetljenje „Cool White“ žaruljama prirast mase svježe tvari bio je podjednak pri oba istražena intenziteta osvjetljenja. Uz osvjetljenje „GroLux“ žaruljama s većim udjelom crvenog i plavog dijela spektra, stopa prirasta mase svježe tvari porasla je s 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

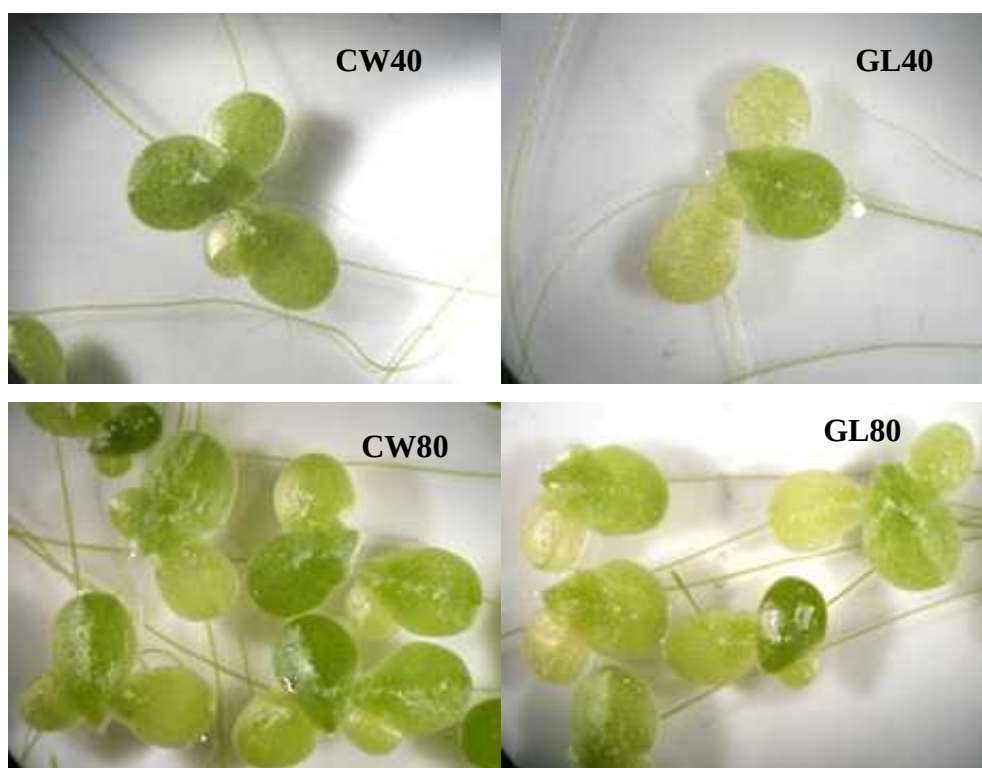
Omjer mase suhe i svježe tvari nakon 7 dana uzgoja pri osvjetljenju GroLux žaruljom nije se značajnije razlikovao od onog u biljaka osvjetljenih „Cool White“ žaruljom (Slika 11). Izlaganje višim intenzitetima (80 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$) oba tipa osvjetljenja rezultiralo je jedva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



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

4.2. UČINAK RAZLIČITIH UVJETA OSVJETLJENJA NA SADRŽAJ FOTOSINTETSKIH PIGMENATA

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



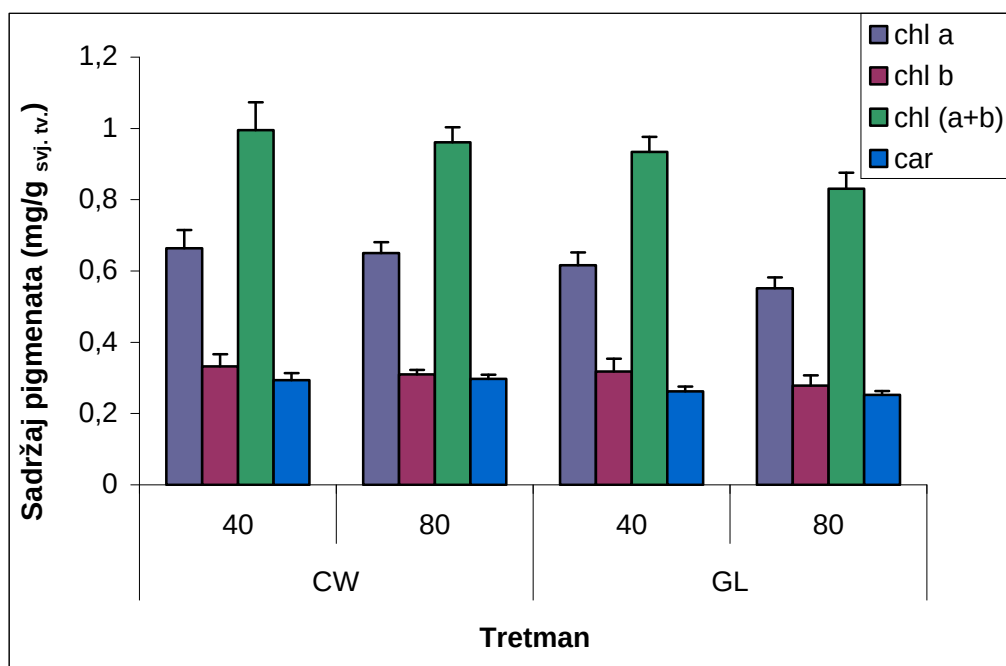
Slika 12. Vodene leće nakon 7 dana uzgoja na hranjivoj podlozi po Steinbergu pri uvjetima višeg i nižeg intenziteta (40 i 80 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bijele svjetlosti „Cool White“ žarulja (CW40 i CW80) te crvene svjetlosti „GroLux“ žarulja (GL40 i GL80).

