

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij

Molekularne bioznanosti

Selma Mlinarić

**Fotosintetska učinkovitost i antioksidativni odgovor
mladih i razvijenih listova smokve (*Ficus carica* L.)
u uvjetima svjetlosnog stresa**

Doktorski rad

Osijek, 2013.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij

Molekularne bioznanosti

Selma Mlinarić

**Fotosintetska učinkovitost i antioksidativni odgovor
mladih i razvijenih listova smokve (*Ficus carica* L.)
u uvjetima svjetlosnog stresa**

Doktorski rad predložen je
Sveučilišnom Vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne doktorske studije
u svrhu stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti
na Sveučilišnom poslijediplomskom interdisciplinarnom doktorskom
studiju Molekularne bioznanosti – modul biologija biljaka

Osijek, 2013.

Doktorski rad je izrađen u Laboratoriju za staničnu i molekularnu biologiju biljaka Odjela za Biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, pod mentorstvom prof. dr. sc. Hrvoja Lepeduša i prof. dr. sc. Vere Cesar, u sklopu znanstvenih projekata Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta RH: „Utjecaj oksidativnog stresa na organizaciju u funkciju biljnih stanica“ (073-0731674-0552) kojega je voditelj prof. dr. sc. Hrvoje Lepeduš i "Stanična i tkivna diferencijacija tijekom razvoja biljnih organa" (073-0731674-0841) prof. dr. sc. Vere Cesar.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni
doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Fotosintetska učinkovitost i antioksidativni odgovor mladih i razvijenih listova smokve (*Ficus carica* L.) u uvjetima svjetlosnog stresa

Selma Mlinarić

Rad je izrađen u: Laboratoriju za staničnu i molekularnu biologiju biljaka Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor/i: Prof.dr.sc. Hrvoje Lepeduš
Prof.dr.sc. Vera Cesar

Kratki sažetak doktorskog rada:

U ovom radu istraživanja su provedena na običnoj smokvi (*Ficus carica* L.) s ciljem utvrđivanja fotosintetske učinkovitosti i razine antioksidativnog odgovora mladih i razvijenih listova na uvjete svjetlosnog stresa. Istraživao se utjecaj visokog intenziteta svjetlosti i povišene temperature na dnevni ciklus (tijekom 24 sata), kao i utjecaj visokog intenziteta svjetlosti u kombinaciji s povišenom (HL35), odnosno sniženom temperaturom (HL10) i niskog intenziteta svjetlosti također u kombinaciji s povišenom (LL35), odnosno sniženom temperaturom (LL10). Također, istraživao se i utjecaj nigericina (NGC) i ditiotreitola (DTT) koji su inhibitori nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila *a*. Tijekom dnevnog ciklusa uočeno je smanjenje fotosintetske učinkovitosti uslijed fotoinhibitornog djelovanja visokog intenziteta svjetlosti i povišene temperature tijekom podneva. Mladi su listovi podložniji fotoinhibiciji, a od utjecaja stresa bore se povećanim otpuštanjem apsorbirane energije nefotokemijskim putem i funkcionalnijim antioksidativnim sustavom. Razvijeni listovi u fotoinhibitornim uvjetima učinkovitije upotrebljavaju apsorbiranu energiju u fotokemijskim reakcijama, smanjuju fotosintetsku aktivnost te pokazuju brži oporavak od fotoinhibicije. U eksperimentu kombinacije različitih intenziteta svjetlosti i temperature mladi su listovi pokazali veću osjetljivost na visoki intenzitet svjetlosti i sniženu temperaturu (HL10), dok su razvijeni listovi pokazali veću osjetljivost na visoki intenzitet svjetlosti i povišenu temperaturu (HL35). Povišena temperatura uzrokovala je oštećenja lipida u oba tipa listova, neovisno o intenzitetu svjetlosti, a aktivnost antioksidativnih enzima ukazuje na različite strategije zaštite mladih i razvijenih listova. Utjecaj inhibitora nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila *a* u kombinaciji s primjenom visokog intenziteta svjetlosti i povišene temperature (HL35) pokazao je veću osjetljivost mladih listova na NGC i razvijenih listova na DTT što je bilo pokazano jačim smanjenjem fotosintetske učinkovitosti i smanjenjem aktivnosti antioksidativnih enzima.

