UTJECAJ RAZLIČITIH SVJETLOSNIH REŽIMA NA RAST I FOTOSINTETSKU UČINKOVITOST JAPANSKOG DVORNIKA (Reynoutria japonica Houtt.)

Borovac, Mislav

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:800446

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Mislav Borovac

UTJECAJ RAZLIČITIH SVJETLOSNIH REŽIMA NA RAST I FOTOSINTETSKU UČINKOVITOST JAPANSKOG DVORNIKA (*Reynoutria japonica* Houtt.)

Diplomski rad

Osijek, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Diplomski rad
Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

UTJECAJ RAZLIČITIH SVJETLOSNIH REŽIMA NA RAST I FOTOSINTETSKU UČINKOVITOST JAPANSKOG DVORNIKA (*Reynoutria japonica* Houtt.)

Mislav Borovac

Rad je izrađen: Laboratorij za staničnu i molekularnu biologiju biljaka Odjela za biologiju
Mentor: Dr. sc. *Vera Cesar*, **prof.**
Neposredni voditelj: Dr. sc. *Selma Mlinarić*

Kratak sažetak:
Japanski dvornik (*Reynoutria japonica* Houtt.) invazivna je vrsta s negativnim utjecajem na okoliš i ekonomiju. Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj režima osvjetljenja na fotosintetsku učinkovitost japanskog dvornika te opisati njegov utjecaj na anatomiju listova. Dvije skupine biljaka uzgajane su pri dva različita svjetlosna režima: konstantno niskom intenzitetu (60 μmola m^{-2} s^{-1}) i promjenjivom (0 - 1250 μmola m^{-2} s^{-1}). Nizak intenzitet svjetlosti doveo je do razvoja tanjih listova u odnosu na biljke uzgajane na promjenjivom intenzitetu svjetlosti. Mjerenjem fluorescencije klorofila *a* utvrđeno je da su biljke izložene niskom intenzitetu svjetlosti imale niži maksimalni kvantni prinos fotosustava II (TR_0/ABS) kao i indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}). Rezultati ovog istraživanja sugeriraju da nizak intenzitet svjetlosti inducira proces senescencije u listovima japanskog dvornika.

Broj stranica: 53
Broj slika: 29
Broj tablica: 2
Broj literaturnih navoda: 68
Broj priloga: 0
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *Reynoutria japonica* Houtt., fotosustav II, anatomija lista, fotosintetski pigmenti, fluorescencija klorofila *a*, JIP-test

Datum obrane: 27. listopada 2016

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. **Dr. sc.** *Janja Horvatić*, **izv. prof.**
2. **Dr. sc.** *Vera Cesar*, **prof.**
3. **Dr. sc.** *Tanja Žuna Pfeiffer*, **doc.**

Rad je pohranjen u: knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek MS thesis
Department of Biology
Graduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural science
Scientific Field: Biology

INFLUENCE OF DIFFERENT LIGHT REGIMES ON GROWTH AND PHOTOSYNTHETIC EFFICIENCY OF JAPANESE KNOTWEED (*Reynoutria japonica* Houtt.)

Mislav Borovac

Thesis performed at: Laboratory of plant cell and molecular biology, Department of Biology
Supervisor: PhD *Vera Cesar*, **Full Professor**
Assistant in charge: PhD *Selma Mlinarić*

Short abstract:
Japanese knotweed (*Reynoutria japonica* Houtt.) is an invasive species with a negative impact on environment and economy. The aim of this study was to determine the influence of light regimes on photosynthetic efficiency as well as to describe their effects on leaf anatomy of Japanese knotweed. Two groups of plants were grown under two different light regimes: constant low light intensity (60 μmol m^{-2} s^{-1}) and fluctuating light intensities (0 - 1250 μmol m^{-2} s^{-1}). Low light intensity resulted with the development of thinner leaves compared to those grown under fluctuating light intensity. Measurements of chlorophyll *a* fluorescence showed that plants exposed to low light intensity have lower maximum quantum yield of primary photochemistry (TR_0/ABS) as well as lower photosynthetic performance index (PI_{ABS}). The results of this study suggest that low light intensity triggered induced senescence in the leaves of Japanese knotweed.

Number of pages: 53
Number of figures: 29
Number of tables: 2
Number of references: 68
Number of appendices: 0
Original in: Croatian

Key words: *Reynoutria japonica* Houtt., photosystem II, leaf anatomy, photosynthetic pigments, chlorophyll *a* fluorescence, JIP-test

Date of thesis defence: 27th October 2016

Reviewers:
1. **PhD** *Janja Horvatić*, **Associate Professor**
2. **PhD** *Vera Cesar*, **Full Professor**
3. **PhD** *Tanja Žuna Pfeiffer*, **Assistant Professor**

Thesis deposited in: Library of Departmen of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek and in National university library in Zagreb in electronic form. It is also disposable on the web site of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek.

Toplo se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Veri Cesar i voditeljici dr. sc. Selmi Mlinarić na stručnom vodstvu, neizmjernom strpljenju i pomoći prilikom pisanja.
Želim zahvaliti obitelji i prijateljima na ukazanoj podršci tijekom studija, a ponajviše Stefani, Mariji i Danku na pomoći i lektoriraju pri izradi ovog rada.
Na kraju se želim zahvaliti svim kolegama u čijem društvu sam dočekao kraj studija.

SADRŽAJ

1 UVOD 1

1.1 KARAKTERISTIKE VRSTE *Reynoutria japonica* Houtt. 1

1.2 ANATOMIJA LISTA 5

1.3 FOTOSINTEZA 6

1.3.1 Građa i funkcija fotosintetskog aparata 6
1.3.2 Fotosintetski pigmenti 10

1.4 FLUORESCENCIJA KLOROFILA *a* 11

1.4.1 Polifazni porast fluorescencije klorofila a i JIP test 13

1.5 UTJECAJ NISKOG INTENZITETA SVJETLOSTI NA MORFOLOGIJU I FIZIOLOGIJU VIŠIH BILJAKA 15

1.6 SENESCENCIJA 16

1.7 CILJ RADA 18

2 MATERIJALI I METODE 19

2.1 BILJNI MATERIJAL 19

2.2 MIKROSKOPSKA ANALIZA POPREČNIH PREREZA LISTOVA 20

2.2.1 Priprema fiksativa 20
2.2.2 Fiksacija 20
2.2.3 Dehidracija 20
2.2.4 Uklapanje 20
2.2.5 Rezanje 21
2.2.6 Bojanje 21
2.2.7 Mikroskopiranje i mjerenje 21

2.3 SPEKTROMETRIJSKO ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE FOTOSINTETSKIH PIGMENATA 23

2.4 MJERENJE POLIFAZNOG RASTA FLUORESCENCIJE KLOROFILA *a* I JIP TEST 24

2.5 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA 25

3 REZULTATI 26

3.1 ANATOMIJA LISTA VRSTE *Reynoutria japonica* Houtt. 27

3.2 KONCENTRACIJA FOTOSINTETSKIH PIGMENATA 31

3.3 PARAMETRI FLUORESCENCIJE KLOROFILA *a* 34

3.3.1 Maksimalni kvantni prinos 34
3.3.2 Prijenos energije po aktivnom reakcijskom središtu 35
3.3.3 Indeks fotosintetske učinkovitosti 38

4 RASPRAVA 41

5 ZAKLJUČAK 45

6 LITERATURA 46

1 UVOD

1.1 KARAKTERISTIKE VRSTE *Reynoutria japonica* Houtt.

SISTEMATSKI POLOŽAJ

Nadcarstvo: Eucariota

Carstvo: Plantae

Koljeno: Spermatophyta

Odjeljak: Angiospermae

Razred: Dicotyledonae

Red: Caryophyllales

Porodica: Polygonaceae

Rod: *Reynoutria*

Vrsta: *Reynoutria japonica* Houtt.; Japanski dvornik

Česti sinonimi: *Fallopia japonica* (Houtt.) Ronse Decr., *Polygonum cuspidatum* Siebold i Zucc. (web 1).

Japanski dvornik, *Reynoutria japonica* Houtt., višegodišnja je zeljasta biljka koja tvori gustiše. Stabljike su jednogodišnje, cjevaste, gole, uspravne, visoke do 3 metra, zelene boje s crvenim pjegama; izrastaju iz velikog centralnog rizoma koji služi kao izvor hranjivih tvari tijekom zime i iz kojeg se radijalno šire manji penetrirajući rizomi. Rizomi s vremenom postaju drvenasti i lateralno se šire do 9 m. Listovi su široki, ovalni, s abaksijalnom inervacijom. Na bazi svake peteljke nalazi se žlijezda koja ima funkciju ekstrafloralne mednice. Biljka je diecična (dvodomna). Cvjeta krajem kolovoza i početkom rujna. Bjeličasti cvjetovi tvore grozdaste cvatove dužine 10 - 15 cm. Ocvijeće je jednostavno, građeno od 5 lapova (vanjska tri preklopljena). Plodovi su roške, trokutaste, tamno smeđe, sjajne i obavijene ocvijećem (Sl. 1). Fertilne muške biljke otkrivene su samo na području prirodne rasprostranjenosti. Broj kromosoma je varijabilan: 2n = 44, 52, 66 i 88 (Barney i sur., 2006; web 2). U Japanu, gdje raste kao autohtona biljka, oplodnja se obavlja kukcima, a rasprostiranje sjemena vjetrom. To nije slučaj u Europi gdje su muški cvjetovi neplodni i biljka se razmnožava vegetativno iz rizoma. Budući da japanski dvornik posjeduje veliku moć regeneracije, rizomi se vrlo brzo šire (Barney i sur., 2006).



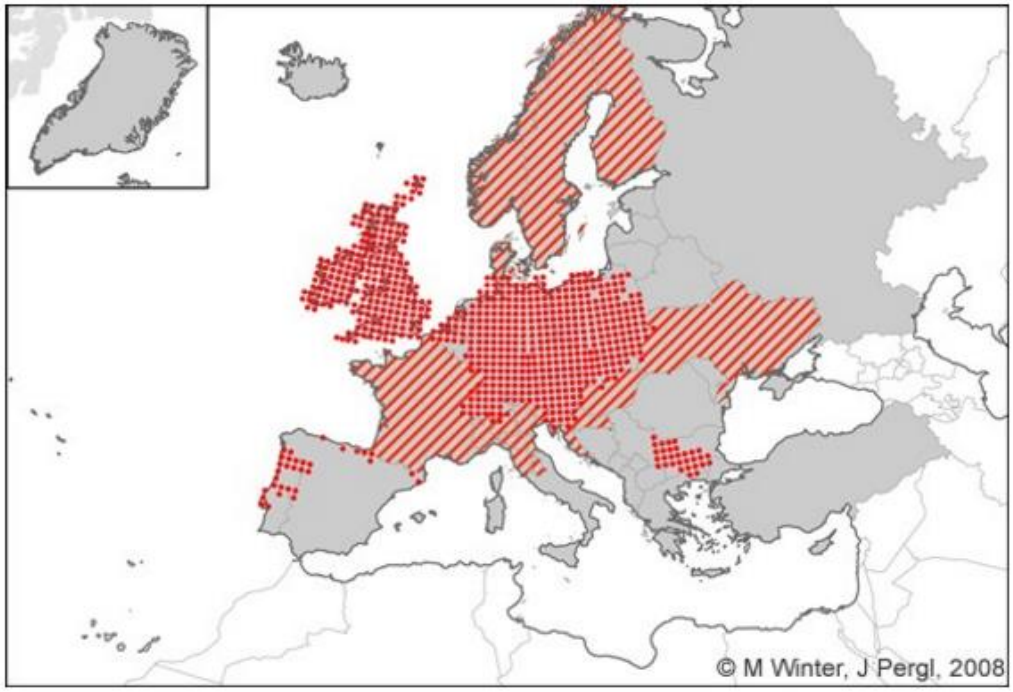
Slika 1. Izgled biljke *Reynoutria japonica* Houtt.; A-nadzemni dio biljke nakon otpuštanja plodova; B-izdanak iz rizoma; C-muški cvijet, D-ženski cvijet; E-roška obavijena ocvijećem; F-stabljika s pjegama i ohrejom (prema Barney i sur., 2006).

Japanski dvornik raste na različitim tipovima tala koja uključuju ilovače, tresetišta, aluvijalna, glinena, šljunčana i mineralna tla, ugljena tla siromašna dušikovim spojevima te na tlima promjenjive pH vrijednosti (u rasponu od 3 do 8) s udjelom organske tvari od 2 do 20% te varijabilnom koncentracijom nutrijenata (K, Na, Mg, Ca i P).

Japanski dvornik je višegodišnji geofit koji nepovoljne zimske uvjete preživljava u obliku podzemnog rizoma. Razvoj nadzemnog dijela biljke započinje početkom ožujka i završava sredinom lipnja. Trajanje sezone rasta uvjetovano je temperaturom. Uz odgovarajuće nutrijente i dostupnost vode, najbrže se razvija u uvjetima potpunog osvjetljenja, a izloženost čak i umjerenom zasjenjenju ima negativne posljedice na rast i razvoj. Proljetni mraz oštećuje

mlade i nježne klice te rizome, što rezultira zaostajanjem biljke u razvoju. Biljka je također osjetljiva na ljetne suše zbog dehidracije listova (Beerling i sur., 1994; Barney i sur., 2006).

Japanski dvornik autohtona je biljka Japana, Koreje, Tajvana i sjeverne Kine, koja se kao pionirska vrsta pojavljuje na vulkanskim obroncima i onečišćenim područjima te otvorenim staništima potpuno izloženim sunčevom osvjetljenju, s odsutnošću kompetitivne vegetacije. Tijekom 19. stoljeća uvezena je u Europu kao ukrasna biljka i od tada se pojavljuje kao invazivna vrsta u većini europskih zemalja (Sl. 2) (Beerling i sur., 1994; web 3). Krajem 20. stoljeća zabilježena je i u Sjevernoj Americi, Australiji te na Novom Zelandu.
Raspon staništa ove biljke u Europi određen je zavisnim odnosom između geografske širine i godišnje raspodjele padalina. Biljka donedavno nije bila prisutna u Mediteranskom pojasu zbog oskudnih padalina tijekom ljetnih mjeseci, no tijekom zadnjeg desetljeća zabilježen je njen prodor na primorsko područje Hrvatske, Italije i Portugala (Sl. 2). Sjeverne granice rasprostranjenosti obuhvaćaju skandinavske zemlje Norvešku i Finsku, a najjužnije Portugal i Bugarsku (Beerling i sur., 1994).



Slika 2. Rasprostranjenost japanskog dvornika u Europi prikazana je kosim crtama, a točke prikazuju precizno određene lokacije po MTB poljima (prema web 3).

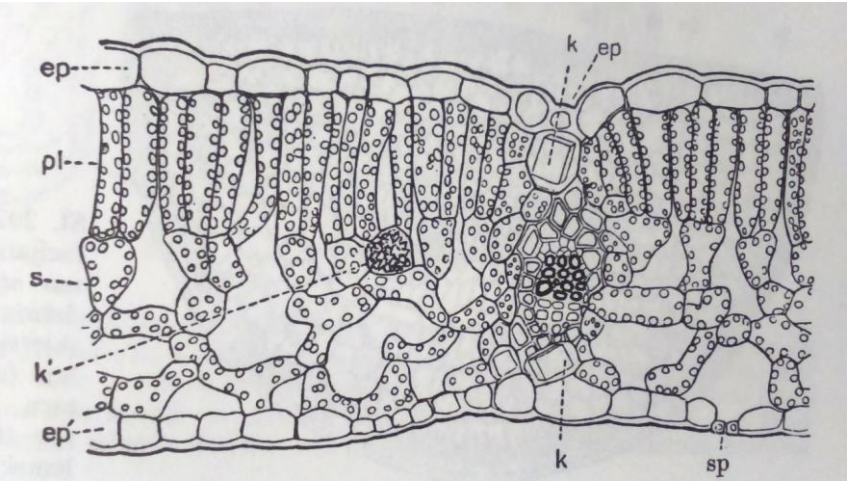
Na području primarne rasprostranjenosti, japanski dvornik napadaju brojni prirodni predatori kao što su insekti i gljive. Odsutnost tih organizama u Europi i Sjevernoj Americi, agresivan rast i velika moć regeneracije omogućuje japanskom dvorniku velik invazivni potencijal s negativnim ekološkim i ekonomskim posljedicama. Japanski dvornik stvara otporne monokulture koje istiskuju autohtonu vegetaciju i mijenjaju kemijski sastav tla, a istraživanja su pokazala da ima negativan utjecaj i na bioraznolikost životinjskog svijeta (web 2). Uništava obale vodenih tokova i zakrčuje kanale za navodnjavanje i tako uzrokuje poplave na divljim staništima i poljoprivrednim dobrima. U urbanim područjima uništava vrtove, građevine i ceste (Barney i sur., 2006; web 2).
Iako postoji više metoda kontrole japanskog dvornika, nijedna nije praktična. Najučinkovitijim metodama pokazale su se prskanje herbicidom pikloramom i injektiranje glifosata. No i te metode zahtijevaju višegodišnju lokaliziranu primjenu prije nego poluče rezultate te kao takve nisu podobne za kontrolu velikih ili divljih područja. Ubiranje i rezanje stabljika rezultira lateralnim širenjem biljke i samo povećava infestaciju. Ispaša se pokazala umjereno uspješnom jer prorjeđuje gustiše (Beerling i sur., 1994).

Japanski dvornik potencijalno može biti i koristan ljudskom društvu. Njegova velika otpornost i učinkovito akumuliranje teških metala iz okoliša čini ga idealnim kandidatom za fitoremedijaciju zemljišta. Pokazao se prihvatljivim izvorom hrane za ljude, domaće životinje i pčele. Japanski dvornik ima potencijalan značaj za medicinu jer njegovo korijenje sadrži resveratrol, fitoaleksin s antitumorskim djelovanjem. Istraživanja su pokazala da ekstrakt njegovog lista posjeduje herbicidno i fungicidno djelovanje pa je značajan i za industriju pesticida (Beerling i sur., 1994; Barney i sur., 2006; Novak i Kravaščan, 2011; web 2).

Japanski dvornik prodro je na teritorij Hrvatske i postoji mogućnost da će u nadolazećim godinama uzrokovati velike štete. U Hrvatskoj se uobičajeno može pronaći na rubovima jezera i poplavnim područjima, uz potoke, rijeke, u kanalima, uz prometnice, u parkovima, na gradilištima, rubovima šuma i drugdje. Rasprostranjen je u svim županijama kontinentalne Hrvatske te se i dalje širi (Novak i Kravarščan, 2011). Budući da su trenutne metode suzbijanja nepraktične i troškovi njihove primjene na državnoj razini dosežu milijunske iznose (web 2), potrebno je što prije istražiti alternativne metode njegove kontrole ili poboljšati već postojeće.