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

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

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

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



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

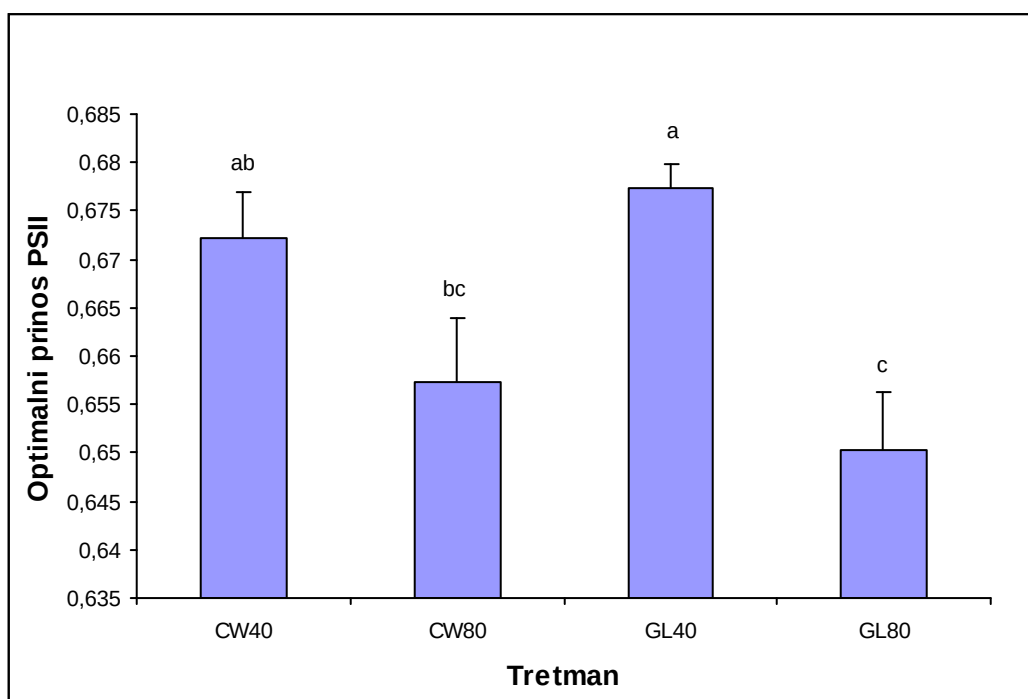
4.3. UČINAK RAZLIČITIH UVJETA OSVJETLJENJA NA FOTOSINTEZU

Kako bih istražila učinak svjetlosti na fotosintezu, biljke sam izložila različitim uvjetima osvjetljenja te nakon 7 dana izmjerila fluorescenciju klorofila *a in vivo*. Iz izmjerenih podataka odredila sam učinkovitost PSII na temelju sljedećih fizioloških pokazatelja: optimalnog prinosa PSII, efektivne učinkovitosti 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 leći iznosi od 0,65 do 0,67.