Broj stranica: 190

Broj slika: 36

Broj tablica: 14

Broj literaturnih navoda: 230

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: smokva, fluorescencija klorofila *a*, OJIP test, NPQ, antioksidativni sustav, svjetlosni stres

Datum obrane: 16. 5. 2013.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. **Prof.dr.sc. Hrvoje Fulgosi**, znanstveni savjetnik Instituta Ruđer Bošković, predsjednik;
2. **Prof.dr.sc. Hrvoje Lepeduš**, izvanredni profesor Filozofskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, mentor 1 i član;
3. **Prof.dr.sc. Vera Cesar**, izvanredna profesorica Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, mentor 2 i član;
4. **Doc.dr.sc. Martina Skendrović Babojelić**, docentica Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, član;
5. **Prof.dr.sc. Irena Jug**, izvanredna profesorica Poljoprivrednog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, član;
6. **Dr.sc. Domagoj Šimić**, znanstveni savjetnik Poljoprivrednog instituta Osijek, zamjena člana

Rad je pohranjen u: Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Natural sciences

Scientific Field: Biology

Photosynthetic efficiency and antioxidative response in young and mature leaves of common fig (*Ficus carica* L.) during light stress

Selma Mlinarić

Thesis performed at: Laboratory of plant cell and molecular biology, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Supervisor/s: Hrvoje Lepeduš, PhD, Associate Professor
Vera Cesar, PhD, Associate Professor

Short abstract:

In this work the aim was to determine photosynthetic efficiency and the level of antioxidant response in young and mature leaves of common fig plant (*Ficus carica* L.) exposed to light stress. This investigation was comprehended of three parts: determining the influence of diurnal changes in light intensity and temperature, showing the influence of high light intensity and elevated temperature (HL35) or lower temperature (HL10) as well as influence of low light intensity combined with elevated (LL35) or lower temperature (LL10). Also, the influence of nigericin (NGC) and dithiothreitol (DDT) as inhibitors of nonphotochemical fluorescence a quenching was investigated. During 24 hours, in midday high irradiance and elevated temperature caused decrease in photosynthetic efficiency. Photoinhibition was more pronounced in young leaves. They dissipated greater fraction of absorbed light by nonphotochemical processes and they had more functional antioxidant system as response to stressful conditions. In mature leaves absorbed light was used efficiently for photochemical reactions, photosynthetic performance was down-regulated but they showed faster recovery after photoinhibition. Different combinations of light intensity and temperature showed increased sensitivity of young leaves to HL10 treatment as well as pronounced impact of HL35 treatment on mature leaves. Elevated temperature caused lipid peroxidation on both types of leaves while the activities of antioxidative enzymes indicated different protection strategies in young and mature leaves. Inhibitors of nonphotochemical fluorescence a quenching in combination with stress caused by high light and elevated temperature (HL35) showed greater sensitivity in young leaves to NGC and in mature leaves to DTT. This was shown by decrease of photosynthetic performance and decrease of antioxidant enzymes activity.

Number of pages: 190

Number of figures: 36

Number of tables: 14

Number of references: 230

Original in: Croatian

Key words: common fig, chlorophyll a fluorescence, OJIP test, NPQ, antioxidative system, light stress

Date of the thesis defense: 16. 5. 2013.

Reviewers:

1. **Hrvoje Fulgosi**, PhD, Scientific Advisor, Ruđer Bošković Institute
2. **Hrvoje Lepeduš**, PhD, Associate Professor, Faculty of Humanities and Social Sciences, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
3. **Vera Cesar**, PhD, Associate Professor, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
4. **Martina Skendrović Babojelić**, PhD, Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Zagreb
5. **Irena Jug**, PhD, Associate Professor, Faculty of Agriculture, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
6. **Domagoj Šimić**, PhD, Scientific Advisor, Agricultural Institute Osijek

Thesis deposited in: City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Zahvala

Zahvaljujem mentorima prof. dr. sc. Hrvoju Lepedušu i prof. dr. sc. Veri Cesar na pomoći i savjetima te ukazanom povjerenju, strpljenju i vremenu koje su mi posvetili tijekom izrade ovog rada. Hvala na prenesenom znanju i iskustvu te velikoj podršci i razumijevanju.

Zahvaljujem članovima povjerenstva za ocjenu i obranu ovog doktorskog rada prof. dr. sc. Hrvoju Fulgosiju, doc. dr. sc. Martini Skendrović Babojelić i prof. dr. sc. Ireni Jug na čitanju rada i konstruktivnim savjetima.

Hvala curama iz Labosa na inspirativnim raspravama uz jutarnje kave, a posebno hvala Kseniji na pomoći tijekom eksperimentalnog rada.