1.2 ANATOMIJA LISTA

List je vegetativni organ biljke, a njegove temeljne uloge su asimilacija i transpiracija. Raščlanjuje se na podinu, peteljku i plojku. Listovi viših biljaka se, na temelju simetrije lisne plojke, dijele na bifacijalne, ekvifacijalne i unifacijalne, no tipičan pravi list je bifacijalne (monosimetrične) građe. S abaksijalne i adaksijalne strane takvog lista nalazi se jednoslojna epiderma sastavljena od gusto zbijenih izodijametričnih stanica koje na svojoj površini izlučuju zaštitni sloj – kutikulu. Stanice epiderme obično sadrže samo leukoplaste dok se kloroplasti pojavljuju samo u submerznim biljkama i biljkama sjene. Epiderma primarno ima zaštitnu ulogu, a uz pomoć međustaničnih prostora povezanih s pučima pridonosi izmjeni plinova. Između gornje i donje epiderme nalazi se mezofil koji je podijeljen na palisadni i spužvasti parenhim. Kloroplastima bogat palisadni ili asimilacijski parenhim građen je od jednog ili više slojeva stupastih stanica postavljenih okomito na površinu lista, a primarna funkcija mu je asimilacija. Kloroplastima siromašniji spužvasti parenhim sastoji se od nepravilnih stanica poredanih u više slojeva, između kojih su veliki međustanični prostori povezani s pučima, a glavna mu je uloga transpiracija. U mezofilu mnogih vrsta moguće je pronaći stanice koje sadrže kristale. Kroz mezofil prolaze zatvorene kolateralne žile (Sl. 3) (Denffer i Ziegler, 1988; Bačić, 2003; Lepeduš i Cesar, 2010). Listovi vrsta iz roda *Reynoutria* građeni su poput tipičnog dorziventralnog lista. Palisadni parenhim je uglavnom jednoslojan, a od kristalnih struktura zabilježene su druze i prizmatični kristali (Bunawan i sur., 2011; Alberternst i Boehmer, 2014).



Slika 3. Poprečni prerez prosječnog bifacijalnog lista; ep - gornja epiderma, ep' - donja epiderma, pl - palisadni parenhim, s - spužvasti parenhim, k - kristalne strukture koje omeđuju poprečno prerezanu kolateralnu žilu, k' - kristalna druza, sp - puč (prema Denffer i Ziegler, 1988).

1.3 FOTOSINTEZA

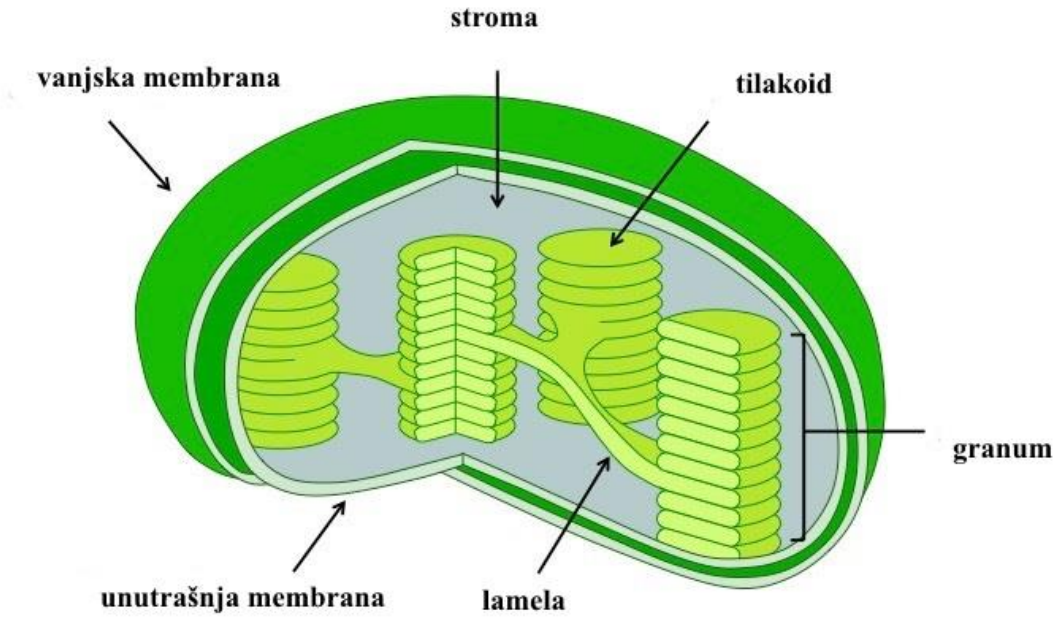
Fotosinteza je proces kojim se energija Sunčeve svjetlosti upotrebljava za sintezu glukoze koristeći ugljikov dioksid i vodu. Odvija se u kloroplastima u kojima se nalaze fotosintetski pigmenti, a sastoji se od primarnih i sekundarnih reakcija. Primarne reakcije (reakcije ovisne o svjetlosti) odvijaju se u tilakoidnim membranama kloroplasta i u njima se svjetlosna energija pretvara u kemijsku energiju pri čemu nastaju O_2, ATP i NADPH. Sekundarne reakcije (Calvinov ciklus), za čije odvijanje svjetlost nije nužna, odvijaju se u stromi kloroplasta i u njima dolazi do redukcije CO_2 i sinteze ugljikohidrata (Pevalek-Kozlina, 2003; Heldt, 2005).

1.3.1 Građa i funkcija fotosintetskog aparata

Fotosintetski najaktivnije tkivo biljke je kloroplastima bogat mezofil lista.

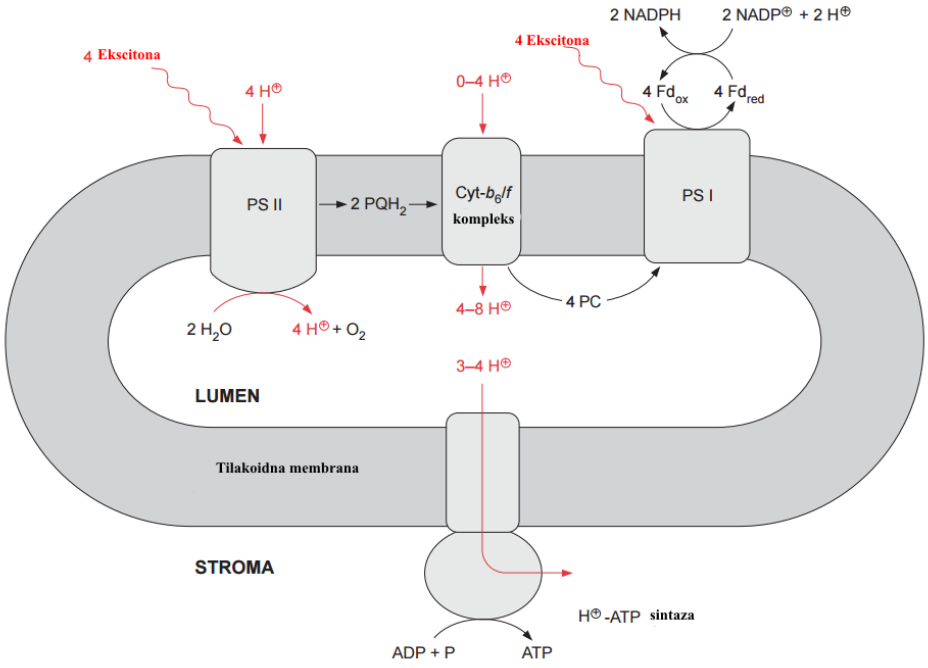
Kloroplasti su specijalizirani organeli viših biljaka u kojima se odvija fotosinteza. To su plastidi dugi 5-10 μm, najčešće ovalnog oblika (Pevalek-Kozlina, 2003). Kloroplasti su obavijeni dvjema biomembranama između kojih je međumembranski prostor (Sl. 4). Propusna vanjska biomembrana odvaja kloroplast od citoplazme dok gotovo nepropusna unutrašnja membrana okružuje prostor koji se tijekom razvoja popunjava proteinskim matriksom nazvan stroma. Unutar strome smješten je sustav tilakoidnih membrana koje se dijele na grana i stroma tilakoide. Grana tilakoidi su naslagani paralelno jedan iznad drugog te tvore granume, a međusobno su povezani stroma tilakoidima (Denffer i Ziegler, 1988; Alberts i sur., 2003; Pevalek-Kozlina, 2003).

U primarnim reakcijama fotosinteze nastaju NADPH i ATP te molekularni kisik nastao fotokemijskom oksidacijom vode. Transport elektrona od vode do $NADP^+$ se događa djelovanjem četiri proteinska kompleksa uklopljena u tilakoidne membrane: fotosustav II (PSII), citokrom b_6f kompleks, fotosustav I (PSI) i ATP-sintaza. Prijenos elektrona između njih posredovan je mobilnim nosačima plastokinonom i plastocijaninom. Taj prijenos stvara gradijent protona preko tilakoidne membrane čiju energiju ATP-sintaza upotrebljava za sintezu ATP-a (Sl. 5) (Whitmarsh i Govindjee, 1999).



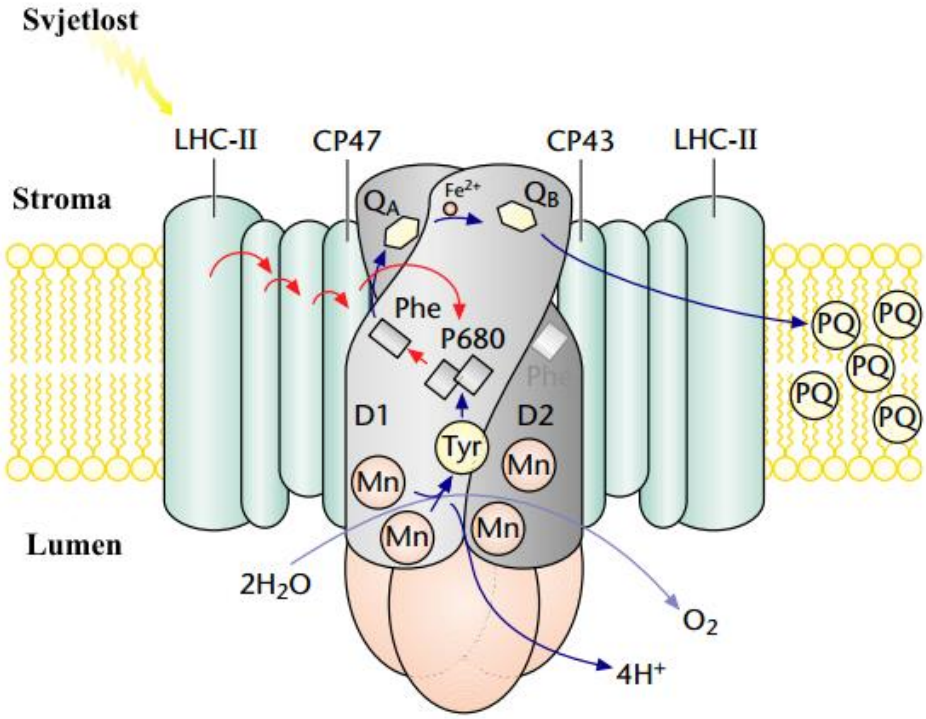
Slika 4. Shematski prikaz kloroplasta (prema web 4).

PSI i ATP-sintaza nalaze se na stroma tilakoidima i krajnjim dijelovima grana tilakoida, a PSII samo na grana tilakoidima. Citokrom b_6f kompleks je jednoliko raspoređen između stroma i grana tilakoida (Lehninger, 2005).



Slika 5. Shematski prikaz fotosintetskog aparata (prema Heldt, 2005).

Fotosustavi su građeni od dva dijela: antena kompleksa za prikupljanje svjetla (engl. „light-harvesting complex“ - LHC) i reakcijskog središta (engl. „reaction center“ – RC), dok PSII posjeduje još i kompleks koji katalizira oksidaciju vode (engl. „oxygen-evolving complex“ - OEC) (Sl. 6).



Slika 6. Fotosustav II izgrađen je od preko 20 proteinskih podjedinica, a moguće je razlikovati tri strukturno i funkcionalno različita dijela fotosustava II: reakcijsko središte (sivo), antena kompleks (tirkizno) i kompleks koji katalizira oksidaciju vode – OEC (ružičasto). Crvene strelice prikazuju prijenos ekscitona s antena kompleksa u reakcijsko središte, svjetlo plava strelica oksidaciju vode, a tamno plave strelice prijenos elektrona na plastokinon (prema Whitmarsh i Govindjee, 2001).

Antena kompleksi sastoje se od vanjskog i unutrašnjeg dijela. Vanjski dio čine periferne antene koje su kodirane genima u jezgri i vežu molekule klorofila *a* i *b*, ksantofila i karotena. LHC se nazivaju još i CAB polipeptidi (engl. „chlorophyll *a/b* binding“) (Lehninger, 2005). Funkcija LHC je prikupljanje fotona svjetlosti (Ort i Yocum, 1996; Zolla i sur., 2003; Pietrzykowska i sur., 2014). Unutrašnji dio antena kompleksa naziva se „core-complex“ i on provodi ekscitone skupljene na vanjskim dijelovima antena kompleksa u reakcijski centar fotosustava gdje se odvijaju primarne reakcije fotosinteze. Reakcijsko središte PSII je heterodimerni proteinski kompleks sastavljen od D_1 i D_2 polipeptida; na njega se vežu ključne komponente redoks reakcija PSII: Q_A, Q_B, P680, dvije molekule feofitina i četiri molekule klorofila (Whitmarsh i Govindjee, 2001). Do oksidacije vode u PSII dolazi u OEC. To je

manganski klaster (Mn_4Ca) povezan na D_1 i D_2 polipeptide u lumenu tilakoida (Cady i sur., 2008).

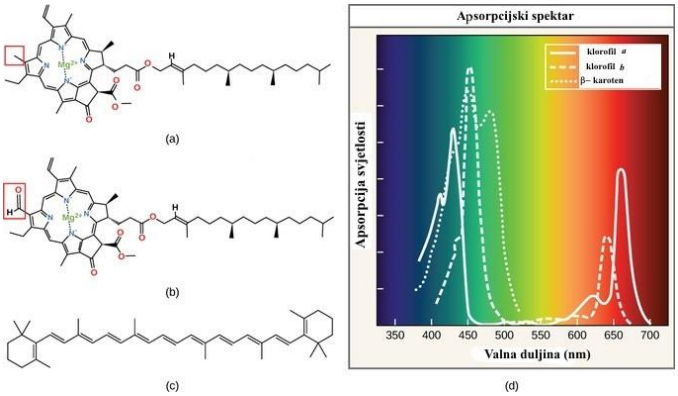
PSII koristi svjetlosnu energiju za pokretanje dviju reakcija: oksidaciju vode i redukciju plastokinona. Fotokemija PSII započinje odvajanjem naboja s P680 u reakcijskom središtu na feofitin (Barber i Kuhlbrandt, 1999). Elektron se zatim prenosi s feofitina na primarni akceptor plastokinon Q_A. Nakon toga se elektron prenosi na Q_B koji može primiti dva elektrona i dva protona te tako postati potpuno reduciran i protoniran, čime nastaje plastohidrokinon (Q_BH_2 ili PQH_2). PQH_2 se zatim odvaja od reakcijskog središta i difundira do citokrom b_6f kompleksa gdje predaje elektron plastocijaninu koji ga prenosi do PSI. Reoksidacijom plastokinona (PQ) dva protona se otpuštaju u lumen pokrećući tako protonski gradijent (Whitmarsh i Govindjee, 2001). Nadalje, PSI katalizira oksidaciju plastocijanina i redukciju feredoksina. NADP reduktaza preuzima elektron s reduciranog feredoksina i koristi ga za stvaranje NADPH u stromi tilakoida. Na kraju transportnog lanca elektrona nalazi ATP sintaza, membranski proteinski kompleks koji iskorištava energiju protonskog gradijenta za fosforilaciju ADP-a u ATP (Whitmarsh i Govindjee, 2001; Stryer, 2002).
Nedostatak elektrona u reduciranom obliku reakcijskog središta $P680^+$ nadoknađuje se elektronima dobivenim fotolizom vode na OEC-u pri čemu se oslobađa kisik. Za oslobađanje jedne molekule kisika u lumen se otpuštaju četiri protona (Whitmarsh i Govindjee, 2001; Heldt, 2005). Opisani tok elektrona naziva se linearni tok elektrona, zahtijeva oba fotosustava i uključuje niz redoks-sustava koji prenose elektrone od vode do $NADP^+$.

U slučaju cikličkog toka elektrona, elektroni se prenose s PSI na feredoksin s kojega se kružnim putem vraćaju do reakcijskog središta PSI preko citokroma b_6f kompleksa i plastocijanina. Prolaskom elektrona kroz citokrom b_6f kompleks stvara se protonski gradijent koji pokreče aktivnost ATP-sintaze. Za ciklički put elektrona potreban je samo PSI (web 5).

Produkti primarnih reakcija, ATP i NADPH, služe kao izvor energije za reakcije asimilacije CO_2 u reakcijama neovisnima o svjetlosti (Calvinov ciklus) koje se odvijaju u stromi kloroplasta (Barber i Kuhlbrandt, 1999; Stryer, 2002; Pevalek-Kozlina, 2003; Heldt, 2005).

1.3.2 Fotosintetski pigmenti

Primarne reakcije fotosinteze u kojima se iskorištava sunčeva energija za redukciju $NADP^+$ i sintezu ATP-a započinju apsorpcijom fotona. U fotoautotrofnim organizmima ključnu ulogu u apsorpciji fotona ima molekula klorofila *a*. U viših biljaka i nekih skupina algi redovito je prisutna i pomoćna molekula klorofil *b* te pomoćni pigmenti karotenoidi koji prenose apsorbiranu energiju na klorofil *a* i tako smanjuje „zelenu rupu“ u apsorpciji klorofila (Sl. 7) (Denffer i Ziegler, 1988; Pevalek-Kozlina, 2003).



Slika 7. Struktura klorofila *a* (a), klorofila *b* (b), karotenoida β-karotena (c) i apsorpcijski spektri tih molekula (d). Apsorpcijski maksimum chl-*b* i karotenoida bliži je zelenom dijelu spektra i tako popunjava zelenu rupu (prema web 6).