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

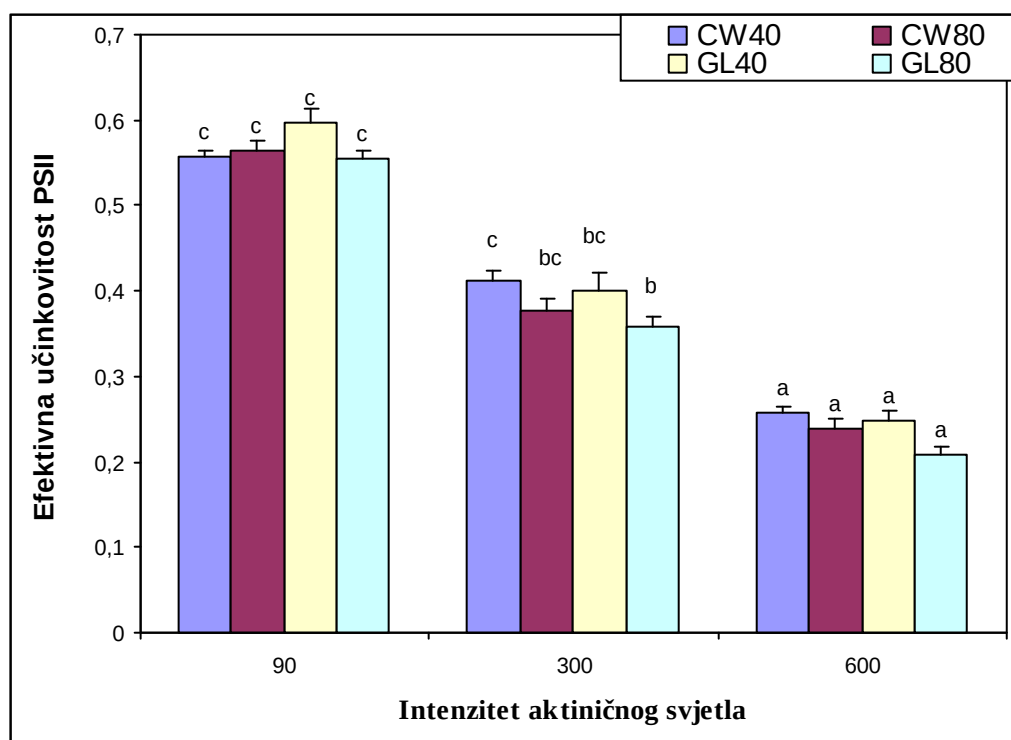


Slika 14. Optimalni prinos PSII (Fv/Fm) u biljaka uzgajanih na hranjivoj podlozi po Steinbergu pri intenzitetu 40 i 80 $\mu\text{mol fotona m}^{-2}\text{s}^{-1}$ bijele svjetlosti „Cool White“ žarulja (CW) i crvene svjetlosti „GroLux“ žarulja (GL) tijekom sedam dana. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti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

Statistički značajno 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 učinkovitost PSII

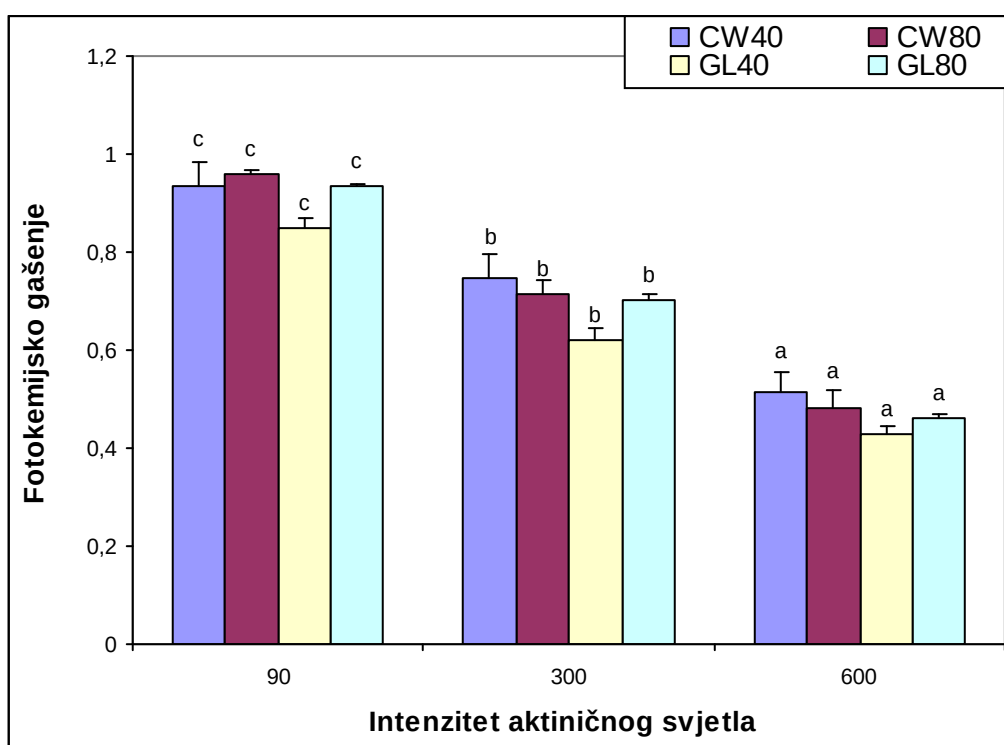
S povećanjem intenziteta aktiničkog svjetla dolazi do smanjenja efektivne učinkovitosti PSII kod svih tretmana (za 35-118% kod CW40, 50-137% kod CW80, 49-140% kod GL40 te za 55-165% kod GL80). Pri različitim intenzitetima aktiničkog svjetla nema statistički značajne razlike u efektivnoj učinkovitosti 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 različitim slovima međusobno se značajno razlikuju ($p \leq 0,05$, Newman Keuls).