Hvala mojim curama na strpljenju, podršci i brojnim savjetima za preživljavanje.

Najveće hvala mojoj obitelji, posebno mojim dečkima, Filipu i Mariu, kojima posvećujem ovaj rad.

Selma

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	4
2.1. KARAKTERISTIKE SMOKVE (<i>Ficus carica</i> L.).....	5
2.2. FOTOSINTEZA, OKSIDATIVNI STRES I ANTIOKSIDATIVNI ODGOVOR	8
2.2.1. Fotosinteza.....	8
2.2.2. Biofizika apsorpcije svjetlosti i razdioba energije.....	8
2.2.3. Struktura glavnih proteina fotosintetskog lanca transporta elektrona	10
2.2.3.1. Struktura fotosustava II	10
2.2.3.2. Struktura fotosustava I	11
2.2.3.3. Struktura cyt <i>b₆f</i> kompleksa	12
2.2.3.4. Struktura ATP sintaze	12
2.2.3.5. Mobilne komponente fotosintetskog lanca transporta elektrona	12
2.2.4. Apsorpcija svjetlosti i fotosintetski elektronski transport.....	13
2.2.5. Fluorescencija klorofila <i>a</i>	15
2.2.5.1. Polifazni rast fluorescencije klorofila <i>a</i>	15
2.2.5.2. Metoda saturacijskog pulsa i metoda analize gašenja fluorescencije klorofila <i>a</i>	16
2.2.6. Fotoinhibicija	19
2.2.6.1. Mehanizmi fotoinhibicije i oporavak	21
2.2.6.2. Međudjelovanje svjetlosti i niske temperature.....	22
2.2.6.3. Međudjelovanje svjetlosti i visoke temperature	23
2.2.7. Inhibitori fotosinteze	24
2.2.7.1. Ditiotreitol	25
2.2.7.2. Nigericin.....	26
2.2.8. Oksidativni stres i antioksidativni odgovor u biljkama.....	28
2.2.8.1. Antioksidativni enzimi.....	29
2.2.8.2. Peroksidacija lipida	31
2.2.8.3. Proteinski karbonili.....	32
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA.....	33
4. MATERIJAL I METODE	35
4.1. BILJNI MATERIJAL I OPIS EKSPERIMENTA	36
4.1.1. Biljni materijal	36
4.1.2. Određivanje dnevnih promjena fotosintetske učinkovitosti i antioksidativnog odgovora.....	37
4.1.3. Određivanje fotosintetske učinkovitosti i antioksidativnog odgovora u eksperimentalnim uvjetima.....	39
4.1.4. Određivanje fotosintetske učinkovitosti i antioksidativnog odgovora nakon tretmana inhibitorima nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila <i>a</i>	40
4.2. ISTRAŽIVANJE FOTOSINTETSKE UČINKOVITOSTI	42
4.2.1. Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila <i>a</i> i OJIP test.....	42
4.2.2. Mjerenje fluorescencije klorofila <i>a</i> metodom saturacijskog pulsa	44
4.2.3. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata	45