Molekula klorofila građena je od četiri pirolna prstena povezana u porfirinski prsten, u središtu kojeg se nalazi dvovalentni magnezijev atom, koji je vezan na dušikove atome pirolnih prstenova. Na propionsku skupinu četvrtog pirolnog prstena esterski je vezan terpenoidni fitolni rep. Fitol je alkohol s 20 C-atoma koji čini molekulu klorofila lipofilnom i njime se klorofil pričvršćuje za proteine u membrani (Pevalek-Kozlina, 2003; Heldt, 2005).
Klorofil *a* je modrozelene boje i maksimalno apsorbira svjetlost valnih duljina 430 i 662 nm a klorofil *b* žutozelene i maksimalno apsorbira svjetlost valnih duljina 453 i 542 nm. Za boju molekule odgovoran je raspored dvostrukih veza. Strukturna razlika između tih dviju molekula je u tome što klorofil *a* na drugom pirolnom prstenu ima metilnu skupinu, a klorofil *b* aldehidnu skupinu (Sl. 7a i 7b) (Denffer i Ziegler, 1988; Heldt, 2005).

Karotenoidi su pomoćni fotosintetski pigmenti koji su usko vezani s proteinima antena kompleksa i reakcijskih središta. Po svojoj građi, karotenoidi su lipofilni derivati izoprena

koji nastaju sastavljanjem jednostavnih izoprenskih jedinica i najčešće se sastoje od dva identična dijela, svaki od po 20 ugljikovih atoma (Sl. 7c). Nastaju isključivo u biljkama i dijelimo ih na dvije skupine: karotene (čisti ugljikovodici) i ksantofile (derivati karotena koji sadrže kisik) (Denffer i Ziegler, 1988; Pevalek-Kozlina, 2003). Od karotena u višim biljkama pojavljuje se β-karoten i ponekad α-karoten, a od ksantofila pojavljuju se lutein i neoksantin te molekule ksantofilskog ciklusa (violaksantin, anteraksantin i zeaksantin). Proširuju spektar fotosintetski upotrebljive svjetlosti jer apsorbiraju svjetlost valnih duljina između 380 i 550 nm, što je ujedno i uzrok njihove žute, narančaste ili crvene obojenosti (Denffer i Ziegler, 1988). Osim što služe kao pomoćni fotosintetski pigmenti, posjeduju još i zaštitnu ulogu. Karotenoidi primaju suvišnu energiju iz pobuđenog klorofila i tako i sami prelaze u pobuđeno stanje. Pri povratku molekule karotenoida u osnovno stanje, suvišak energije rasipa se u obliku topline. Posebno značajnu ulogu ovdje imaju karotenoidi ksantofilskog ciklusa: anteraksantin, violaksantin i zeaksantin. Njihovo djelovanje utječe na nefotokemijsko gašenje fluorescencije klorofila *a* i tako mijenja prinos fluorescencije klorofila *a* (Sarry i sur., 1994; Maxwell i Johnson, 2000; Dreuw i sur., 2003; Pevalek-Kozlina, 2003).

1.4 FLUORESCENCIJA KLOROFILA *a*

Fotosinteza započinje kada fotoreceptorska molekula apsorbira svjetlo. U viših biljaka to čini klorofil *a*. Zbog posjedovanja velikog broja konjugiranih dvostrukih veza u molekuli klorofila nalaze se brojni delokalizirani **π**-elektroni. Za podizanje **π**-elektrona na višu energetsku razinu potrebno je razmjerno malo energije. Tada molekula klorofila postaje pobuđena te prelazi iz osnovnog stanja u pobuđeno stanje. Takve pobuđene molekule su vrlo nestabilne te brzo prelaze u osnovno stanje pri čemu dolazi do otpuštanja suvišne energije na nekoliko načina: prijenosom ekscitona na susjedne molekule, fluorescencijom te otpuštanjem u obliku topline (Denffer i Ziegler, 1988; Stryer, 2002; Pevalek-Kozlina, 2003; Misra i sur., 2012).

Pobuđene molekule klorofila prenose apsorbiranu energiju fotona na susjedne u obliku ekscitona (preneseni kvanti ekscitacijske energije). Taj se proces događa u PSI i PSII, a krajnji cilj je prenošenje pobudne energije do reakcijskog središta odakle će biti uključena u procese fotosinteze. Da bi se eksciton prenio s jedne molekule na drugu potrebno je da su obje molekule na istoj energetskoj razini ili da se molekula davatelj nalazi u pobuđenom stanju bogatijem energijom u odnosu na molekulu koja prima energiju. Klorofili reakcijskih središta

imaju nižu energiju u pobuđenom stanju i kao takvi djeluju kao zamke koje hvataju ekscitone (engl. „trapping“ centri) (Denffer i Ziegler, 1988; Heldt, 2005; Lehninger, 2005).

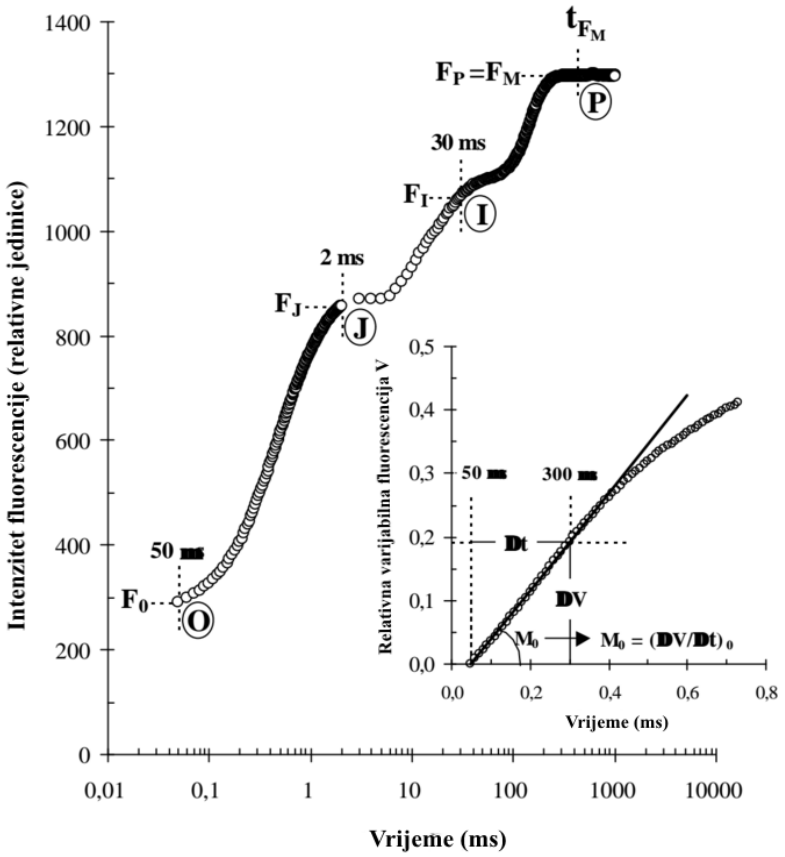
Fluorescencija je pojava kada pobuđeni elektron pri povratku u osnovno stanje oslobađa foton. Klorofil uvijek fluorescira crveno, neovisno o valnoj duljini apsorbiranog fotona. Za biljku je ovaj proces beskorisno gubljenje energije te je u intaktnom fotosintetskom aparatu neznatan i predstavlja samo oko 2 - 10% od ukupno apsorbirane svjetlosti (Denffer i Ziegler, 1988).

Tri spomenuta načina oslobađanja energije su u međusobnoj kompeticiji što znači da povećanje jednoga dovodi do smanjenja druga dva. Kautsky i suradnici su 1960. godine primijetili da fluorescencija fotosintetskog materijala koji je izložen svjetlu nakon perioda tame naglo raste i doseže maksimum kroz period od oko 1 s. Ta je pojava danas poznata pod nazivom Kautskijev efekt (Maxwell i Johnson, 2000; Guidi i Innocenti, 2011) i ona je posljedica redukcije elektron akceptora u PSII. Naime, nakon što u reakcijskom središtu dođe do odvajanja naboja, plastokinon Q_A prima elektron i nije u stanju primiti novi sve dok plastokinon Q_B ne preuzme taj elektron. Za to je vrijeme reakcijsko središte zatvoreno, što rezultira smanjenom efikasnošću fotokemijske pretvorbe energije u PSII, zbog čega se prinos fluorescencije klorofila poveća (Guidi i Innocenti, 2011). Tijekom kontinuiranog osvjetljavanja, fluorescencija raste od minimalnog prinosa fluorescencije, F_0, kada su sva reakcijska središta otvorena do maksimalnog prinosa fluorescencije, F_m, kada su sva reakcijska središta zatvorena. Nakon dosezanja maksimuma intenzitet fluorescencije opada, unatoč tome što se reakcijska središta i dalje zatvaraju. Taj fenomen naziva se gašenje fluorescencije klorofila *a* (engl. „quenching“) i događa se putem dva moguća mehanizma: fotokemijsko i nefotokemijsko gašenje. Fotokemijsko gašenje fluorescencije (engl. „photochemical quenching“; qP) je odvajanje naboja i transport elektrona iz PSII, uzrokovano aktivacijom svjetlošću induciranih enzima koji sudjeluju u asimiliaciji CO_2. U isto vrijeme dolazi do povećanja pretvorbe energije u toplinu, a taj proces je nazvan nefotokemijsko gašenje fluorescencije (engl. „non-photochemical quenching“; qN) (Maxwell i Johnson, 2000; Guidi i Innocenti, 2011).

1.4.1 Polifazni porast fluorescencije klorofila a i JIP test

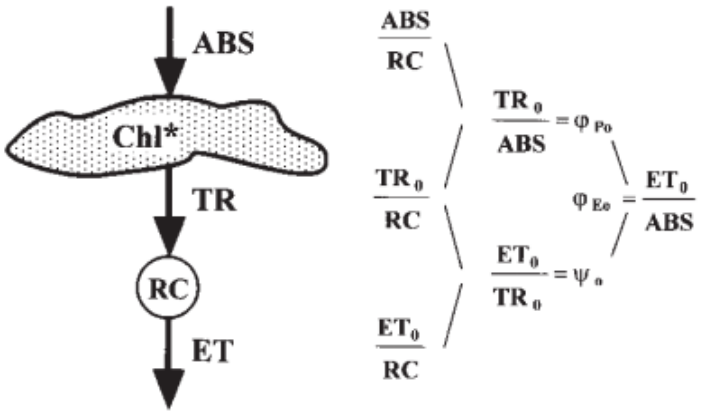
Zapaženo je da pod utjecajem svjetlosti visokog intenziteta u trajanju od 1 s kod svakog do sada promatranog fotosintetskog materijala dolazi do rasta intenziteta fluorescencije u nekoliko koraka. Koraci od posebnog interesa su: O (minimalna fluorescencija), J (nakon ~2 ms), I (nakon ~30 ms) te P (maksimalna fluorescencija) (Sl. 8). Ponekad se uočavaju i dodatni stupnjevi (L, K,) no njihova pojava nije pravilo (Strasser i sur., 2004).

Porast fluorescencije klorofila *a* odraz je aktivnosti PSII, zatvaranja reakcijskih središta i nakupljanja reduciranog oblika Q_A. Za kvantitativnu analizu OJIP porasta fluorescencije klorofila *a* koristi se JIP test koji omogućava *in vivo* i *in situ* analizu funkcije fotosintetskog aparata (Strasser i sur., 2000; Fracheboud, 2004; Strasser i sur., 2004; Misra i sur., 2012).



Slika 8. Polifazni porast fluorescencije klorofila *a* u viših biljaka s označenim OJIP koracima, prikazan na logaritamskoj vremenskoj skali u vremenu. Umetnuti graf prikazuje promjenu relativne varijabilne fluorescencije V_t u vremenu *t*, te prikazuje izračun nagiba relativne varijabilne fluorescencije (prema Strasser i sur., 2000).

Pojednostavljeni model protoka energije u fotosustavu, od apsorpcije fotona (ABS) do toka elektrona (engl. „electron transport“; ET) prikazan je na Slici 9. Dio apsorbirane energije otpusti se u obliku topline ili fluorescencije (engl. „dissipation“; DI), a drugi dio se uključuje u tok energije do reakcijskih središta gdje će biti uhvaćen i iskorišten za redukciju Q_A (engl. „trapping flux“; TR) (Strasser i sur., 2004). ABS, ET i TR tokovi elektrona mogu se izraziti po aktivnom reakcijskom središtu PSII (engl. „reaction centre“; RC) ili po pobuđenoj površini fotosintetskog uzorka (engl. „Cross section“; CS). Budući da samo aktivna reakcijska središta mogu prijenosom elektrona reducirati Q_A i tako započeti tok elektrona ET, izraz TR/RC je ključan u analizi fotosinteze JIP testom. Njime je izražena brzina hvatanja ekscitona u reakcijskom središtu i kao takav daje uvid u brzinu povećanja udjela zatvorenih reakcijskih središta. Brzina hvatanja ekscitona najveća je u vremenu t_0 kada su sva reakcijska središta otvorena (TR_0/RC) (Strasser i sur., 2000).



Slika 9. Pojednostavljeni model toka energije u fotosintetskom aparatu od apsorpcije fotona (ABS) do toka elektrona (ET) (prema Strasser i sur., 2000).

Parametar TR_0/ABS (F_v/F_m) predstavlja mjeru potencijalnog maksimalnog kvantnog prinosa PSII i jedan je od najčešće korištenih indikatora stresa i učinkovitosti fotosinteze (Maxwell i Jonhson, 2000). Unatoč njegovoj praktičnosti, on nije uvijek dostatan jer u njegov izračun ulaze samo ekstremne vrijednosti fluorescencije. Indeks fotosintetske učinkovitosti (engl. „performance indeks“, PI) daje detaljan uvid u fotosintetsku učinkovitost. Taj parametar uzima u obzir ključne događaje u reakcijskom središtu PSII o kojima ovisi fotosintetska aktivnost: apsorpciju fotona, otpuštanje energije, hvatanje energije u reakcijskom središtu i tok elektrona pokrenut odvajanjem naboja u reakcijskom središtu. Izračunava se kao umnožak vrijednosti izvedenih parametara: RC/ABS (omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta

i antena klorofila), TR_0/DI_0 (omjer hvatanja ekscitona i otpuštanja energije) i $ET_0/(TR_0-ET_0)$ (transport elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A) (Strasser i sur., 2004; van Heerden i sur., 2007).

1.5 UTJECAJ NISKOG INTENZITETA SVJETLOSTI NA MORFOLOGIJU I FIZIOLOGIJU VIŠIH BILJAKA

Svjetlost je najbitniji okolišni čimbenik koji utječe na fotosintezu, a samim time i na rast, razvoj i preživljavanje biljaka. Količina i kvaliteta svjetlosti u okolišu varira prostorno i vremenski te su biljke razvile sposobnost anatomskih, morfoloških i fizioloških promjena u svrhu prilagodbe na različite svjetlosne uvjete (Zervoudakis i sur., 2012).

Parenhim, pogotovo palisadni je ključno tkivo za fotosintezu u višim biljkama i kao takav podložan je utjecaju promjena u količini i kvaliteti svjetlosti iz okoliša (Moreira i sur., 2012) no utjecaj svjetlosti očituje se promjenama i na ostatku lista. Lišće biljaka koje su rasle pod nižim intenzitetom svjetlosti od optimalnog je površinski manje, posjeduje tanju epidermu i tanji parenhim. Pod povećanim intenzitetom svjetlosti dolazi do zadebljanja epiderme, kutikule i parenhima, a ponekad se stvaraju i novi slojevi palisadnog parenhima (James i Bell, 1999; Bailey i sur., 2001; Pandey i sur., 2003; Oguchi i sur., 2005).
Za razliku od uvjeta u kojima vlada nedovoljna količina svjetlosti, u optimalnim uvjetima parenhim je deblji i posjeduje više kloroplasta (Bailey i sur., 2001; Oguchi i sur., 2005), a dolazi i do stvaranja novih slojeva palisadnog parenhima i zadebljanja epiderme (James i Bell, 1999; Pandey i sur., 2003).

Svjetlosni uvjeti mogu utjecati na morfologiju biljke: smanjuje se specifična masa lista, povećava se površina te se mijenja količina i omjer fotosintetskih pigmenata, što direktno ometa fotosintetsku aktivnost biljke. Manjak svjetlosti utječe na omjer apsorbirane i iskorištene energije u elektronskom transportu te tako i na ukupnu funkcionalnost fotosintetskog aparata (Brouwer, 2012; Zhang i sur., 2016). Pri niskom intenzitetu svjetlosti pojačava se uhvaćena količina svjetlosti u antenama. Razdioba naboja između PSII i PSI je regulatorni proces koji optimizira redistribuciju ekscitacijske energije između fotosustava, a kontrolirana je redoks stanjem plastokinona koji održavaju elektronski transport od PSII do PSI. Brzi odgovori na promjene u intenzitetu svjetlosti događaju se u svega nekoliko minuta.

Prilagodbe na duže izlaganje niskom intenzitetu svjetlost uključuju povećanje brojnosti antena kompleksa, stabilizaciju reakcija između oba fotosustava te promjene u količini dostupnog Rubisco-a što sve zajedno utječe i na povećanje fotosintetskog kapaciteta biljke (Rascher i Nedbal, 2006).

Pri izrazito niskom intenzitetu svjetlosti dolazi do etiolacije. To je pojava koju karakteriziraju tanke i blijede stabljike, izduženi internodiji te zakržljalo lišće i korijenje. Do nje dolazi kada intenzitet svjetlosti padne ispod kompenzacijske točke (intenzitet svjetlosti pod kojim su za određenu biljku stope disanja i fotosinteze izjednačene) (Lichtenthaler i sur., 1981; web 6).
Osim etiolacije, nizak intenzitet svjetlosti i nepovoljan omjer crvene i tamnocrvene (engl. „far-red light“) svjetlosti mogu inducirati proces senescencije.

1.6 SENESCENCIJA

Senescencija je genetski kontroliran, visoko reguliran proces kojeg se smatra krajnjim stadijem razvoja lista tijekom kojeg dolazi do degradacije klorofila i proteina te transporta tako oslobođenih hranjivih tvari u druge dijelove biljke (Brouwer i sur., 2012). Senescencija tako predstavlja jedan od oblika programirane stanične smrti (engl. „programed cell death“; PCD) (Gan i Amasino, 1997).
Senescenciju pokreću i reguliraju SAG-geni (engl. „senescence associated genes“). Neki od njih se eksprimiraju i tijekom normalnog razvoja lista no poprimaju posebnu ulogu za vrijeme senescencije, poput gena koji su uključeni u mobilizaciju hranjivih tvar. Drugi su pak geni uključeni u mobilizaciju procesa koji se uglavnom događaju isključivo za vrijeme senescencije kao što su degradacija proteina, nukleinskih kiselina i klorofila te remobilizacija lipida i dušika (Matile i sur., 1996; Buchanan-Wollaston, 1997; Soudry i sur., 2004; Tuba i sur., 2006). Pokazano je također da u kontroli senescencije ulogu igraju i biljni hormoni; auksini, citokini i GA inhibiraju senescenciju dok ju ABA i etilen promoviraju (Gan i Amasino, 1997).