Fotokemijsko gašenje

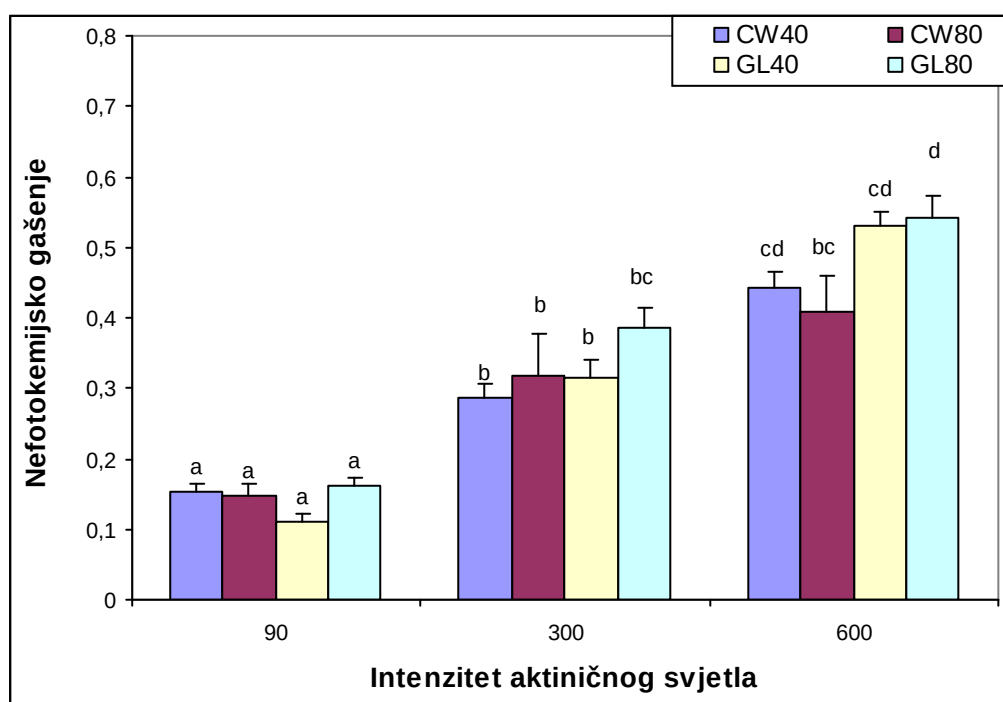
S porastom intenziteta aktiničnog svjetla fotokemijsko gašenje (Slika 16) se smanjuje (za 25-81% kod CW40, 34-99% kod CW80, 37-97% kod GL40 i za 33-102% kod GL80) pri čemu nema značajne razlike između pojedinih tretmana pri pojedinom intenzitetu aktiničke svjetlosti. Vrijednosti su nešto malo veće u biljaka izloženih bijeloj svjetlosti (CW) te većem intenzitetu crvene svjetlosti (GL80) pri aktiničkom 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 označeni različitim slovima međusobno se značajno razlikuju ($p \leq 0,05$, Newman Keuls).

Nefotokemijsko gašenje

S porastom intenziteta aktiničnog svjetla značajno 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 među pojedinim uvjetima osvjetljenja primijećena je jedino pri najvišem istraženom intenzitetu osvjetljenja ($600 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$) gdje je veći udio plave i crvene svjetlosti (GL) rezultirao većim nefotokemijskim gašenjem u odnosu na hladno bijelo osvjetljenje (CW).