4.3. SDS-ELEKTROFOREZA TOPLJIVIH I MEMBRANSKIH PROTEINA.....	46
4.3.1. Ekstrakcija topljivih i membranskih proteina.....	46
4.3.2. SDS-elektroforeza u poliakrilamidnom gelu	46
4.3.3. Western blot i imunodetekcija	47
4.4. ODREĐIVANJE KOMPONENTI ANTIOKSIDATIVNOG ODGOVORA	48
4.4.1. Mjerenje koncentracije produkata lipidne peroksidacije	48
4.4.2. Mjerenje koncentracije proteinskih karbonila.....	48
4.4.3. Određivanje aktivnosti katalaze.....	49
4.4.4. Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze	50
4.4.5. Određivanje aktivnosti gvajakol peroksidaze.....	50
4.4.6. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze	50
4.4.7. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze	51
4.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	52
5. REZULTATI	53
5.1. DNEVNE PROMJENE FOTOSINTETSKE UČINKOVITOSTI I ANTIOKSIDATIVNOG ODGOVORA	54
5.1.1. OJIP porast fluorescencije klorofila <i>a</i>	54
5.1.2. Parametri OJIP porasta fluorescencije klorofila <i>a</i>	56
5.1.3. Učinkovitost PSII	58
5.1.4. Prijenos energije po aktivnom reakcijskom središtu.....	60
5.1.5. Indeks fotosintetske učinkovitosti	62
5.1.6. Fluorescencija klorofila <i>a</i> metodom saturacijskog pulsa.....	64
5.1.7. Koncentracija fotosintetskih pigmenata	66
5.1.8. Količina proteina D1 i Rubisco LSU	68
5.1.9. Lipidna peroksidacija i proteinski karbonili	69
5.1.10. Aktivnost antioksidativnih enzima.....	70
5.2. FOTOSINTETSKA UČINKOVITOST I ANTIOKSIDATIVNI ODGOVOR U EKSPERIMENTALNIM UVJETIMA	72
5.2.1. Maksimalni kvantni prinos fotosustava II (F_v/F_m) i indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}).....	72
5.2.2. Prijenos energije po aktivnom reakcijskom središtu.....	74
5.2.3. Koncentracija fotosintetskih pigmenata	76
5.2.4. Količina proteina D1 i Rubisco LSU	78
5.2.5. Lipidna peroksidacija i proteinski karbonili	80
5.2.6. Aktivnost antioksidativnih enzima.....	82
5.3. FOTOSINTETSKA UČINKOVITOST I ANTIOKSIDATIVNI ODGOVOR NAKON TRETMANA INHIBITORIMA NEFOTOKEMIJSKOG GAŠENJA FLUORESCENCIJE KLOROFILA <i>a</i>	85
5.3.1. Maksimalni kvantni prinos fotosustava II (F_v/F_m) i indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}).....	85
5.3.2. OJIP porast fluorescencije klorofila <i>a</i>	87
5.3.3. Parametri OJIP porasta fluorescencije klorofila <i>a</i>	89
5.3.4. Fluorescencija klorofila <i>a</i> metodom saturacijskog pulsa.....	91
5.3.5. Koncentracija fotosintetskih pigmenata	93
5.3.6. Količina proteina D1 i Rubisco LSU	95
5.3.7. Lipidna peroksidacija i proteinski karbonili	96
5.3.8. Aktivnost antioksidativnih enzima.....	98
6. RASPRAVA	100

6.1. DNEVNE PROMJENE FOTOSINTETSKE UČINKOVITOSTI I ANTIOKSIDATIVNOG ODGOVORA	101
6.2. FOTOSINTETSKA UČINKOVITOST I ANTIOKSIDATIVNI ODGOVOR U EKSPERIMENTALNIM UVJETIMA	117
6.3. FOTOSINTETSKA UČINKOVITOST I ANTIOKSIDATIVNI ODGOVOR NAKON TRETMANA INHIBITORIMA NEFOTOKEMIJSKOG GAŠENJA FLUORESCENCIJE KLOOROFILA <i>a</i>	129
7. ZAKLJUČAK	136
8. LITERATURA.....	141
9. SAŽETAK.....	161
10. SUMMARY.....	164
11. PRILOZI.....	167
12. ŽIVOTOPIS.....	177

POPIS KRATICA

ABS	engl. absorption - apsorpcija
ADP	adenozin difosfat
AL	engl. actinic light – svjetlost koja služi za pobuđivanje fotosintetskog uzorka
ANOVA	engl. analysis of variance – analiza varijance
APX	engl. ascorbate peroxidase – askorbat peroksidaza
ATP	adenozin trifosfat
BSA	engl. bovine serum albumine – albumin goveđeg seruma
Car	karotenoidi
CAT	engl. catalase - katalaza
CBB	engl. Coomasie brilliant blue – Coomasie briljant plavo
Chl a	klorofil a
Chl a/b	omjer klorofila a i b
Chl b	klorofil b
CS	engl. excited cross section - pobudna površina
CTE	ciklički transport elektrona
cyt b₆f	citokrom b ₆ f
DCMU	3-(3',4'-diklorfrnil)-1,1-dimetilurea
DI	engl. dissipation – rasipanje suvišne energije
DNP	2,4-dinitrofrnil hidrazin
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
ET	engl. electron transport – transport elektrona
F₀	minimalni intenzitet fluorescencije
Fd	feredoksin
F_m	maksimalni intenzitet fluorescencije
FNR	feredoksin-NADP+ reduktaza
FRET	engl. Förster resonance energy transfer – Försterov prijenos rezonantne energije
F_v	varijabilna fluorescencija
F_v/F_m	maksimalni prinos fluorescencije
GPOD	engl. guaiacol peroxidase – gvajakol peroksidaza
GR	engl. glutathione reductase – glutation reduktaza
GSSG	glutation disulfid
HL	engl. high light – visoki intenzitet svjetlosti
LHC	engl. light harvesting complex – kompleksi za prikupljanje svjetlosti
LL	engl. low light – niski intenzitet svjetlosti
LSD	engl. least significant difference - najmanja značajna razlika
LSU	engl. large subunit – velika podjedinica Rubisca
ML	engl. measuring light – svjetlost koja služi za detekciju fluorescencije
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NBT	engl. nitroblue tetrazolium – tetrazolium nitroplavo
NGC	nigericin
NPQ	nefotokemijsko gašanje fluorescencije klorofila a
OEC	engl. oxygen evolving center – kompleks koji katalizira oksidaciju vode
OJIP	porast fluorescencije od O do P faze
PAM	engl. pulse amplitude modulation – metoda saturacijskog pulsa
PC	plastocijanin