Prvi znakovi senescencije su promjene u ultrastrukturi kloroplasta uslijed njihove postupne degradacije. Najuočljivije promjene su promjena boje listova od zelene pa sve do žute zbog brže razgradnje klorofila u odnosu na karotenoide. Nadalje, dolazi do razgradnje DNA i RNA, proteina i tilakoidnih membrana što u konačnici utječe na smanjenje fotosintetske aktivnosti

(Brouwer i sur., 2012). Senescentni listovi sporije asimiliraju CO_2 što je pak posljedica brže razgradnje proteina strome u odnosu na proteine smještene u tilakoidnim membranama. Ključni događaj je razgradnja Rubisco-a što dovodi do smanjenja fotosintetske aktivnosti (Lu i sur., 2001).

Tijekom senescencije, aktivnost PSI i PSII postupno opada. Zbog inaktivacija OEC-a, gubitka reakcijskih središta PSII i inhibicije prijenosa ekscitacijske energije s karotenoida na klorofil, PSII je osjetljiviji na procese senescencije u odnosu na PSI (Lu i Zhang, 1998). Nadalje, smanjuje se stopa fotokemijskog, a povećava stopa nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila *a* zbog povećanja udjela reakcijskih središta koja ne mogu reducirati Q_B (Lu i Zhang, 1998; Lichtenthaler, 1999).

Senescenciju potiču i okolišni stresori poput suše, ekstremne temperature, povećane koncentracije ozona, nedostatka nutrijenata, napada patogena i ograničene količine svjetlosti (Gan i Amasino, 1997). Takva je senescencija inducirana i najčešće je reverzibilna (Buchanan-Wollaston, 1997). Držanje biljke u tami nekoliko dana potiče procese senescencije u svim dijelovima biljke. Senescencija nastupa puno brže ako su samo neki listovi neosvijetljeni. To se događa zato što listovi u nepovoljnim uvjetima ne mogu biti premješteni na neko osvjetljenije područje pa biljka povlači resurse iz njega i razvija novi list na nekom povoljnijem mjestu (Gan i Amasino, 1997; Osiewacz, 2003; Brouwer i sur., 2012).

1.7 CILJ RADA

Japanski dvornik je heliofilna vrsta koja je prilagođena rastu u uvjetima povišenog intenziteta svjetlosti. Ipak, kao invazivna vrsta, sposobna je razviti određene prilagodbe na manje povoljne uvjete. Ciljevi ovog rada bili su utvrditi utjecaj različitih režima osvjetljenja na koncentraciju fotosintetskih pigmenata i učinkovitost fotosintetskog aparata, kao i opisati anatomsku strukturu listova japanskog dvornika sa svrhom uspostave stabilnog uzgoja ove vrste u kontroliranim uvjetima.

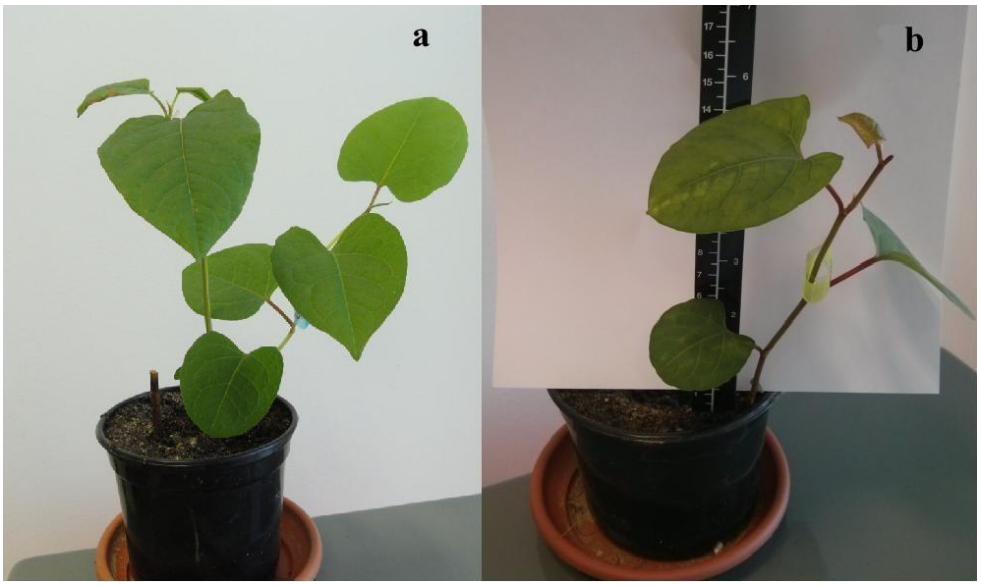
2 MATERIJALI I METODE

2.1 BILJNI MATERIJAL

Rizom japanskog dvornika (*Reynoutria japonica* Houtt.) izrezao sam na 12 komada i svaki komad posadio u zasebnu posudu s mješavinom zemlje i pijeska u omjeru 3:1. Tako zasađene biljke rasporedio sam u 2 skupine: α i β. Biljke iz skupine α (Sl. 10a) rasle su 110 dana uz prozor gdje su bile izložene promjenjivom PPFD (engl. „photosynthetic photon flux density„ – gustoća toka fotona) koji se kretao između 30 μmol m^{-2} s^{-1} i 1250 μmol m^{-2} s^{-1} i pri temperaturi od 24±2 ^{o}C. Prosječan broj sunčanih sati kojem su bile izložene tijekom rasta bio je 2,1 h (siječanj), 3 (veljača), 5,4 (ožujak), 7,9 (travanj), 7,6 (svibanj) (web 7), a trajanje dana kretalo se od 8 do 14 h (web 8).

Biljke iz skupine β (Sl. 10b) rasle su 114 dana u uzgojnoj komori pri konstantnom osvjetljenju s PPFD od 60 μmol m^{-2} s^{-1} i temperaturi od 23±1 ^{o}C.

Svaka skupina se sastojala od 6 biljaka. Uzorkovao sam potpuno razvijene listove, prve od vrha. Budući da su listovi uzgajani na niskom intenzitetu svjetlosti razvili nejednoliku pigmentaciju, uzorke iz skupine β razdijelio sam na dvije podgrupe ovisno o tome s kojeg dijela lista su uzimani: βž za žutu regiju i βz za zelenu regiju lista.



Slika 10. a-biljka iz skupine α ; b-biljka iz skupine β.

2.2 MIKROSKOPSKA ANALIZA POPREČNIH PREREZA LISTOVA

2.2.1 Priprema fiksativa

Fiksativ za svjetlosnu mikroskopiju 1%-tni glutaraldehid u fosfatnom puferu pripremio sam miješanjem 2 mL 25%-tnog glutaraldehida (Grade II) s prethodno pripremljenim puferima: 19 mL NaH_2PO_4 x $2H_2O$ i 19 mL Na_2HPO_4 x $2H_2O$.

2.2.2 Fiksacija

Uzeo sam po jedan dio sa svakog lista iz skupine α i dva sa svakog lista iz skupine β (posebno za žutu i posebno za zelenu regiju). Svaki list s kojeg sam uzeo uzorke za mikroskopiju stavio sam u Petrijevu zdjelicu, u koju sam prethodno stavio par kapi 1%-tnog glutaraldehida u fosfatnom puferu. Pomoću žileta izrezao sam komadiće lista podjednake veličine prikladne za uklapanje. Tako izrezane kvadratiće pincetom sam stavio u bočice s 1%-tnim glutaraldehidom u fosfatnom puferu. Bočice s komadićima listova stavio sam u vakuum pumpu kako bi iz tkiva izišao zrak, nakon čega su držane u hladnjaku na +4°C do sljedećeg koraka.

2.2.3 Dehidracija

Fiksirane komadiće listova japanskog dvornika dehidrirao sam uranjanjem u različite alkohole:

2 × 2 h u 100%-tni 2-metoksietanol,
2 × 1 h u 96%-tni etanol,
2 × 1 h u 100%-tni *n*-propanol,
2 × 1 h u 100%-tni *n*-butanol
24 h u mješavinu *n*-butanola i infiltracijske otopine (1:1) nakon čega su ostavljeni
24 h u infiltracijskoj otopini.

2.2.4 Uklapanje

Komercijalnu smolu za uklapanje (Historesin, Leica) dobio sam miješanjem 1 mL infiltracijske otopine sa 67 μm učvršćivača (Hardner). Odpipetirao sam dobivenu otopinu u

želatinozne kapsule topive u vodi. Pincetom sam prenio komadiće listova u smolu i pomoću pincete i histološke iglice ih postavio u okomiti položaj u sredini kapsule. Ostavio sam kapsule da stoje 24 h na sobnoj temperaturi, koliko je potrebno da smola dovoljno polimerizira.

Nakon 24 sata, kapsule sam očistio od želatinozne ovojnice pomoću tople vode. Smolu sam obradio žiletom da bih ju mogao zalijepiti na drveni blokić pomoću superljepila. Tako pripremljeni blokići ostavljeni su 24 h da se ljepilo stvrdne.

2.2.5 Rezanje

Uzorke sam postavio u rotacijski mikrotom (Leica). Za rezanje sam koristio stakleni nož. Prereze debljine 3 μm prenio sam u kapljicu destilirane vode na predmetnim stakalcima, nakon čega sam ih osušio na grijačoj ploči. Isparavanje vode uzorcima omogućava lijepljenje prereza za predmetno stakalce. Za svaki uzorak napravio sam 20 mikroskopskih prereza.

2.2.6 Bojanje

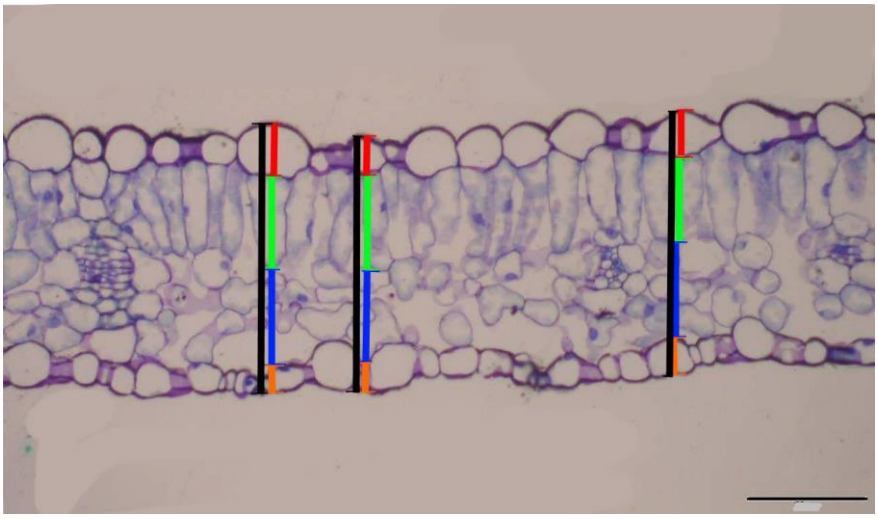
Osušene preparate bojao sam 0,05%-tnom otopinom Toluidine blue O u benzoatnom puferu (pH = 4,4) u trajanju od 1 minute, te ih nakon toga isprao pod mlazom hladne vodovodne vode te dodatno isprao destiliranom vodom.

2.2.7 Mikroskopiranje i mjerenje

Sve uzorke sam mikroskopirao pomoću svjetlosnog mikroskopa (Zeiss, Jena). Svaki prerez sam fotografirao 3 puta pomoću digitalne mikroskopske kamere Moticam 350 na tri različita segmenta pri povećanju od 400x. Na svakoj fotografiji napravio sam po 3 mjerenja (ukupno 180 mjerenja po listu) za sljedeće parametre: debljina lista, gornja epiderma, palisadni parenhim, spužvasti parenhim i donja epiderma (Sl. 11).

Dimenzije listova izmjerio sam pomoću računalnog programa Motic Images Plus 2.0ML.

Ogledne fotografije prereza svakog tipa lista (Sl. 13) fotografirao sam kamerom Olympus Camedia.



Slika 11. Mjerene dimenzije. Crveno - gornja epiderma, zeleno - palisadni parenhim, plavo - spužvasti parenhim, narančasto - donja epiderma, crno - ukupna debljina lista. Mjerilo, 50 μm.

2.3 SPEKTROMETRIJSKO ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE FOTOSINTETSKIH PIGMENATA

S odabranih listova japanskog dvornika na kojima sam prethodno izmjerio fotosintetsku učinkovitost odrezao sam isječke koje sam izvagao na analitičkoj vagi. S listova skupine α uzeo sam po jedan uzorak, a s listova skupine β po dva; jedan sa zelene regije i jedan sa žute.

Za svaki uzorak biljaka u tarionik sam narezao oko 0,1 g biljnog tkiva. Vrhom špatule dodao sam $MgHCO_3$ i nakon toga tkivo homogenizirao u acetonu. Tako homogenizirano tkivo kvantitativno sam prenio u staklenu kivetu od 12 mL. Tkivo sam ekstrahirao 15 minuta u hladnjaku, a zatim ga centrifugirao 10 minuta na 3000 rcf. Supernatant sam prebacio pipetom u plastičnu kivetu. Nakon prve ekstrakcije talog je ostao zelene boje zbog čega sam proveo proces reekstrakcije acetonom 3 puta dok tkivo nije izgubilo zelenu boju. Za svaki uzorak sam spojio sve njegove supernatante i prije mjerenja izmjerio njihov ukupni volumen. Apsorbanciju uzorka spektrometrijski (spektrometar Specord 40, Analytik Jena) sam izmjerio na 470 nm, 644,8 nm i 661,6 nm, a kao slijepa proba korišten je aceton. Za izračun koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida koristio sam ekstinkcijske faktore prema Lichtenhaler-u (1987):

$$\textbf{Chl } \boldsymbol{a} = (11{,}24 \times A_{661{,}6} - 2{,}04 \times A_{644{,}8}) \times V / m \times 10^3$$

$$\textbf{Chl } \boldsymbol{b} = (20{,}13 \times A_{644{,}8} - 4{,}19 \times A_{661{,}6}) \times V / m \times 10^3$$

$$\textbf{Chl } \boldsymbol{a}+\boldsymbol{b} = (7{,}05 \times A_{661{,}6} - 18{,}09 \times A_{644{,}8}) \times V / m \times 10^3$$

$$\textbf{Car} = [10^3 \times A_{470} - 1{,}9 \times (11{,}24 \times A_{661{,}6} - 2{,}04 \times A_{644{,}8}) - 63{,}14 \times (20{,}13 \times A_{644{,}8} - 4{,}19 \times A_{661{,}6})] \times V / 214 \times m \times 10^3$$

gdje je:

V = ukupni volumen ekstrakta fotosintetskih pigmenata, izražen u mL

m = masa uzorka, izražena u gramima.

Chl *a* = koncentracija klorofila a u mg/g mase svježe tvari uzorka

Chl *b* = koncentracija klorofila b u mg/g mase svježe tvari uzorka

Chl *a*+*b* = koncentracija ukupnog klorofila u mg/g mase svježe tvari uzorka

Car = koncentracija karotenoida u mg/g mase svježe tvari uzorka

2.4 MJERENJE POLIFAZNOG RASTA FLUORESCENCIJE KLOROFILA *a* I JIP TEST

Fotosintetsku učinkovitost biljaka izmjerio sam metodom mjerenja polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* koristeći Handy PEA (engl. „Plant Efficiency Analyser“, Hansatech) fluorimetar (Hansatech, UK). Biljke sam držao 30 min u tamnoj komori da bi se prilagodile na uvjete tame. Tamnu komoru sam zatim osvijetlio zelenom svjetlosti i na listove biljaka postavio kvačice na koje sam pričvrstio senzornu jedinicu PEA fluorimetra. Uređaj je inducirao fluorescenciju pomoću pulsa crvene saturacijske svjetlosti visokog intenziteta (maksimum 650 nm, 3000 μmol m^{-2} s^{-1}) i izmjerio promjene tijekom 1 s. Izmjerene vrijednosti uvrstio sam u JIP-test da bih izračunao parametare učinkovitosti fotosintetskog aparata (Strasser i sur., 2000). Korišteni parametri i njihov izračun prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Podaci i parametri JIP testa (prema Strasser i sur., 2000).