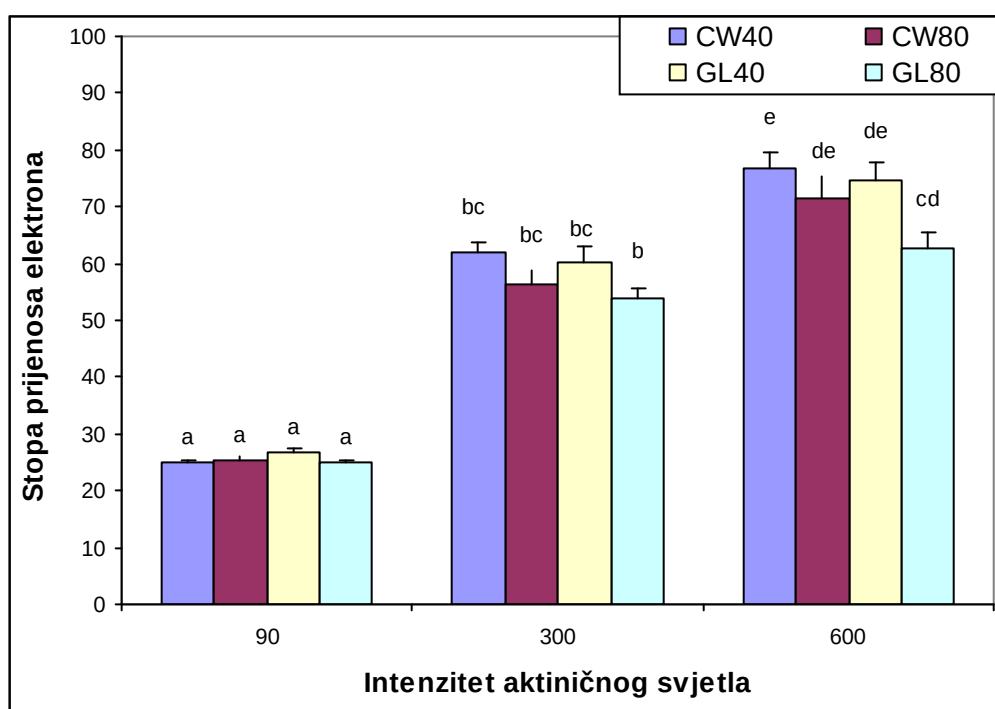


Slika 17. Nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ) u biljaka uzgajanih na hranjivoj podlozi po Steinbergu tijekom sedam dana pri različitim intenzitetima svjetlosti (40 i $80 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$) „Cool White“ (CW) i „GroLux“ (GL) žarulja. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti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

Stopa prijenosa elektrona

S povećanjem intenziteta aktiničnog svjetla značajno se povećala stopa prijenosa elektrona; tako se pri osvjetljenju GL40 povećala za 123-178%, GL80 za 116-151%, CW40 za 147-206% i CW80 za 123-182% (Slika 18).

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



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

5.1. UČINAK RAZLIČITIH UVJETA OSVJETLJENJA NA RAST VODENE LEĆE

Rast vodene leće praćen je korištenjem standardiziranog statičnog Lemna testa. Kao osnovni parametar mjeri se broj listića, uz što je obavezno mjeriti drugi parametar koji može biti površina listića ili masa suhe tvari (ISO/CD 20079). Po ISO standardu biljke se uzgajaju na podlozi po Steinbergu, a vrijeme trajanja testa je 7 dana tijekom kojeg rast mora biti eksponencijalan. Kultura vodene leće *in vitro* održava se uzgajanjem biljaka na PS podlozi, a zatim se prije eksperimenta prebacuje na podlogu po Steinbergu tijekom dvije subkulture pa iz tog razloga provodim usporedbu rasta biljaka na te dvije podloge. Vrijeme trajanja testa produženo je na 14 dana kako bih ustanovila hoće li 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 ± 2 °C. Intenzitet svjetla kojem je vodena leća izlagana tijekom održavanja matičnih 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 učinak različitog osvjetljenja na vodenu leću.

Nakon izlaganja različitim uvjetima osvjetljenja, broj biljaka je značajno 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, apsolutni 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 d^{-1} , što je za 31% više nego li je postignuto na podlozi po Steinbergu pri istom intenzitetu svjetlosti.

Bolji rast na PS podlozi dobiven je također i u istraživanju učinka kadmija na vodenu leću (Šarić, 2001). Vodene leće su bile uzgajane na PS podlozi gdje su jako dobro napredovale. Broj biljaka u kulturi se povećao, a listići su bili intenzivno zelene boje. U ovom radu listići biljaka koje su rasle na podlozi po Steinbergu bili su svjetlije 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 mikro-elemenata više.