PEA	engl. <i>Plant Efficiency Analyzer</i> - analizator učinkovitosti fotosinteze
PI_{ABS}	engl. <i>performance indeks</i> – indeks fotosintetske učinkovitosti
Pi	anorganski fosfat
PPFD	engl. <i>photosynthetic photon flux density</i> - gustoća fluksa fotona
PQ	plastokinon
PSI	fotosustav I
PSII	fotosustav II
PUFA	engl. <i>polyunsaturated fatty acid</i> – polinezasićene masne kiseline
Q_A	vezani plastokinon
Q_B	slabo vezani (mobilni) plastokinon
qN	koeficijent nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila <i>a</i>
qP	koeficijent fotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila <i>a</i>
RC	engl. <i>reaction center</i> – reakcijsko središte
RNS	engl. <i>reactive nitrogen species</i> – reaktivne dušikove jedinke
ROS	engl. <i>reactive oxygen species</i> – reaktivne kisikove jedinke
Rubisco	Ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulphate</i> – natrij dodecil sulfat
SOD	engl. <i>superoxide dismutase</i> – superoksid dismutaza
SP	engl. <i>saturation pulse</i> - saturacijski puls
TBA	tiobarbituratna kiselina
TBARS	engl. <i>thiobarbitutic acid reactive substances</i> - supstanci koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom
TBS	engl. <i>Tris-buffered saline</i> – Tris NaCl pufer
TCA	trikloroetena kiselina
TR	engl. <i>trapping</i> - hvatanje ekscitona
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
VDE	violaksantin de -epoksidaza
VE	violaksantin ep oksidaza
ΔF/Fm'	efektivni prinos fluorescencije
ΔpH	trans-tilakoidni gradijent protona

1. UVOD

Obična smokva (*Ficus carica* L.) je mediteranska vrsta koja je dobro prilagođena različitim tipovima klime. To je listopadno stablo, osjetljivo na niske temperature, može se lako vegetativno razmnožavati, a najkvalitetniji prinos postiže u suhoj i toploj klimi. Smokva je kultivirana vrsta čiji se plodovi koriste u prehrani kao svježe ili sušeno voće izuzetne prehrambene vrijednosti. Plodovi su bogati vlaknima, kalcijem i vitaminima, a u posljednje vrijeme se svrstava u „zdravu hranu“ (Prgomet i Bohač 2003; Flaishman i sur. 2008). Za smokvu je karakteristična produljena produkcija mladih listova tijekom ljetnih mjeseci iako su direktno izloženi stresnim uvjetima u okolišu: visokoj količini osvjetljenja i povišenoj temperaturi.

Biljke su podložne promjenama u okolišu koje mogu uzrokovati oksidativni stres. Biljke se čak i u normalnim uvjetima moraju nositi sa suviškom svjetlosti. One mogu maksimalno iskoristiti svjetlost koju imaju na raspolaganju, a da pri tome potencijalna oštećenja, uzrokovana prevelikom količinom svjetlosti, svedu na minimum. Također, biljke su sposobne prilagoditi se na umjerene dnevne i sezonske promjene, no u slučaju kada na njih djeluje i neki dodatni stres kao što su visoka ili niska temperatura, dolazi do smanjenja praga tolerancije na stres te dolazi do fotoinhibicije (Murata i sur. 2007). Posljedica fotoinhibicije su smanjen kvantni prinos, smanjena fotokemijska aktivnost fotosustava II te smanjena maksimalna stopa fotosinteze (Takahashi i Murata 2008; Tyystjarvi 2008). Smatra se da je protein D1 primarno mjesto fotoinhibicije, a kapacitet njegove izmjene (engl. *turnover*) je ključni fiziološki uvjet važan u stvaranju tolerancije te u oporavku od fotoinhibicije (Keren i Krieger-Liszkay 2011; Tikkanen i Aro 2012). Direktna posljedica fotoinhibicije jest smanjenje količine pigmenata i peroksidacija lipida (Perl-Treves i Perl 2002).