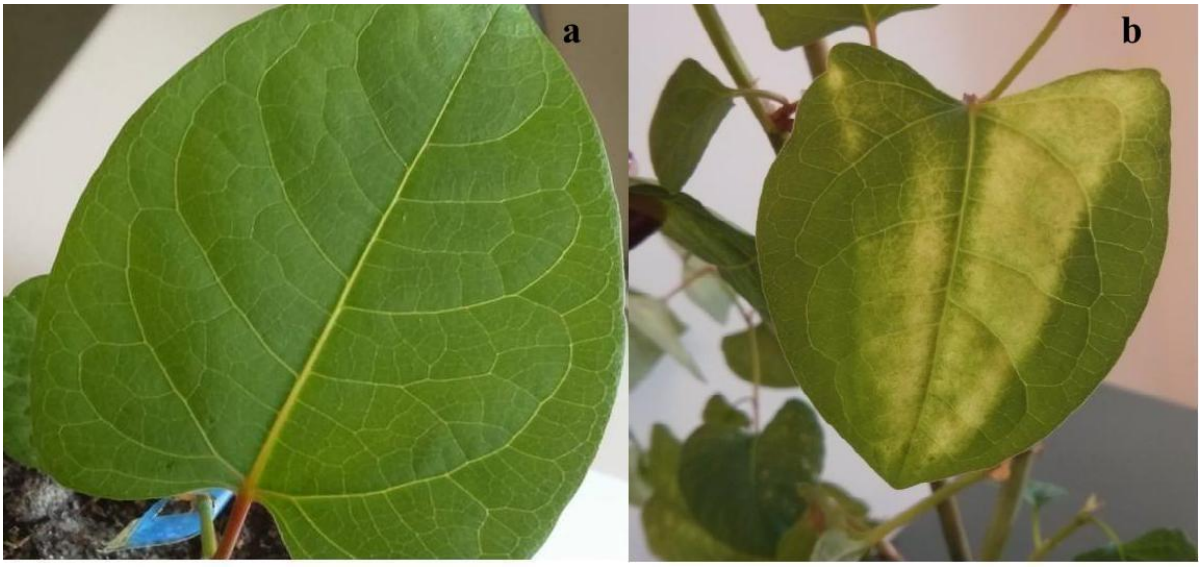
F_0	intenzitet fluorescencije nakon 50 μs (O stupanj)
F_{300}	intenzitet fluorescencije nakon 300 μs
F_J	intenzitet fluorescencije nakon 2 ms (J stupanj)
F_I	intenzitet fluorescencije nakon 30 ms (I stupanj)
F_m	maksimalni intenzitet fluorescencije (P stupanj)
F_V	maksimalna varijabilna fluorescencija; F_m - F_0
t_{Fm}	vrijeme potrebno da se postigne F_m
V_J	varijabilna fluorescencija na J stupnju; $V_J = (F_J – F_0)/(F_m – F_0)$
V_I	varijabilna fluorescencija na I stupnju; $V_I = (F_I - F_0)/(F_m – F_0)$
S_m	normalizirana komplementarna površina iznad OJIP krivulje; Area/(F_m - F_0)
M_0	ukupna brzina zatvaranja RC; (TR_0/RC) - (ET_0/RC)
N	prometni broj; $S_m[(dV/dt)_0]/V_J$
TR_0/ABS	maksimalni kvantni prinos PSII; 1-(F_0 - F_m) = F_v/F_m
ABS/RC	apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu; (TR_0/RC)/(TR_0/ABS)
TR_0/RC	hvatanje ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu; M_0/V_J
ET_0/RC	elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu; TR_0/RC - M_0
DI_0/RC	otpuštanje energije po aktivnom reakcijskom središtu; (ABS/RC) - (TR_0/RC)
RC/ABS	omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta i antena klorofila; (RC/ TR_0) (TR_0/ABS)
TR_0/DI_0	omjer hvatanja ekscitona i otpuštanja energije; F_V/F_0
$ET_0/(TR_0-ET_0)$	transport elektrona dalje od primarnog akceptora; (RC/CS)/(ABS/CS)
PI_{ABS}	indeks fotosintetske učinkovitosti; (RC/ABS) (TR_0/Dio) [$ET_0/(TR_0-ET_0)$]

2.5 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Dobivene podatke o parametrima poprečnog prereza lista, sadržaju fotosintetskih pigmenata i fluorescenciji klorofila *a* obradio sam u računalnom programu StatSoft Inc. STATISTICA version 12. Razlike između parametara izmjerenih na listovima skupine α te na žutim i zelenim regijama listova iz skupine β uspoređene su analizom varijance (One-way ANOVA) nakon čega je primijenjen Fisher LSD (engl. „Least Significant Difference“) *post hoc* test. Značajnost je utvrđena na razini $P < 0,05$.

3 REZULTATI

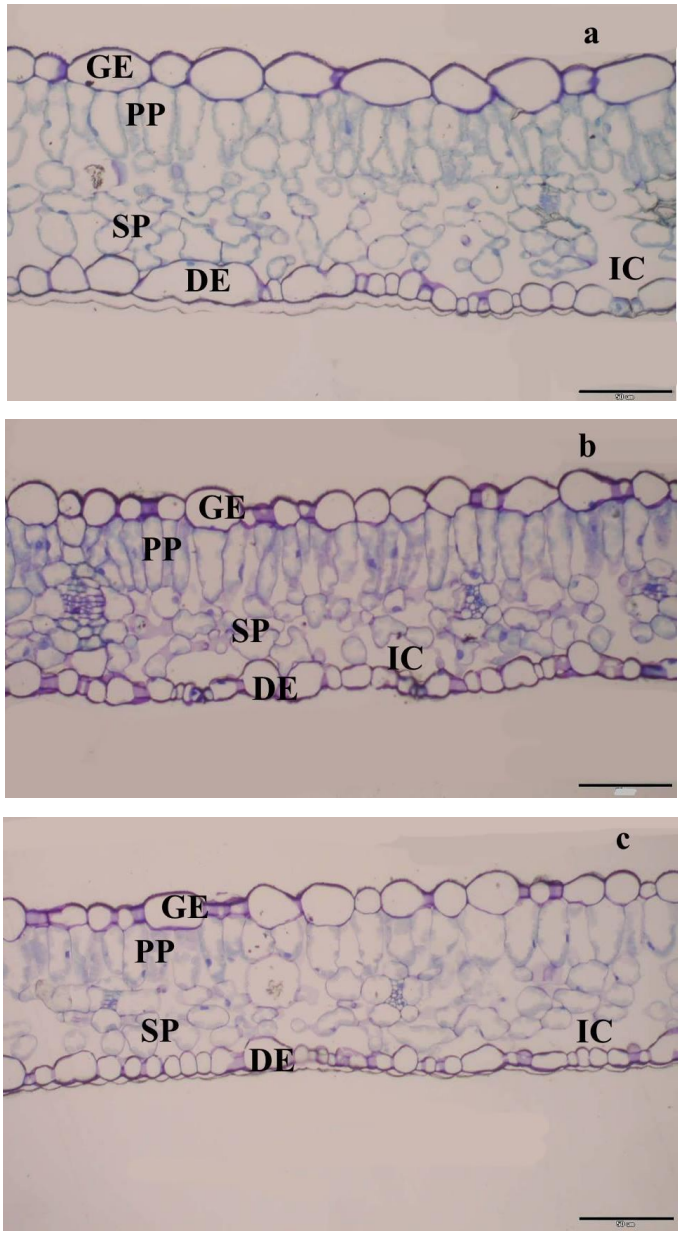
Ovo istraživanje proveo sam na biljkama koje su rasle pod 2 različita svjetlosna režima. Skupina α rasla je izložena sunčevoj svjetlosti, a skupina β rasla je u komori pod niskim intenzitetom svjetlosti. Biljke iz skupine β bile su slabijeg rasta od onih iz skupine α. Prosječne srednje vrijednosti visine biljaka iz skupine α kretale su se oko 70 cm, dok su biljke i iz skupine β bile nešto niže i prosječna visina se kretala oko 50 cm. Na listovima biljaka iz skupine β razvile su se klorotične pruge (Sl. 12). Skupina βž predstavlja klorotični dio lista skupine β, a βz zeleni dio lista skupine.



Slika 12. Listovi japanskog dvornika iz skupine α (a) i β (b).

3.1 ANATOMIJA LISTA VRSTE *Reynoutria japonica* Houtt.

Primjeri poprečnih prereza listova svake skupine prikazani su na Slici 13.



Slika 13. Poprečni prerez listova japanskog dvornika iz skupine α (a), žute regije listova skupine β (b) i zelene regije listova skupine β (c) pri povećanju mikroskopa od 400x. GE-gornja epiderma, PP-palisadni parenhim, SP-spužvasti parenhim, DE-donja epiderma, IC-međustanični prostor. Mjerilo, 50 μm.

Uočavamo veću debljinu gornje epiderme u odnosu na donju, jednoslojan palisadni parenhim te spužvasti parenhim s izraženim međustaničnim prostorima.

Debljina epiderme (gornje i donje), palisadnog parenhima, spužvastog parenhima te ukupna debljina lista izražena u mikrometrima dana je za svaku skupinu u Tablici 2.

Tablica 2. Srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom za parametre anatomije lista, izražene u μm, u skupini α, te u žutoj (βž) i zelenoj (βz) regiji listova skupine β. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $P < 0,05$.

	α	**βž**	**βz**
Ukupna debljina lista	242,9 ± 27,7 **a**	222,4 ± 33,3 **b**	205,1 ± 17,6 **c**
Gornja epiderma	33,5 ± 9,8 **a**	30,0 ± 8,6 **c**	32,2 ± 8,4 **b**
Palisadni parenhim	77,9 ± 20,7 **a**	66,7 ± 13,9 **b**	54,5 ± 12,4 **c**
Spužvasti parenhim	97,5 ± 24,2 **a**	93,5 ± 30,2 **b**	86,4 ± 18,9 **c**
Donja epiderma	24,2 ± 12,6 **a**	22,8 ± 8,5 **b**	22 ± 8,1 **b**

Najveća ukupna debljina lista zabilježena je u skupini α, a najmanja u skupini βz. Ukupna debljina lista u skupini βž bila je veća od βz, a manja od one u skupini α.

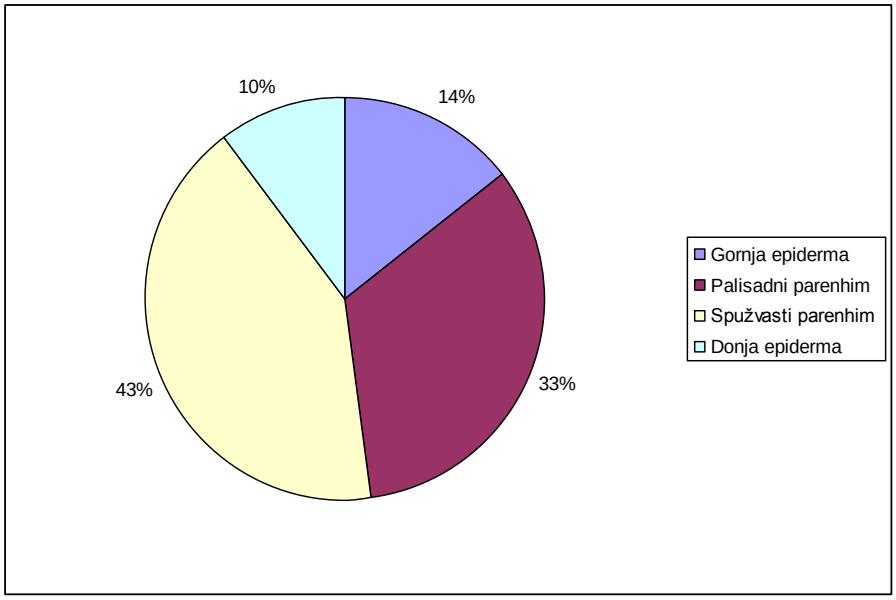
U skupini α zabilježena je najveća debljina gornje epiderme, dok je u skupini βž najmanja. Debljina gornje epiderme u skupini βz veća je od one u skupini βž, a manja od one u skupini α.

U skupini α zabilježena je najveća debljina palisadnog parenhima, dok je u skupini βz najmanja. Debljina palisadnog parenhima u skupini βž veća je od one u skupini βz, a manja od one u skupini α.

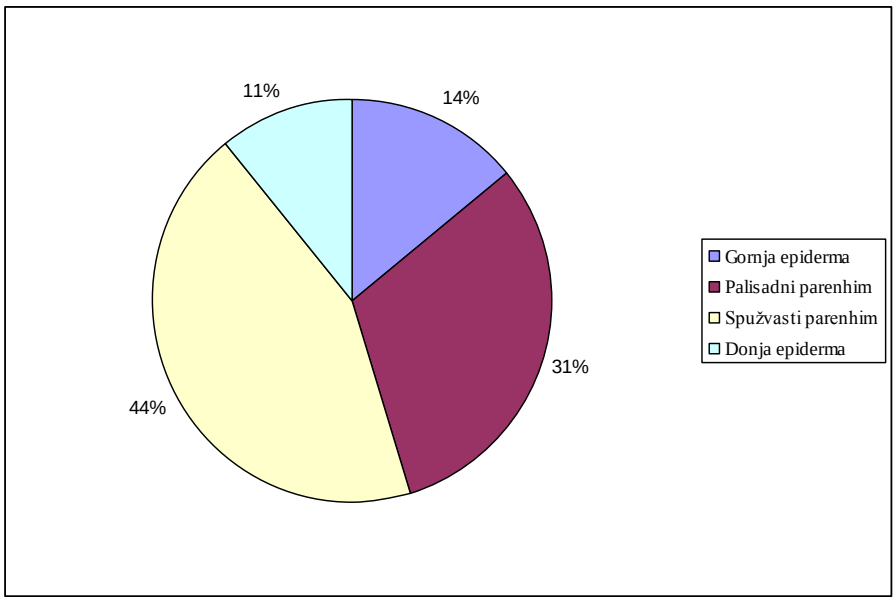
U skupini α zabilježena je najveća debljina spužvastog parenhima, dok je u skupini βz najmanja. Debljina palisadnog parenhima u skupini βž veća je od one u skupini βz, a manja od one u skupini α.

Debljina donje epiderme najveća je u skupini α. Između utvrđenih vrijednosti skupina βž i βz nema statistički značajne razlike te su one značajno manje u odnosu na one u skupini α.

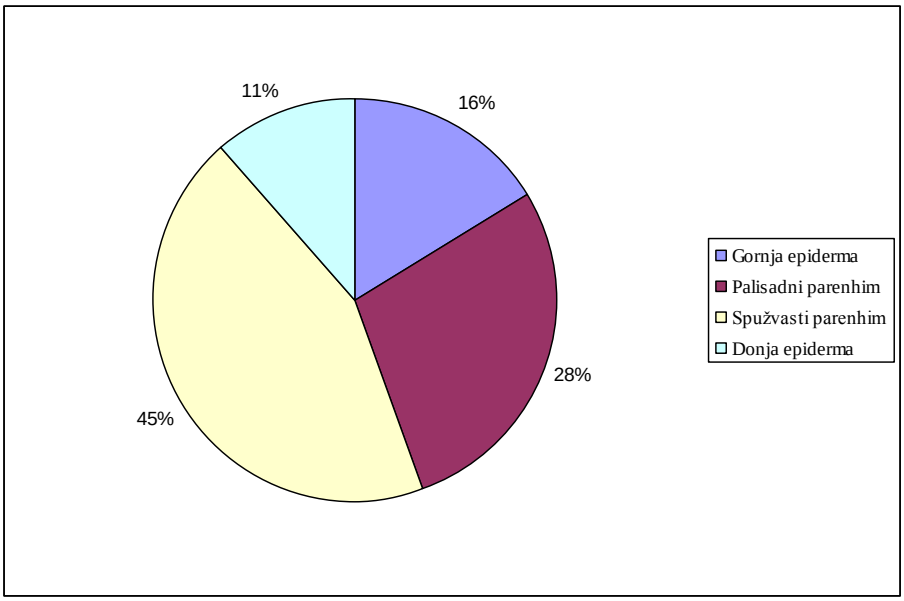
Na slikama 14 - 16 prikazan je postotni udio gornje epiderme, palisadnog parenhima, spužvastog parenhima i donje epiderme u ukupnoj debljini lista za svaku skupinu.



Slika 14. Postotni udio gornje epiderme, palisadnog parenhima, spužvastog parenhima i donje epiderme u ukupnoj debljini lista za skupinu α.



Slika 15. Postotni udio gornje epiderme, palisadnog parenhima, spužvastog parenhima i donje epiderme u ukupnoj debljini žute regije listova skupine β (βž).



Slika 16. Postotni udio gornje epiderme, palisadnog parenhima, spužvastog parenhima i donje epiderme u ukupnoj debljini zelene regije listova skupine β (βz).

Postotni udio gornje epiderme u ukupnoj debljini lista najveći je u skupini βz, a između skupina βž i α nema razlike.

Najveći je udio palisadnog parenhima u skupini α, a najmanji u skupini βz. Skupina βž ima udio veći od onog u skupini βz, a manji od onog u skupini α.

Najveći je udio palisadnog parenhima u skupini βz, a najmanji u skupini α. Skupina βž ima udio veći od onog u skupini α, a manji od onog u skupini βz

Najveći udio donje epiderme je u skupinama βž i βz, između kojih nema razlike. Skupina α ima najmanji postotni udio donje epiderme.

3.2 KONCENTRACIJA FOTOSINTETSKIH PIGMENATA

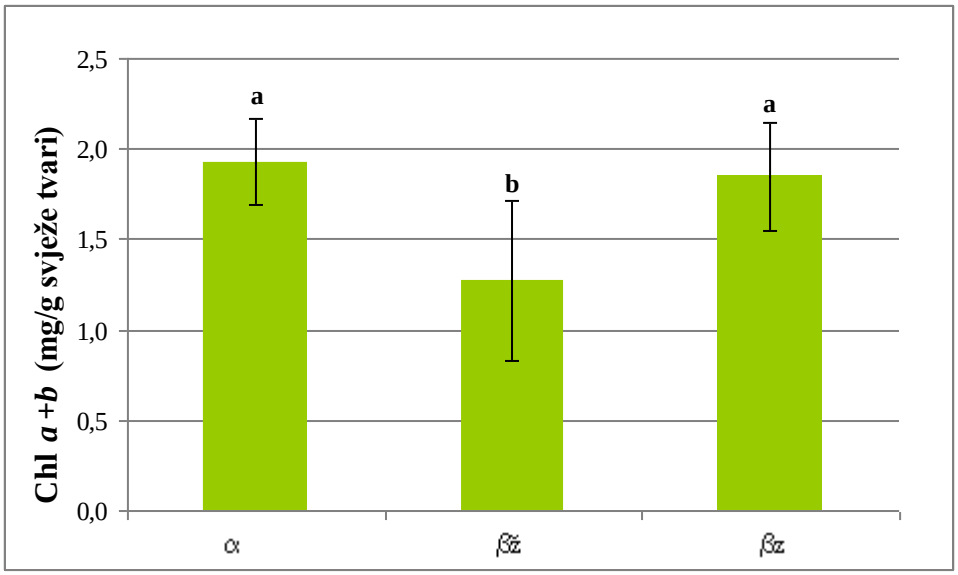
Koncentracija fotosintetskih pigmenata izmjerena je na ekstraktima listova iz skupine α te na ekstraktima zelenih i žutih dijelova listova iz skupine β.

Vrijednosti ukupne koncentracije klorofila (Sl. 17) kretale su se od 1,645 mg/g svježe tvari do 2,154 mg/g svježe tvari sa srednjom vrijednošću 1,929 mg/g svježe tvari (skupina α), od 0,934 mg/g svježe tvari do 1,903 mg/g svježe tvari sa srednjom vrijednošću 1,274 mg/g svježe tvari (žuta regija listova skupine β) te od 1,639 mg/g svježe tvari do 2,277 mg/g svježe tvari sa srednjom vrijednošću 1,850 (zelena regija listova skupine β). Utvrđeno je da se βž skupina statistički razlikuje od ostalih dviju.