Poznato je da *Lemnaceae* mogu rasti u širokom rasponu koncentracija hranjivih tvari, čak i u destiliranoj vodi. Iako mogu preživjeti danima i tjednima, koristeći hranjive tvari akumulirane u starijim listićima, dugotrajni kontinuirani prirast rasta moguć 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 korjenčiće, a frondovi su veći i tanji. Sličan učinak primijećen je kod niskih koncentracija nitrata i fosfata, a dodatkom saharoze taj se učinak poništava (Landolt i Kandeler, 1987). Hranjiva podoga po Steinbergu u odnosu na PS podlogu ima niže vrijednosti većine makro- i mikro-elemenata, a poznato je da subotimalne koncentracije dušika i fosfata te klora mogu dovesti do smanjene stope rasta i nižeg sadržaja klorofila (Landolt i Kandeler, 1987), što je primijećeno i u ovom radu u odnosu na biljke koje su rasle na PS podlozi. Također, kao što sam već spomenula, PS podloga ima dodatak saharoze i aminokiseline asparagina za koje je poznato da mogu imati pozitivne učinke 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 moguću suboptimalnu količinu hranjivih tvari, manji prirast biljaka može biti i posljedica suboptimalnog intenziteta svjetlosti pri kojem su vodene leće uzgajane. Poznato je da su visoki intenziteti svjetlosti potrebni za fotosintezu, a to će osim o vrsti biljke ovisiti i o temperaturi te količini hranjivih tvari i ugljičnog 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 veći prirast. Poznato je da biljke iz porodice *Lemnaceae* mogu koristiti ugljikohidrate kao izvore energije u nedovoljnim uvjetima osvjetljenja i skoro sve vrste koje rastu u takvim uvjetima osvjetljenja rastu brže ako se u podlogu doda saharoza (Landolt i Kandeler, 1987). To se u potpunosti slaže s mojim rezultatima rasta dobivenim na podlozi po Steinbergu u usporedbi s rastom na PS podlozi u kojoj ima saharoze (Šarić, 2001).

O učinku saharoze na otpornost biljke također govore istraživanja na duhanu čiji rezultati pokazuju da saharoza dodana u podlogu poboljšava otpornost biljaka na stres, ali su učinci saharoze ovisni o njenoj koncentraciji (Kadleček i sur., 2003).

Stimulacija fotoreceptora za plavu, crvenu i ultraljubičastu svjetlost, bilo pojedinačno ili u kombinaciji, uzrokuje fotomorfogeni razvoj (McNellis i Deng, 1995). Kako bih potvrdila tu teoriju, u ovom radu sam vodenu leću, aklimatiziranu na uvjete nižeg intenziteta bijelog svjetla ($40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$), osim izlaganja višem intenzitetu ($80 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$) uobičajene fluorescentne hladne bijele svjetlosti žarulja "Cool White" (CW), izlagala i višem te nižem intenzitetu (40 i $80 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fluorescentne svjetlosti s većim udjelom crvenog i plavog dijela spektra žarulja „GroLux“ (GL). Budući da je prilikom uzgoja vodene leće na višem intenzitetu ($80 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$) prirast broja biljaka stalno ujednačeno

rastao, možemo govoriti o aklimatizaciji na nove uvjete. Također, prirast je bio nešto veći nego prirast zabilježen pri nižem intenzitetu svjetlosti na kojem su biljke uobičajeno uzgajane. Slični rezultati dobiveni su na crvenim algama (Ritz i sur., 2000). Alge su se potpuno aklimatizirale na tri različita 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 različite karakteristike. Rasle su različitim brzinama, s time da je maksimalna brzina nađena za stanice uzgojene pri visokom intenzitetu, dok su stanice uzgojene na niskom intenzitetu bile ograničene svjetlošću. 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 primijećena je odgoda u početku rasta premještenih stanica. Zatim je uslijedio rast brzinom kojom su rasle i stanice prvotno uzgajane na tim intenzitetima, što govori o aklimatizaciji na nove uvjete. U mojem istraživanju najviši intenzitet svjetlosti kojem je vodena leća 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 početku, kao što je bio slučaj kod crvenih algi. Ta odgoda rasta je mogući rezultat stresa induciranog povećanjem 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...), očekivala sam višu stopu rasta vodene leće uz osvjetljenje „GroLux“ žaruljama koje sadrže povećani udio tog djela spektra vidljive svjetlosti. Rezultati istraživanja su pokazali da postoji mali, ali ne i statistički značajan porast stope prirasta broja vodene leće pri osvjetljenju ovim žaruljama (GL40 od 7% i GL80 od 8%), što je najbolje vidljivo petog dana pokusa, te kod prirasta mase svježije tvari (povećanje od 18% pri GL80).

Istraživanja provedena na rajčici pokazala su također bolji rast biljaka osvjetljenih „GroLux“ žaruljom, što je objašnjeno upravo povišenim intenzitetom crvenog i plavog dijela spektra „GroLux“ žarulje. Međutim, još bolji rast dobiven je izlaganjem rajčice lampama sa većim intenzitetima crvene i daleke crvene svjetlosti. Trajanje testiranja i ukupan intenzitet svjetlosti također igraju ulogu u određivanju spektralnih karakteristika koje daju najbolji rast. (Thomas i Dunn, 1967).