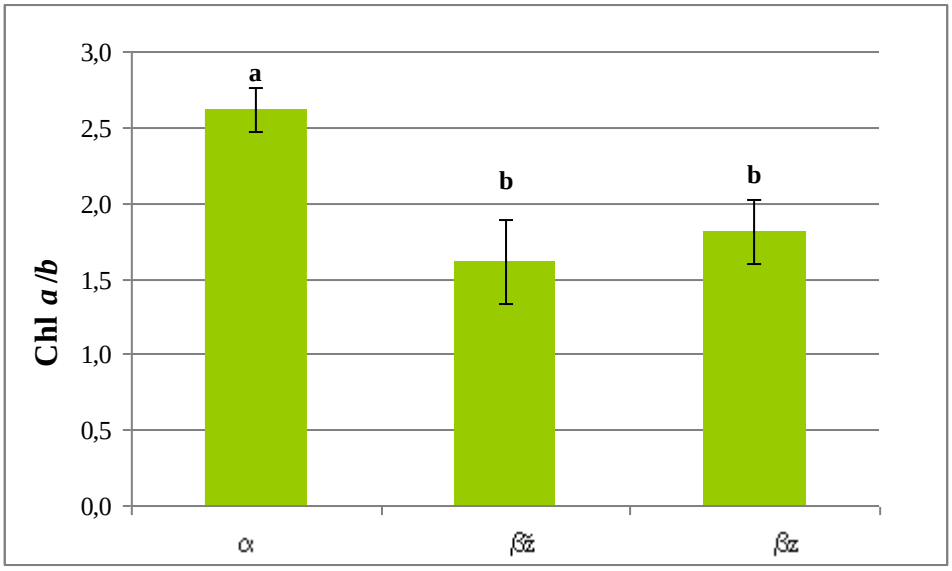
Vrijednosti omjera klorofila *a* i klorofila *b* (Sl. 18), izražene u relativnim jedinicama, kretale su se od 2,422 do 2,740 sa srednjom vrijednošću 2,615 (skupina α), od 1,289 do 1,967 sa srednjom vrijednošću 1,613 (žuta regija listova skupine β) te od 1,575 do 2,087 sa srednjom vrijednošću 1,814 (zelena regija listova skupine β). Utvrđeno je da se skupina α statistički razlikuje od ostalih dviju.

Vrijednosti prosječne koncentracije karotenoida (Sl. 19) kretale su se od 0,325 mg/g svježe tvari do 0,460 mg/g svježe tvari sa srednjom vrijednošću 0,378 mg/g svježe tvari (skupina α), od 0,155 mg/g svježe tvari do 0,359 mg/g svježe tvari sa srednjom vrijednošću 0,222 mg/g svježe tvari (žuta regija listova skupine β) te od 0,250 mg/g svježe tvari do 0,405 mg/g svježe tvari sa srednjom vrijednošću 0,324 mg/g svježe tvari (zelena regija listova skupine β). Statistički značajna razlika utvrđena je između α i žute regije listova iz β skupine, dok se βz nije razlikovao ni od α ni od žute regije listova iz skupine β.

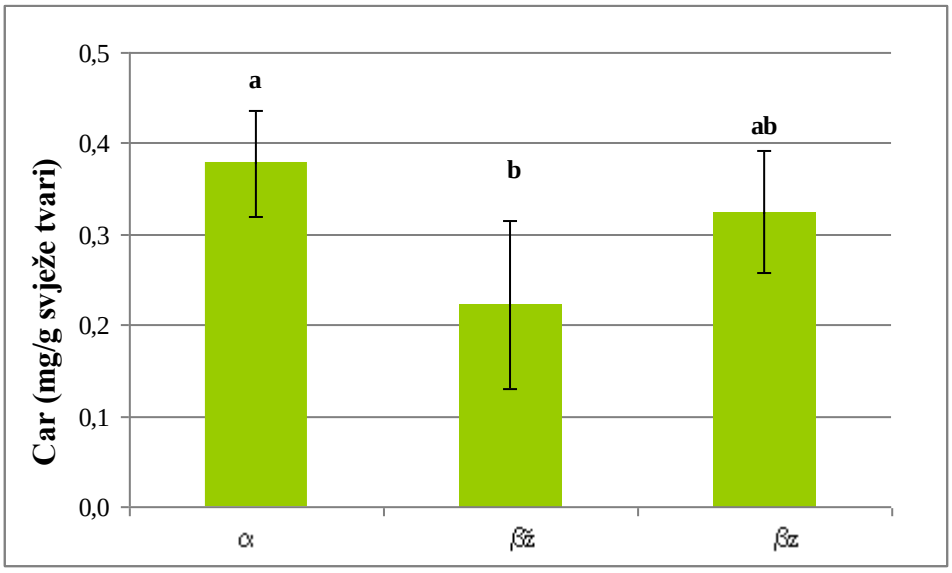
Vrijednosti omjera ukupne koncentracije klorofila naspram koncentracije karotenoida (Sl. 20), izražene u relativnim jedinicama, kretale su se od 4,528 do 5,691 sa srednjom vrijednošću 5,137 (skupina α), od 5,349 do 6,734 sa srednjom vrijednošću 5,881 (žuta regija listova skupine β) te od 5,275 do 6,578 sa srednjom vrijednošću 5,792 (zelena regija listova skupine β). Nije utvrđena statistički značajna razlika između skupina.



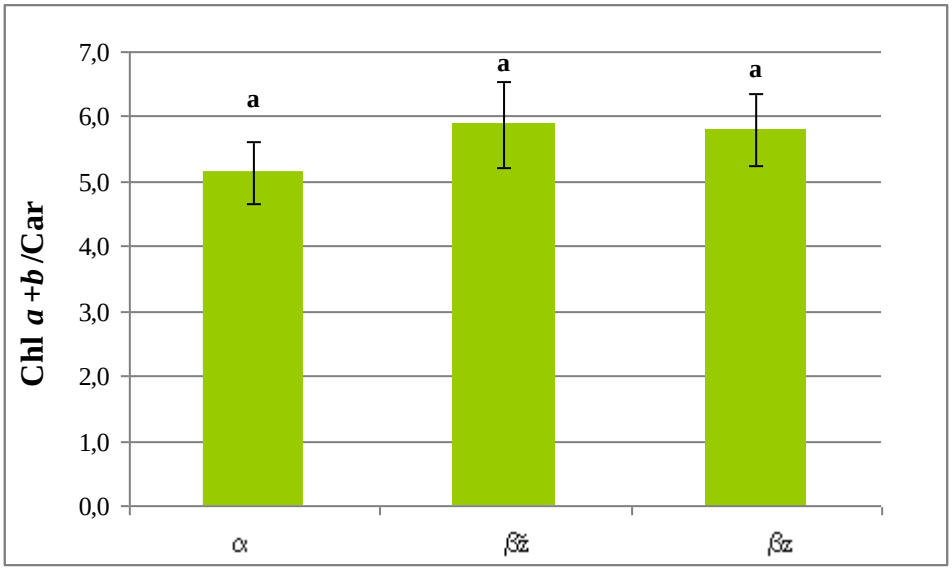
Slika 17. Prosječne vrijednosti i standardne devijacije ukupne koncentracije klorofila *a* i *b* (Chl *a* + *b*), izražene u mg/g svježe tvari, u skupini α, te u žutoj (βž) i zelenoj (βz) regiji listova skupine β. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), P < 0,05.



Slika 18. Prosječne vrijednosti i standardne devijacije međusobnog odnosa klorofila *a* i *b* (Chl *a*/*b*), izražene u relativnim jedinicama, u skupini α, te u žutoj (βž) i zelenoj (βz) regiji listova skupine β. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), P < 0,05.



Slika 19. Prosječne vrijednosti i standardne devijacije ukupne koncentracije karotenoida (Car), izražene u mg/g svježe tvari, u skupini α, te u žutoj (βž) i zelenoj (βz) regiji listova skupine β. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $P < 0,05$.

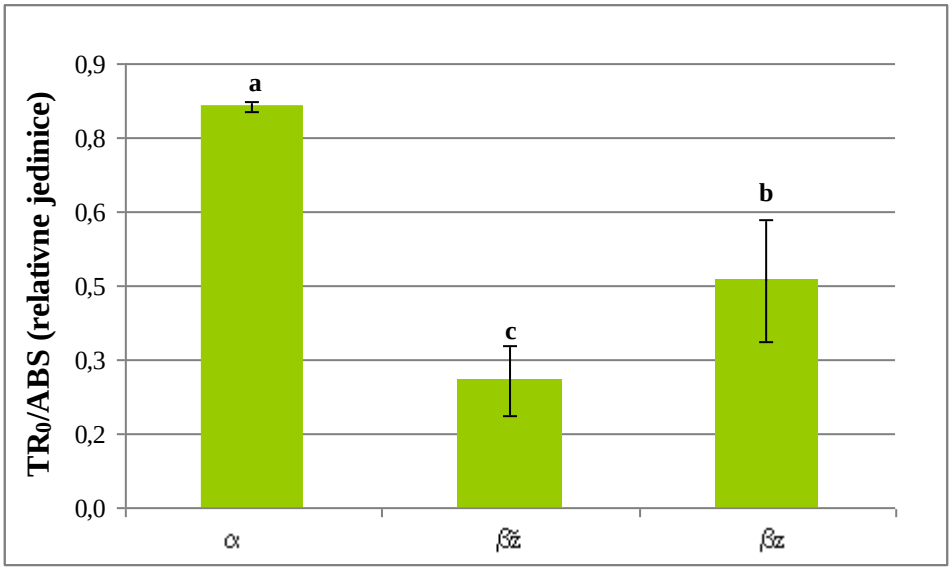


Slika 20. Prosječne vrijednosti i standardne devijacije omjera ukupne koncentracije klorofila naspram koncentracije karotenoida (Chl *a*+*b*/Car), izražene u relativnim jedinicama, u skupini α, te u žutoj (βž) i zelenoj (βz) regiji listova skupine β. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $P < 0,05$.

3.3 PARAMETRI FLUORESCENCIJE KLOROFILA *a*

3.3.1 Maksimalni kvantni prinos

Vrijednosti maksimalnog kvantnog prinosa PSII (TR_0/ABS, Sl. 21), izražene u relativnim jedinicama, kretale su se u rasponu od 0,795 do 0,831 sa srednjom vrijednošću 0,814 (skupna α), 0,096 do 0,383 sa srednjom vrijednošću 0,257 (žuta regija listova skupine β) i 0,154 do 0,674 sa srednjom vrijednošću 0,460 (zelena regija listova skupine β). Utvrđena je statistički značajna razlika između sve 3 skupine.



Slika 21. Prosječne vrijednosti i standardne devijacije maksimalnog kvantnog prinosa PSII (TR_0/ABS), izražene u relativnim jedinicama, u skupini α, te u žutoj (βž) i zelenoj (βz) regiji listova skupine β. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $P < 0,05$.

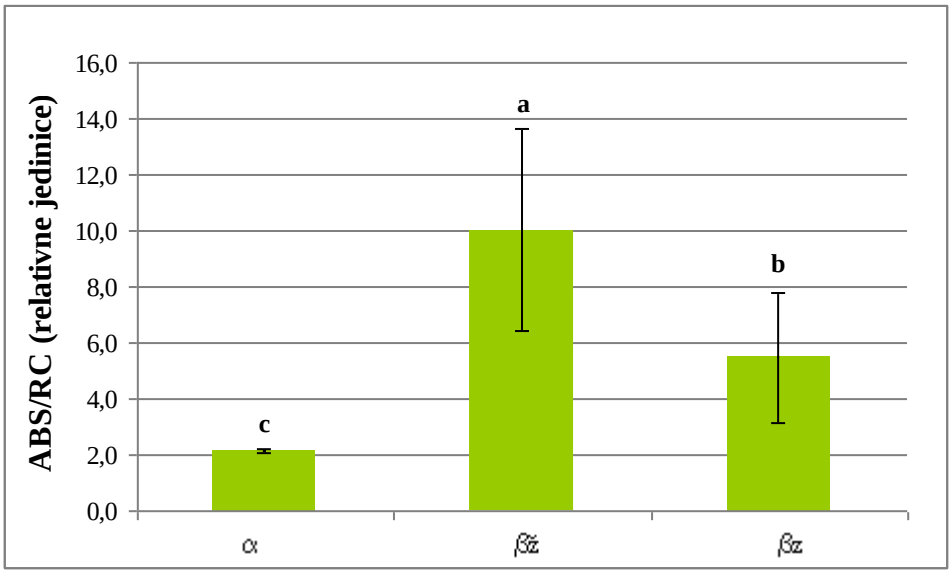
3.3.2 Prijenos energije po aktivnom reakcijskom središtu

Vrijednosti apsorpcije po aktivnom reakcijskom središtu (ABS/RC, Sl. 22), izražene u relativnim jedinicama, kretale su se u rasponu od 1,996 do 2,261 sa srednjom vrijednošću 2,148 (skupina α), od 6,239 do 20,657 sa srednjom vrijednošću 10,022 (žuta regija listova skupine β) te od 2,989 do 13,908 sa srednjom vrijednošću 5,490 (zelena regija listova skupine β). Utvrđena je statistički značajna razlika između sve 3 skupine.

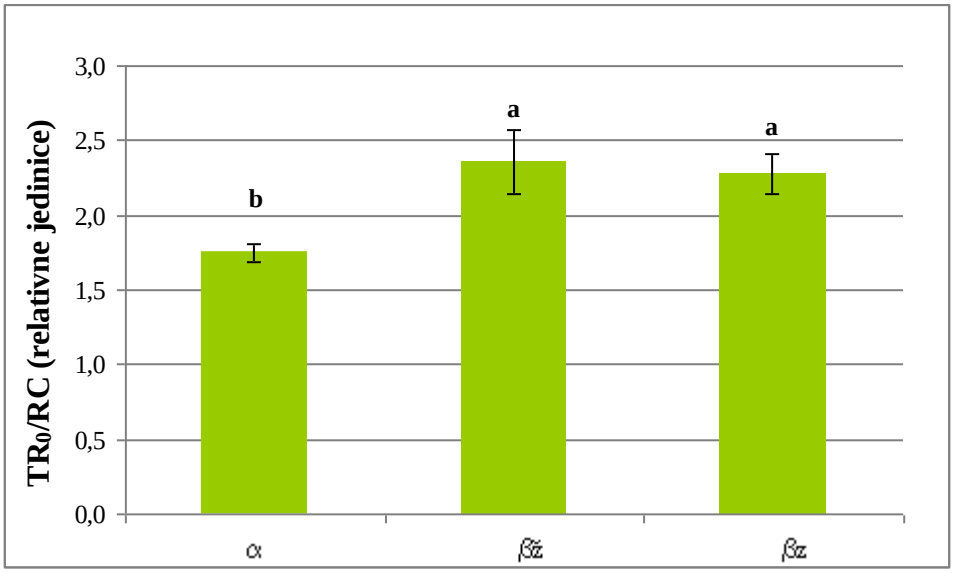
Vrijednosti hvatanja ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu (TR_0/RC, Sl. 23), izražene u relativnim jedinicama, kretale su se u rasponu od 1,641 do 1,837 sa srednjom vrijednošću 1,749 (skupina α), od 2 do 2,789 sa srednjom vrijednosti 2,353 (žuta regija listova skupine β) te od 1,974 do 2,525 sa srednjom vrijednošću 2,279 (zelena regija listova skupine β). Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika između β skupina ali da postoji između njih i skupine α.

Vrijednosti elektronskog transporta po reakcijskom središtu (ET_0/RC, Sl. 24), izražene u relativnim jedinicama, kretale su se u rasponu od 1,208 do 1,374 sa srednjom vrijednošću 1,269 (skupina α), od 0,883 do 1,438 sa srednjom vrijednošću 1,167 (žuta regija listova skupine β) te od 0,468 do 1,245 sa srednjom vrijednošću 1,001 (zelena regija listova skupine β). Utvrđena je statistički značajna razlika između sve 3 skupine.

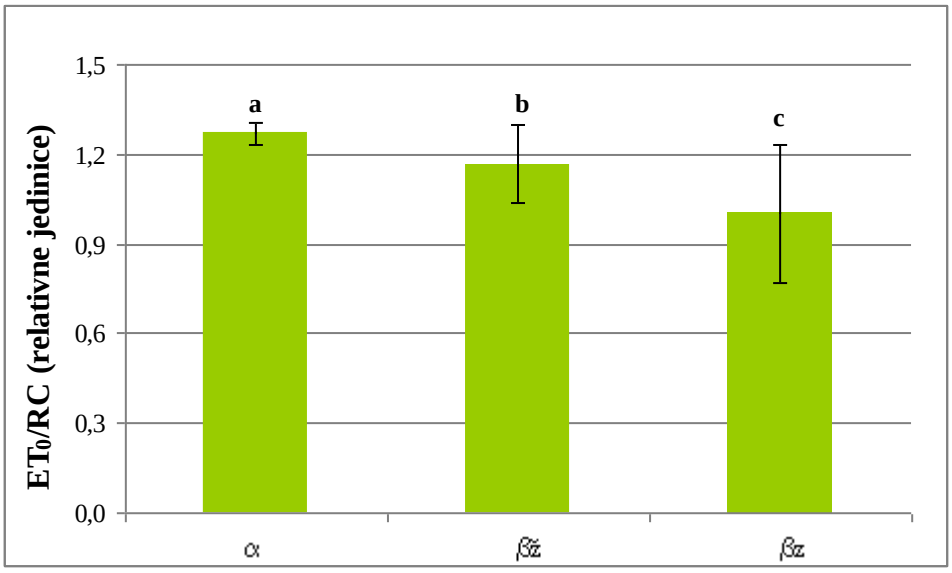
Vrijednosti otpuštanja energije u obliku fluorescencije i topline po aktivnom reakcijskom središtu (DI_0/RC, Sl. 25), izražene u relativnim jedinicama, kretale su se u rasponu od 0,354 do 0,442 sa srednjom vrijednošću 0,399 (skupina α), od 4,102 do 18,657 sa srednjom vrijednošću 7,670 (žuta regija listova skupine β) te od 0,973 do 11,764 sa srednjom vrijednošću 3,211 (zelena regija listova skupine β). Utvrđena je statistički značajna razlika između sve 3 skupine.



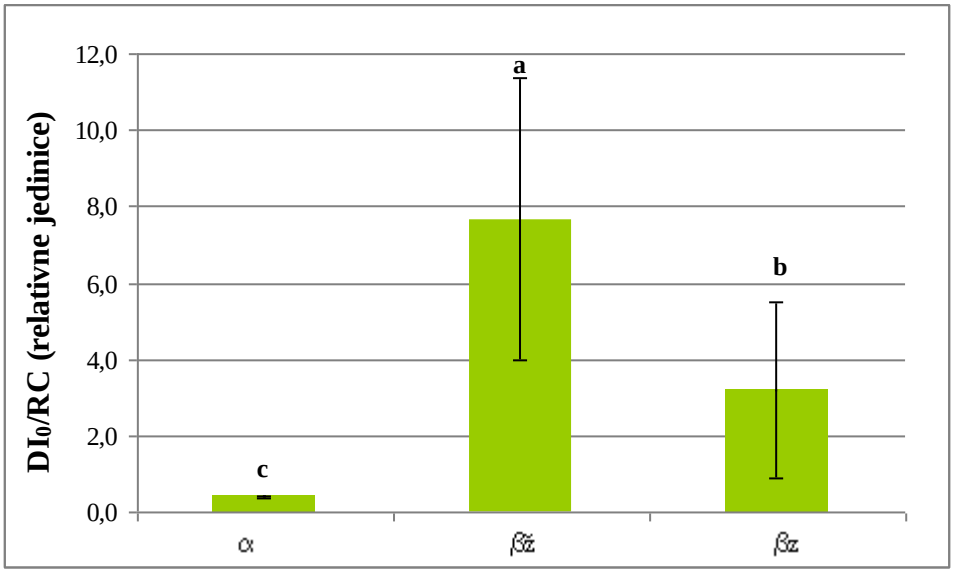
Slika 22. Prosječne vrijednosti i standardne devijacije apsorpcije po aktivnom reakcijskom središtu (ABS/RC), izražene u relativnim jedinicama, u skupini α, te u žutoj (βž) i zelenoj (βz) regiji listova skupine β. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), P < 0,05.



Slika 23. Prosječne vrijednosti i standardne devijacije hvatanja ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu (TR_0/RC), izražene u relativnim jedinicama, u skupini α, te u žutoj (βž) i zelenoj (βz) regiji listova skupine β. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), P < 0,05.



Slika 24. Prosječne vrijednosti i standardne devijacije elektronskog transporta po aktivnom reakcijskom središtu (ET_0/RC), izražene u relativnim jedinicama, u skupini α, te u žutoj (βž) i zelenoj (βz) regiji listova skupine β. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $P < 0,05$.



Slika 25. Prosječne vrijednosti i standardne devijacije otpuštanja energije u obliku fluorescencije i topline po aktivnom reakcijskom središtu (DI_0/RC), izražene u relativnim jedinicama, u skupini α, te u žutoj (βž) i zelenoj (βz) regiji listova skupine β. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $P < 0,05$.

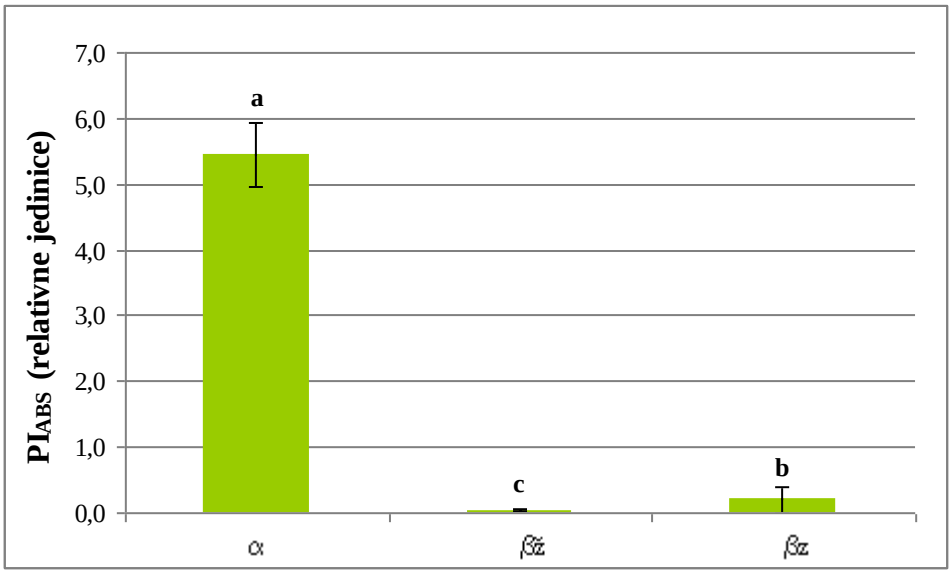
3.3.3 Indeks fotosintetske učinkovitosti

Iz tih vrijednosti izračunate su vrijednosti fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}, Sl. 26), izražene u relativnim jedinicama, koje su se kretale u rasponu od 4,914 do 6,476 (skupina α) sa srednjom vrijednošću 5,440, od 0,006 do 0,089 sa srednjom vrijednošću 0,042 (žuta regija listova skupine β) te od 0,015 do 0,720 sa srednjom vrijednošću 0,202 (zelena regija listova skupine β). Utvrđena je statistički značajna razlika između sve 3 skupine.

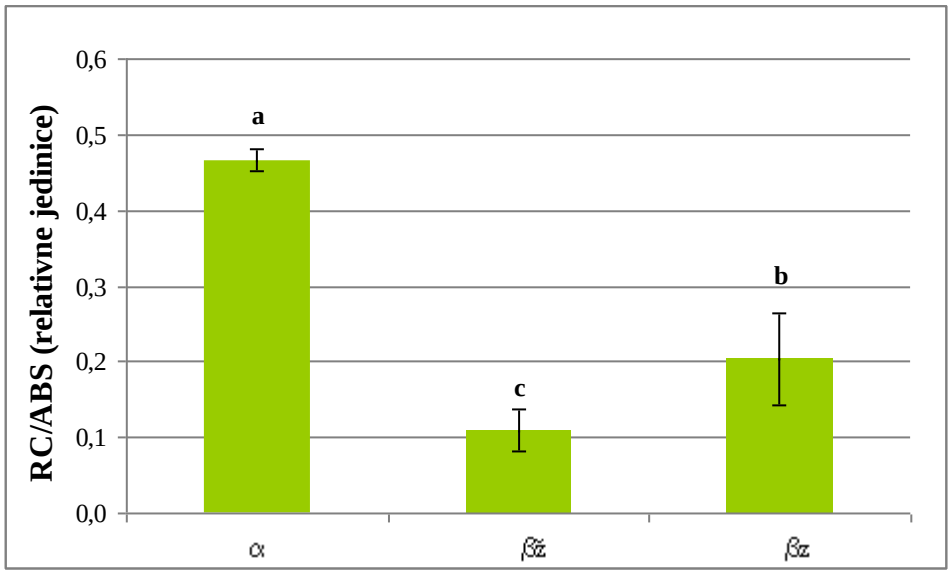
Vrijednosti omjera koncentracije klorofila reakcijskog središta i koncentracije antena klorofila (RC/ABS, Sl. 27) izražene u relativnim jedinicama, kretale su se u rasponu od 0,442 do 0,5 sa srednjom vrijednošću 0,466 (skupina α), od 0,048 do 0,16 sa srednjom vrijednošću 0,109 (žuta regija listova skupine β) te od 0,071 do 0,334 sa srednjom vrijednošću 0,203 (zelena regija listova skupine β). Utvrđena je statistički značajna razlika između sve 3 skupine.

Vrijednosti hvatanja ekscitona i otpuštanja energije (TR_0/DI_0, Sl. 28) izražene u relativnim jedinicama, kretale su se u rasponu od 3,896 do 4,934 sa srednjom vrijednošću 4,396 (skupina α), od 0,107 do 0,621 sa srednjom vrijednošću 0,358 (žuta regija listova skupine β) te od 0,182 do 2,07 sa srednjom vrijednošću 00,949 (zelena regija listova skupine β). Utvrđena je statistički značajna razlika između sve 3 skupine.

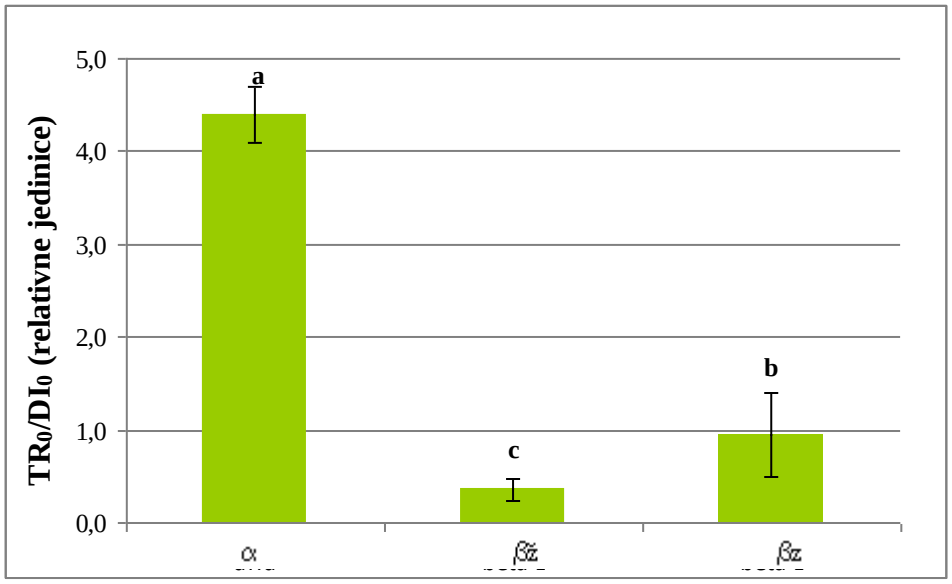
Vrijednosti transporta elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A [$ET_0/(TR_0-ET_0)$, Sl. 29], izražene u relativnim jedinicama, kretale su se u rasponu od 2,357 do 3,223 sa srednjom vrijednošću 2,66 (skupina α), od 0,684 do 1,483 sa srednjom vrijednošću 1,016 (žuta regija listova skupine β) te od 0,264 do 1,368 sa srednjom vrijednošću 0,837 (zelena regija listova skupine β). Utvrđena je statistički značajna razlika između sve 3 skupine.



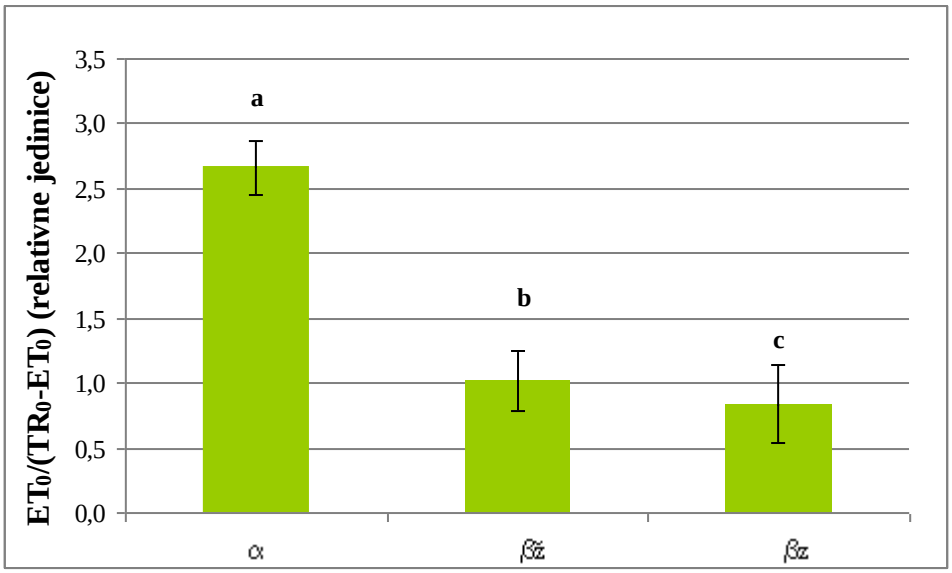
Slika 26. Prosječne vrijednosti i standardne devijacije indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}), izražene u relativnim jedinicama, u skupini α, te u žutoj (βž) i zelenoj (βz) regiji listova skupine β. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $P < 0,05$.



Slika 27. Prosječne vrijednosti i standardne devijacije omjera koncentracije klorofila reakcijskog središta i koncentracije antena klorofila (RC/ABS), izražene u relativnim jedinicama, u skupini α, te u žutoj (βž) i zelenoj (βz) regiji listova skupine β. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $P < 0,05$.



Slika 28. Prosječne vrijednosti i standardne devijacije hvatanja ekscitona i otpuštanja energije (TR_0/DI_0), izražene u relativnim jedinicama, u skupini α, te u žutoj (βž) i zelenoj (βz) regiji listova skupine β. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $P < 0,05$.



Slika 29. Prosječne vrijednosti i standardne devijacije transporta elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A [$ET_0/(TR_0-ET_0)$], izražene u relativnim jedinicama, u skupini α, te u žutoj (βž) i zelenoj (βz) regiji listova skupine β. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $P < 0,05$.

4 RASPRAVA

U ovom istraživanju proučavan je utjecaj različitih svjetlosnih režima na rast i fotosintetsku učinkovitost japanskog dvornika. Skupina α rasla je izložena sunčevoj svjetlosti s promjenjivim intenzitetom svjetlosti, pri čemu je maksimalni izmjereni intenzitet iznosio 1250 μmol m^{-2} s^{-1}. Skupina biljaka β, rasla je u komori s konstantnim, ali znatno nižim PPFD (60 μmol m^{-2} s^{-1}). Budući da je japanski dvornik heliofilna vrsta (Barney i sur., 2006) očekivano je da će skupina biljaka uzgajanih na niskom intenzitetu svjetlosti biti slabijeg rasta i niže fotosintetske učinkovitosti. Poznato je također da nizak intenzitet svjetlosti i zasjenjenje često uzrokuje promjene u razvoju biljaka koje se opisuju kao „izbjegavanje“ sjene (engl. „shade avoidance“). Takve biljke pokazuju brzu elongaciju stabljika i listova, a karakterizira ih i uspravna orijentacija listova (Franklin, 2008). Biljke skupine β su bile nešto nižeg rasta u odnosu na one iz skupine α. Unatoč tome, biljke skupine β su davale dojam bujnijeg izgleda zbog više bočnih izdanaka. Ipak, stabljike bočnih izdanaka su bile tanje i krhljavije, a listovi površinom manji što odgovara očekivanom fenotipu biljaka koje su rasle na niskom intenzitetu svjetlosti.

Vrste tolerantne na nizak intenzitet svjetlosti najčešće pokazuju različite prilagodbe listova kako bi se optimizirala fotosintetska aktivnost u takvim uvjetima; listovi su tanji, dolazi do promjene u količini fotosintetskih pigmenata te promjena u anatomskoj građi listova (Franklin, 2008). Na listovima biljaka skupine β razvila su se klorotična područja poput onih kakva se očekuju na senescentnom listu. Senescencija je strogo regulirani razvojni proces tijekom kojeg dolazi do degradacije biomolekula, u prvom redu fotosintetskih pigmenata i proteina (Brouwer i sur., 2012). U uvjetima stresa dolazi do inducirane senescencije (Gan i Amasino, 1997). U ovom slučaju, stresor od posebnog interesa je nizak intenzitet svjetlosti, poput onog kojemu su bile izložene biljke skupine β.

Nizak intenzitet svjetlosti pokazao je negativan utjecaj na anatomsku građu listova japanskog dvornika. Izmjerene su debljine lista, gornje epiderme, palisadnog parenhima, spužvastog parenhima i donje epiderme. Ovo istraživanje je pokazalo da je ukupna debljina listova, kao i sva četiri mjerena parametra na listovima iz skupine β značajno niža u odnosu na listove iz skupine α (Tab. 2), što je u skladu s navodima. Omjeri gornje i donje epiderme te palisadnog i

spužvastog parenhima pokazali su vrlo slične rezultate kod sva tri tipa uzoraka (Sl. 14, 15 i 16). Listovi biljaka koje su rasle na nižem intenzitetu svjetlosti površinski su manji, posjeduju tanju epidermu i tanji parenhim dok na povišenom intenzitetu svjetlosti dolazi do zadebljanja epiderme, kutikule i parenhima, a ponekad se stvaraju i novi slojevi palisadnog parenhima (James i Bell, 1999; Oguchi i sur., 2005). Prijašnja istraživanja pokazala su da to vrijedi i za članove porodice Polygonaceae (Patterson i sur., 1977).

Deblja gornja epiderma listova izloženih visokom intenzitetu svjetlosti je učinkovita prilagodba listova kako bi se zaštitilo fotosintetsko tkivo (James i Bell, 1999) što je slučaj i u našem istraživanju. Debljina parenhima je smanjena u senescirajućim listovima (Buchanan-Wollaston, 1997) i onima koji su izloženi niskom intenzitetu svjetlosti (Oguchi i sur., 2005). U skladu s tim, obje regije listova skupine β posjeduju tanji parenhim od onih iz skupine α (Sl. 13).

U ovom istraživanju utvrđeno je da su se i ukupna koncentracija klorofila (Chl *a*+*b*) i ukupna koncentracija karotenoida u žutoj regiji lista skupine β smanjile (Sl. 17 i 19), što sugerira da je do kloroze došlo zbog niže koncentracije klorofila, a ne zbog povećane koncentracije karotenoida budući da je poznato da se klorofili u senescentnim listovima razgrađuju brže od karotenoida (Tuba i sur., 2006). To je i potvrđeno izračunom omjera ukupne koncentracije klorofila naspram koncentracije karotenoida (Chl *a*+*b*/Car) jer je pokazano kako ne postoji statistički značajna razlika između skupine α kao ni između žute i zelene regije skupine β (Sl. 20). Jednak omjer Chl *a*+*b*/Car je moguć u slučaju da se karotenoidi, čija je koncentracija u svim uzorcima manja od koncentracije klorofila, razgrađuju sporije od molekula klorofila. Omjer Chl*a*/Chl*b* je smanjen u obje regije listova skupine β što je u skladu s prijašnjim opažanjima o listovima izloženom niskom intenzitetu svjetlosti (Lichtenthaler, 2007) koja sugeriraju bržu razgradnju klorofila *a* od razgradnje klorofila *b* što naši rezultati izračuna omjera Chl*a*/Chl*b* i potvrđuju (Sl. 18).

Mjerenjem fluorescencije klorofila *a* u listovima japanskog dvornika izloženog različitim režimima osvjetljenja utvrđena je učinkovitost fotosintetskog aparata.

Parametar TR_0/ABS (F_v/F_m) predstavlja mjeru potencijalnog maksimalnog kvantnog prinosa PSII i jedan je od najčešće korištenih indikatora stresa i učinkovitosti fotosinteze. U mnogim biljnim vrstama njegova optimalna vrijednost iznosi oko 0,83 (Maxwell i Jonhson, 2000). U ovom istraživanju njegova optimalna vrijednost je izmjerena u skupini α dok je na obje regije

listova skupine β, pogotovu u βž, izmjerena vrijednost značajno niža od optimalne što je i očekivana posljedica niže koncentracije fotosintetskih pigmenata (Sl. 21). U istraživanju na zasjenjenim listovima koji nisu započeli senescenciju (Lichtenthaler, 2013) dobivene su vrijednosti TR_0/ABS tek nešto niže 0,8 što sugerira da iznimno niske vrijednosti TR_0/ABS u βž nisu tek posljedica privremene adaptacije na niži intenzitet svjetlosti već da su uzrokovane oštećenjem fotosintetskog aparata procesima koji se događaju za vrijeme senescencije. Također, znatno niže vrijednosti u listovima skupine β ukazuju na to da je primarna fotokemija PSII ograničavajući korak fotosintetske aktivnosti (Strasser i sur., 2000).