S obzirom da ponekad samo jedan pokazatelj ne može odrediti točan učinak na rast, pratila sam još dva pokazatelja rasta vodene leće. Osim prirasta broja biljaka, pratila sam prirast mase svježije tvari te omjer mase suhe i svježije tvari. Prirast broja biljaka i mase svježije tvari pokazali su se podjednako osjetljivi u mojem slučaju jer su pokazali slične razlike pri

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

5.2. UČINAK RAZLIČITIH UVJETA OSVJETLJENJA NA PIGMENTE VODENE LEĆE

Ako usporedimo koncentracije pigmenata vodene leće, 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 listići biljaka uzgajanih na podlozi po Steinbergu bili svjetlije zelene boje te su pokazivali blagu klorotičnost, osobito pri višem intenzitetu osvjetljenja (slika 12).

Osim razlike u sadržaju saharoze te aminokiseline asparagina, važna razlika između PS podloge i podloge po Steinbergu je i u količini helirajućih tvari. Naime, prva osim EDTA sadrži i citrat, a poznato je da helirajuće tvari u podlozi čine 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 klorozi primijećenoj kod biljaka na Steinbergovoj podlozi. Kloroza može biti posljedica smanjene biosinteze, i/ili povećane razgradnje klorofila (Pevalek-Kozlina, 2003). Kako je kloroza u vodenih leća bila najizraženija u novonastalim biljkama primijećeno 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 određivanjem ovih tvari u vodenoj leći. Primijećeno povećanje karotenoida u odnosu na PS podlogu može se povezati sa nepovoljnim uvjetima rasta koji su stresni za biljku. Naime, poznato je da se biljka pokušava zaštititi od stresnih uvjeta tako da povećava količinu 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 najjače apsorbiraju svjetlost valnih duljina između 380 nm i 550 nm pa služe i kao pomoćni pigmenti koji povećavaju akcijski spektar fotosinteze (Pevalek-Kozlina, 2003). Međutim, s obzirom da je i klorofil *b* pomoćni pigment, neobično je da se nije povećala i njegova koncentracija.

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

5.3. UTJECAJ RAZLIČITIH UVJETA OSVJETLJENJA NA FOTOSINTEZU VODENE LEĆE

Lee i sur. (2007) pokazali su da fluorescentno osvijetljenje sa visokim udjelom plave i crvene svjetlosti potiče fotosintezu. Zaključili su da količina i kvaliteta svjetlosti utječu na razvoj puči, 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 efikasnoj neradijativnoj disipaciji apsorbirane svjetlosne energije unutar PSII antene (Štroch i sur., 2008), bilo je za očekivati da izlaganje vodene leće povišenom intenzitetu od svega 80 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ neće prouzrokovati veće štete fotosintetskog aparata.

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

Ritchie (2006) je proveo istraživanje na golosjemenjači *Pseudotsuga menziesii* kroz jednogodišnji ciklus rasta. Korišten je PAM fluorometar koji daje iste vrijednosti kao i fluorometar Kautskijevog tipa. U vrijeme sadnje, F_0 je varirao od 0,2 do 0,4, što se smatra normalnim za većinu biljaka, a takva vrijednost je dobivena i u mojem istraživanju na vodenoj leći. 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 leće 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 leće. To je dokaz da su stanice vodene leće bile zdrave i sposobne za gašenje svjetlosne energije što inače nije moguće kod ubijenih ili oštećenih stanica (Ritchie, 2006).