Mjerenja parametara specifičnog protoka energije daju uvid u raspodjelu energije kroz PSII na razini reakcijskog središta. Istraživanja su pokazala da uz mjerenje maksimalnog kvantnog prinosa PSII, parametri specifičnog protoka energije daju detaljniji uvid u funkcioniranje PSII (Force, 2003). Energija fotona apsorbirana pomoću fotosintetskih pigmenata na početku procesa fotosinteze ima tri potencijalne sudbine. Nakon što molekule klorofila antena kompleksa fotosustava apsorbiraju foton (ABS), pokreće se energetska kaskada prijenosa ekscitacijske energije kroz antena kompleks s molekule na molekulu. Dio te energije se otpusti u obliku topline (DI_0), a dio bude uhvaćen u reakcijskom središtu (TR_0) i iskoristi se za redukciju Q_A (ET_0) čime se energija dalje šalje kroz transportni lanac elektrona (Strasser 2004). Ovo istraživanje je pokazalo da su parametri ABS/RC (apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu) i TR_0/RC (hvatanja ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu kada su sva reakcijska središta otvorena) porasli na obje regije listova iz skupine β (Sl. 22 i 23), dok parametar ET_0/RC (elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu) opada (Sl. 24). Lichtenthaler i sur., 2007b to objašnjavaju time što biljke prilagođene na visoki intenzitet svjetlosti imaju funkcionalno manje antena komplekse kako bi izbjegle fotoinhibiciju pretjeranim podraživanjem fotosustava, no budući da imaju funkcionalne fotosustave, elektronski transport se normalno odvija. Budući da su molekule klorofila u antena kompleksu pretežito molekule klorofila *b* (Busheva i sur., 1991), za očekivati je da će listovi iz skupine α imati veći Chl*a*/Chl*b* omjer, što je i potvrđeno ovim istraživanjem. Okabe i sur., 1977 navode da je smanjena ukupna koncentracija klorofila koja se pojavljuje u senescentnom lišću povezana s manjim fotosintetskim jedinicama veće efikasnosti što objašnjava zašto je u skupini βž vrijednost ABS/RC najveća unatoč najmanjoj koncentraciji ukupnog klorofila.
Budući da senescentni listovi imaju mnogo veći kapacitet za apsorpciju i hvatanje ekscitona u reakcijska središta u odnosu na mogućnost transportiranja elektrona dalje u fotosustav,

pobudnu energiju moraju nekako izbaciti iz svojih pobuđenih reakcijskih središta (Strasser i sur., 2004). Ta prekomjerna energija se otpušta u obliku topline ili fluorescencije, što je opisano parametrom DI_0/RC (otpuštanje energije po aktivnom reakcijskom središtu u trenutku kada su sva središta otvorena) (Strasser i sur., 2004). Ustanovljeno je da je najvišu vrijednost parametra DI_0/RC imaju žute regije listova skupine β, a najmanju listovi skupine α (Sl. 25). Povećana apsorpcija (ABS/RC) i protok uhvaćenih elektrona (TR_0/RC), uz paralelni pad TR_0/ABS vrijednosti ukazuje da je došlo do inaktivacije reakcijskih središta (Yusuf i sur., 2010). Takva inaktivirana središta se nazivaju i „tiha" središta (engl. „silent" centres) i ona učinkovito love pobudnu energiju, ali ju mogu isključivo otpustiti u obliku topline (Strasser i sur., 2004). Povećanje DI_0/RC parametra u listovima skupine β praćeno je smanjenjem parametra ET_0/RC što potvrđuje da su reakcijska središta inaktivirana i transformirana u „tiha".

Za detaljniji uvid u vitalnost i učinkovitost fotosinteze izračunat je indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}), parametar koji objedinjuje sve ključne događaje u reakcijskom središtu PSII o kojima ovisi fotosintetska aktivnost (gustoća reakcijskih središta, omjer protoka uhvaćene i rasipane energije te elektronski transport daje od primarnog akceptora (Q_A^-) (van Heerden i sur., 2007; Lepeduš i sur., 2012). Panda i Sarkar (2013) navode da vrijednost PI_{ABS} znatno opada u senescentnim listovima što je u skladu s nalazima ovog istraživanja. Listovi biljaka iz skupine α pokazali su značajno više vrijednosti u odnosu na obje regije listova iz skupine β (Sl. 26). Niže vrijednosti PI_{ABS} parametra na listovima iz skupine β posljedica su značajno nižih vrijednosti sva tri parametara: RC/ABS (Slika 27), TR_0/DI_0 (Slika 28) i $(ET_0/(TR_0-ET_0)$ (Slika 29). Izrazito niske vrijednosti izmjerene na listovima β skupine ukazuju na smanjenje funkcioniranja PSII kao posljedicu niskog intenziteta svjetlosti.

5 ZAKLJUČAK

Na temelju istraživanja anatomije listova i učinkovitosti fotosustava II mjerenjem fluorescencije klorofila *a* i koncentracije fotosintetskih pigmenata u listovima japanskog dvornika (*Reynoutria japonica* Houtt.) može se zaključiti slijedeće:

1. Nizak intenzitet svjetlosti imao je negativan utjecaj na rast biljaka. Dok su tanji listovi uobičajena prilagodba na niski intenzitet svjetlosti, klorotične pruge ukazuju da je nizak intenzitet svjetlosti inducirao proces senescencije.

2. Koncentracija fotosintetskih pigmenata (Chl *a*+*b*) te vrijednost omjera klorofila *a* i *b* (Chl *a/b*) je smanjena u biljkama izloženima niskom intenzitetu svjetlosti dok se omjer ukupnih klorofila naspram karotenoida (Chl *a/b*/Car) nije statistički značajno razlikovao. To potvrđuje da je inducirani proces senecsencije uslijed izloženosti niskom intenzitetu svjetlosti doveo do razgradnje fotosintetskih pigmenata.

3. Smanjeni omjer klorofila *a* i *b* (Chl *a/b*) je doveo do porasta apsorpcije po aktivnom reakcijskom središtu (ABS/RC). Povećani protok uhvaćenih elektrona (TR_0/RC) uz istovremeno smanjene elektronskog transporta po aktivnom reakcijskom središtu (ET_0/RC) rezultiralo je pojačanim otpuštanjem energije u obliku topline (DI_0/RC) što je pokazalo da je nizak intenzitet svjetlosti inaktivirao reakcijska središta PSII.

4. Maksimalni kvantni prinos PSII (TR_0/ABS) kao i indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) su bili niži u biljkama izloženim niskom intenzitetu svjetlosti što dokazuje njegov negativan utjecaj na učinkovitost fotosintetskog aparata.

6 LITERATURA

Alberternst B, Boehmer HJ. 2011. NOBANIS-Invasive alien species fact sheet-*Fallopia japonica*. Online Database of the European Network on Invasive Alien Species-NOBANIS, 1-15.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P 2002. *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc., New York, USA, 793-807.

Bačić T 2003. *Morfologija i anatomija bilja*. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Pedagoški fakultet, Osijek, Hrvatska, 193-236.

Bailey S, Walters RG, Jansson S, Horton P. 2001. Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. *Planta* 213: 794-801.

Barber J, Kuhlbrandt W. 1999. Photosystem II. *Curr Opin Struc Biol* 9: 469-475.

Barney JN, Tharayil N, DiTommaso A, Bhowmik PC. 2006. The biology of invasive alien plants in Canada. 5. *Polygonum cuspidatum* Sieb. & Zucc. [= *Fallopia japonica* (Houtt.) Ronse Decr.]. *Can J Plant Sci* 86: 887-905.

Beerling DJ, Bailey JP, Conolly AP. 1994. *Fallopia japonica* (Houtt.) Ronse Decraene (*Reynoutria japonica* Houtt.; *Polygonum cuspidatum* Sieb. & Zucc.). *J Eco* 82: 959-979.

Brouwer B, Ziolkowska A, Bagard M, Keech O, Gardestrom P. 2012. The impact of light intensity on shade-induced leaf senescence. *Plant Cell Environ* 35: 1084-1098.

Buchanan-Wollaston V. 1997. The molecular biology of leaf senescence. *J Exp Bot* 48: 181-199.

Bunawan H, Talip N, Noor NM. 2011. Foliar anatomy and micromorphology of *Polygonum minus* Huds. And their taxonomic implications. *AJCS* 5: 123-127

Busheva M, Garab G, Liker E, Toth Z, Szell M, Nagy F. 1990. Diurinal fluctuations in the content and functional properties of the light harvesting chlorophyll *a*/*b* complex in thylakoid membranes. *Plant Physiol* 95: 997-1003.

Cady CW, Crabtree RH, Brudvig GW. 2008. Functional models for the oxygen-evolving complex of photosystem II. *Coordin Chem Rev* 252: 444-455.

von Denffer D, Ziegler H 1988. *Botanika: Morfologija i fiziologija*. Školska knjiga, Zagreb, Hrvatska, 182-291.

Dreuw A, Fleming GR, Head-Gordon M. 2003. Chlorophyll fluorescence quenching by xanthophylls. *Phys Chem Chem Phys* 5: 3247-3256.

Force L, Critchley C, van Rensen JJS. 2003. New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. *Photosynth Res* 78: 17-33.

Fracheboud Y 2004. Using chlorophyll fluorescence to study photosynthesis. Presentation from the Institute of Plant Sciences ETH, Universitätstrasse 2.

Frankiln KA. 2008. Shade avoidance. *New Phytol* 179: 930-944.

Gan S, Amasino RM. 1997. Making sense of senescence: Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence . *Plant Physiol* 113: 313-319.

Govindjee, Whitmarsh J. 1999. The photosynthetic process. U: Singhal GS, Renger G, Sopory SK, Irrgang KD, Govindjee (ur) *Concepts in photobiology: Photosynthesis and photomorphogenesis*. Narosa Publishing House, New Delhi, Indija, 11-51.

Guidi L, Innocenti ED. 2011. Imaging of chlorophyll *a* fluorescence: A tool to study abiotic stress in plants. U: Shanker A (ur) *Abiotic stress in plants-mechanisms and adaptations*. InTech, Rijeka, Hrvatska, 1-25.

van Heerden PDR, Swanepoel JW, Kruger GHJ. 2007. Modulation of photosynthesis by drought in two desert scrub species exhibiting C3-mode CO_2 assimilation. *Environ Exp Bot* 61: 124-136.

Heldt HW 2005. *Plant biochemistry*. Elsevier Academic Press, Burlington, USA, 45-135.

James SA, Bell DT. 1999. Influence of light availability on leaf structure and growth of two *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* provenances. *Tree Physiol* 20: 1007-1018.

Lehninger 2005. *Principles of biochemistry*. Freeman and Company, New York, USA, 723-751.

Lepeduš H, Brkić I, Cesar V, Jurković V, Antunović J, Jambrović A, Brkić J, Šimić D. 2012. Chlorophyll fluorescence analysis of photosynthetic performance in seven maize inbred lines under water-limited conditions. *Period Biol* 114: 73-76.

Lepeduš H, Cesar V 2010. *Osnove biljne histologije i anatomije vegetativnih organa*. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju, Osijek, Hrvatska.

Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol* 148: 349-382.

Lichtenthaler HK, Ač A, Marek MV, Kalina J, Urban O. 2007a. Differences in pigment composition, photosynthetic rates and chlorophyll fluorescence images of sun and shade leaves of four tree species. *Plant Physiol Bioch* 45: 577-588.

Lichtenthaler HK, Babani F, Langsdorf G. 2007b. Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic acitivity in sun and shade leaves of trees. *Photosynth Res* 93: 235-244.

Lichtenthaler HK, Babani F, Navratil M, Buschmann C. 2013. Chlorophyll fluorescence kinetics, photosynthetic activity, and pigment composition of blue-shade and half-shade leaves as compared to sun and shade leaves of different trees. *Photosynth Res* 1-12.

Lichtenthaler HK, Burkart S. 1999. Photosynthesis and high light stress. *Bulg J Plant Physiol* 25: 3-16.

Lichtenthaler HK, Buschmann C, Doll M, Fietz HJ, Bach T, Kozel U, Meier D, Rahmsdorf U. 1981. Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynth Res* 2: 115-141.

Lu C, Lu Q, Zhang J, Kuang T. 2001. Characterization of photosynthetic pigment composition, photosystem II photochemistry and thermal energy dissipation during leaf senescence of wheat plants grown in the field. *J Exp Bot* 52: 1805-1810.

Lu C, Zhang J. 1998. Modification in photoystem II photochemistry in senescent leaves of maize plants. *J Exp Bot* 49: 1671-1679.

Matile P, Hortensteiner S, Thomas H, Krautler B. 1996. Chlorophyll breakdown in senescent leaves. *Plant Physiol* 112: 1403-1409.

Maxwell K, Johnson GN. 2000. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *J Exp Bot* 345: 659-668.

Misra AN, Misra M, Singh R 2012. Chlorophyll fluorescence in plant biology. U: Misra AN (ur*) Biophysics*. InTech, Rijeka, Hrvatska, 171-193.

Novak N, Kravaščan M 2011. Invazivne strane korovne vrste u Republici Hrvatskoj. Tangir, Samobor, Hrvatska, 16-20.

Oguchi R, Hikosaka K, Hirose T. 2005. Leaf anatomy as a constraint for photoynthetic acclimation: Differential responses in leaf anatomy to increasing growth irradiance among three deciduous trees. *Plant Cell Environ* 28: 916-927.

Okabe K, Schmid GH, Straub J. 1977. Genetic characterization and high efficiency photosynthesis of an aurea mutant of tobacco. *Plant Physiol* 60:150-156.

Ort DR, Yocum CF 1996. *Oxygenic photosynthesis: The light reactions*. Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, Boston, London, 620-641.

Osiewacz HD 2003. *Aging of organisms*. Springer Science and Media, Dordrecht, Nizozemska, 55-79.

Panda D, Sarkar RK. 2013. Natural leaf senescence: probed by chlorophyll fluorescence, CO_2 photosynthetic rate and antioxidant enzyme activities during grain filling in different rice cultivars. *Physiol Mol Biol Plants* 19: 43-51.

Pandey S, Kumar S, Nagar PK. 2003. Photosynthetic performance of *Ginko biloba* L. grown under high and low irradiance. *Photosynthetica* 41: 505-511.

Patterson DT, Longstreth DJ, Peet MM. 1977. Photosynthetic adaptation to light intensity in Sakhalin knotweed (*Polygonum sachalinense*). *Weed Sci* 25: 319-323.

Papageorgiou GC, Govindjee 2004. *Chlorophyll a fluorescence: A signature of photosynthesis*. Springer, Nizozemska, 1-42.

Pevalek-Kozlina B 2003. *Fiziologija bilja*. Profil, Zagreb, Hrvatska, 156-220.

Pietrzykowska M, Suorsa M, Semchonok DA, Tikkanen M, Boekema EJ, Aro EM, Jansson S. 2014. The light-harvesting chlorophyll *a/b* binding proteins Lhcb1 and Lhcb2 play complementary roles during state transition in *arabidopsis. Plant Cell* 26: 3646-3660.

Rascher U, Nedbal L. 2006. Dynamics of photosynthesis in fluctuating light. *Curr Opin Plant Biol* 9: 671-678.

Sarry JE, Montillet JC, Sauviare Y, Havaux M. 1994. The protective function of the xanthophyll cycle in photoynthesis. FEBS *Lett* 353: 147 -150.

Soudry E, Ulitzur S, Gepstein S. 2004. Accumulation and remobilization of amino acids during senescence of detached and attached leaves: In planta analysis of tryptophan levels by recombinant luminescent bacteria. *J Exp Bot* 56: 695-702.

Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. U: Yunus M, Pathre U, Mohanty P (ur) *Probing photosynthesis: Mechanism, regulation and adaptation*. Taylor and Francis, London, UK, 443-480.

Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M. 2004. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient . U: Papageorgiou GC, Govindjee (ur*) Chlorophyll a fluorescence: A signature of photosynthesis*. Springer, Nizozemska, 321-362.

Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL 2002. *Biochemistry*, 5th *edition*. W.H. Freeman, New York, USA, 377-420.

Tuba Z, Lichtenthaler HK, Csintalan Z, Nagy Z, Szentle K. 2006. Loss of chlorophylls, cessation of photosynthetic CO_2 assimilation and respiration in the poikilochlorophyllous plant *Xerophyta scabrida* during desiccation. *Physiol Plantarum* 96: 383-388.

Whitmarsh J, Govindjee. 2001. Photosystem II U: Govindjee (ur) *Encyclopedia of life scineces*. Macmillan Publishers Ltd, London, UK, 1-13.

Yusuf MA, Kumar D, Rajwanshi R, Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Govindjee, Sarin NB. 2010. Overexpression of γ-tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll *a* fluorescence measurments. *Biochim Biophys Acta* 1979: 1428-1438

Zervoudakis G, Salahas G, Kaspiris G, Konstantopoulou E. 2012. Influence of light intensity on growth and physiological characteristics of common sage (*Salvia officinalis* L.). *Braz Arch Biol Techn* 55: 89-95.

Zhang H, Zhong H, Wang J, Sui X, Xu Nan. 2016. Adaptive changes in chlorophyll content and photosynthetic features to low light in *Physocarpus amurensis* Maxim and *Physocarpus opulifolius* „ Diablo“. *PeerJ* 4: e2125

Zolla L, Timperio AM, Walcher W, Huber CG. 2003. Proteomics of light-harvesting proteins in different plant species. Analysis and comparison by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. Photosystem II. *Plant Physiol* 131: 198-214.

WEB IZVORI

1. http://hirc.botanic.hr/fcd/

2. http://www.cabi.org/isc/datasheet/23875

3. http://www.europe-aliens.org/speciesFactsheet.do?speciesId=8137#

4.http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-2-molecular-biology/29-photosynthesis/chloroplasts.html

5. http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/biology/etcyc.html

6. https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/photosynthesis-8/the-light-dependent-reactions-of-photosynthesis-81/absorption-of-light-375-11601/

7. http://klima.hr/klima_arhiva.php

8. http://www.timeanddate.com/sun/croatia/osijek?month=5&year=2015