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

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

Iz podataka o fluorescenciji ravnotežnog stanja (F_s) te maksimalnoj fluorescenciji (F_m) izračunala sam efektivnu učinkovitost PSII (Φ_{PSII}). S obzirom da su intenziteti svjetlosti kojima je vodena leća bila izlagana relativno niski, očekivala sam da će se pri većem intenzitetu svjetlosti povećati i stopa fotosinteze koja je proporcionalna učinkovitosti PSII. Međutim, u vodenoj leći je kod viših intenziteta aktiničke svjetlosti došlo do izrazitog smanjenja učinkovitosti PSII. Smanjena efektivna učinkovitost ukazuje da je iz nekog razloga došlo do zasićenja fotosinteze već pri nižim intenzitetima osvjetljenja. Nisam primijetila značajne razlike između različitih uvjeta osvjetljenja iako je učinkovitost bila nešto manja kod višeg intenziteta i kod „GroLux“ žarulje. Budući da je efektivna učinkovitost mjera udjela svjetlosti apsorbirane klorofilom vezanim uz PSII i energije iskorištene u fotokemijskim reakcijama, dobiveni rezultati ukazuju da se u istraživanim uvjetima ne može povećati udio svjetlosti apsorbirane klorofilom. To opet ukazuje na nedostatak molekula klorofila koji bi tu svjetlost apsorbirale što se poklapa i s rezultatima sadržaja klorofila. Dakle, kod većih intenziteta sve je manji udio svjetlosti apsorbirane klorofilom vezanim uz PSII i energije iskorištene u fotokemijskim reakcijama, tj. nastaje preveliko opterećenje za postojeću količinu klorofila. Do smanjenja učinkovitosti PSII dolazi i kod biljaka koje rastu na vrlo visokom intenzitetu svjetlosti, od otprilike $1000 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pa je apsorbirana energija fotona previsoka u usporedbi sa stopom fotosinteze, odnosno fotosinteza je limitirana količinom CO_2 koja kroz puči 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 učinkovitost PSII koristila sam za izračun stope necikličkog prijenosa elektrona. S povećanjem intenziteta aktiničkog svjetla značajno se povećala stopa prijenosa elektrona. Ovi rezultati su zanimljivi jer pokazuju da se stopa prijenosa elektrona zasićuje kod većih vrijednosti intenziteta aktiničkog svjetla nego stopa fotosinteze. Stopa prijenosa elektrona (ETR) predstavlja relativnu količinu elektrona koji prolaze kroz PSII tijekom ravnotežnog stanja fluorescencije. Primijećeno smanjenje stope prijenosa elektrona kod biljaka koje su rasle pri $80 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ u odnosu na biljke koje su rasle pri $40 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$, osobito kod „GroLux“ žarulja, može se opet povezati sa smanjenom količinom klorofila i smanjenom učinkovitosti hvatanja energije.

Ako usporedimo vrijednosti fotokemijskog gašenja (qP) i nefotokemijskog gašenja (NPQ) sa vrijednostima koje je Ritchie (2006) dobio u svojim istraživanjima, možemo zaključiti da su također 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 vodenoj leći (oko 0,2) su se razlikovale od onih koje je dobio Ritchie (oko 0,5).

S povećanjem intenziteta aktiničnog svjetla dolazilo je do postupnog smanjivanja qP, što je bilo za očekivati s obzirom da su vodena leća 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 leća 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 povećavalo sa povećanjem intenziteta aktiničnog svjetla što je posljedica konverzije violaksantina u zeaksantin čime se biljka oslobađa viška energije u obliku topline. S porastom intenziteta aktiničnog svjetla brzina fotosinteze se postupno smanjuje zbog zasićenja fotosintetskog aparata pa se suvišna apsorbirana energija oslobađa u obliku topline. Zbog toga vidimo da se povećava vrijednost NPQ do izjednačenja sa qP.

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

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

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

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

Vidljiv je blagi porast stope rasta broja biljaka pri 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 značajan.

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

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

- Arnon, D. I. (1949): Copper enzyme in isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* **24**: 1-15.
- Babani, F., Lichtenthaler, H. K. (1996): Light-induced age-dependant development of chloroplasts in etiolated barley leaves as visualized by determination of photosynthetic pigments, CO₂ 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, Geneva, Switzerland.
- Kadleček, P., Rank, B., Ticha, I. J. (2003): Photosynthesis and photoprotection in *Nicotiana tabacum* L. in vitro grown plantlets. *Plant Physiol.* **160**: 1017–1024.
- Kautsky, H., Hirsch, A. (1931): Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation, *Naturwissenschaften*, **19**: 964-964.
- Kenrick, P. R., Crane, P. (1997): The origin and early diversification of land plants. A cladistic study. Smithsonian Institution Press, Washington & London. Washington: Smithsonian Inst. Press.
- Krajncič, B., Devidé, Z. (1980): Report on photoperiodic responses in Lemnaceae from Slovenia, *Berichte des Geobot. Inst.* **47**: 75-86.
- Lakatos, G., Mészáros, I., Bohátka, S., Szabó, S., Makadi, M., Csaltós, M., Langer, G. (1993): Application of *Lemna* species in ecotoxicological studies of heavy metals and organic biocides. *Sci. Tot. Environ. Supplement*: 773-778.
- Landolt, E. (1986): The family of *Lemnaceae*: A monographic study (Vol. 1) Veröffentlichungen des Geobotanischen Institute des Edig. Tech. Hochschule, Stiftung 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, D. T. (2004): Rapid predictions of cold tolerance in Douglas-fir seedlings using chlorophyll fluorescence after freezing. *New Forest.* **28**: 49-62.
- Pevalek-Kozlina, B. (2003): Fiziologija bilja, Profil, Zagreb
- Pirson, A., Seidel, F. (1950): Zell- und 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 leću (*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 Ćustić, M. (2005): Utjecaj organskih malčeva na rast salate. Zbornik radova XL. znanstvenog skupa hrvatskih agronoma 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.mobot.org/jwcross/duckweed/phytochrome.htm#tetrapyrrole>

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

<http://www.wikipedia.org>