Fotosinteza je jedan od najvažnijih metaboličkih procesa u biljkama. Određivanje fotosintetske učinkovitosti daje nam informaciju o vitalnosti biljke. Ključnu ulogu u svjetlosnim reakcijama fotosinteze imaju tri proteinska kompleksa: fotosustav II (PSII), citokrom *b₆f* kompleks i fotosustav I (PSI). Jednom kad apsorbirana svjetlosna energija stigne do reakcijskog središta fotosustava II (PSII), ona se iskorištava u tri usporedna procesa. Jedan dio apsorbirane energije iskoristi se u fotokemijskim procesima, dio se otpusti nefotokemijski u obliku topline, a dio se rasipa u obliku fluorescencije (Muller i sur. 2001; Foyer i Shigeoka 2011). Kada je količina svjetlosti optimalna, većina će se apsorbirane energije iskoristiti u fotokemijskim procesima, no kada je svjetlost u suvišku i premašuje fotokemijski kapacitet, veći će se dio otpustiti u obliku topline. U slučaju da nefotokemijski zaštitni mehanizmi nisu dostatni da uklone svu energiju u suvišku te da ne postoji učinkovita regulacija fotosintetskog

transporta elektrona, povećat će se vjerojatnost nastanka reaktivnih kisikovih jedinki (Perez-Torres i sur. 2006; Foyer i Shigeoka 2011).

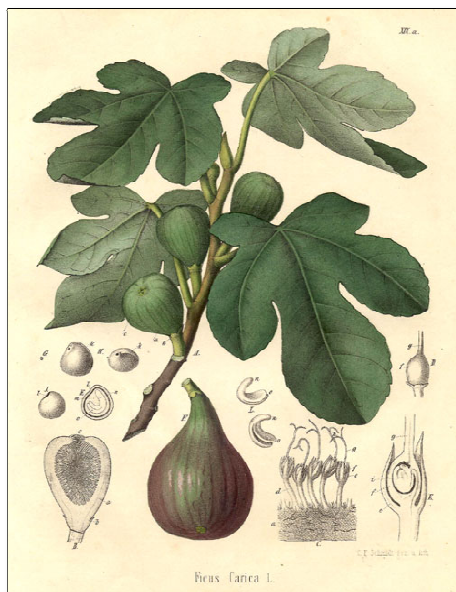
Metabolički putovi u biljaka su vrlo osjetljivi na promjene u okolišu pa ta metabolička neravnoteža može izazvati oksidativni stres u stanicama. Tada dolazi do pojačanog stvaranja i akumulacije reaktivnih kisikovih jedinki (engl. *reactive oxygen species* – ROS). Fotosintetski transport elektrona jedan je od glavnih izvora reaktivnih kisikovih jedinki u fotosintetski aktivnim biljnim tkivima te ima potencijal stvoriti singletni kisik $^1\text{O}_2$ i superoksidni radikal $\text{O}_2^{\bullet-}$, a posredno se stvaraju još i vodikov peroksid H_2O_2 te hidroksilni radikal OH^{\bullet} (Bhattacharjee 2005; Suzuki i sur. 2012). Kako bi smanjile ili spriječile oštećenja koja ROS uzrokuju, biljke su razvile funkcionalan antioksidativni sustav sastavljen od enzimatskih i neenzimatskih komponenata koje sudjeluju u direktnom uklanjanju ROS-a te tako sprječavaju njihovo nekontrolirano formiranje. Antioksidativni sustav, između ostalih, uključuje enzime superoksid dismutazu (SOD), katalazu (CAT) te enzime glutation-askorbatnog ciklusa dok neenzimatski antioksidansi uključuju primjerice α -tokoferol, askorbinsku kiselinu i karotenoide (Gill i Tuteja 2010; Foyer i Shigeoka 2011). S obzirom da količina reaktivnih kisikovih jedinki u stanici ovisi o ravnoteži između produkcije aktivnog kisika i kapaciteta za njegovo uklanjanje, ključan je učinkoviti odgovor antioksidativnih enzima. Superoksid dismutaza uklanja $\text{O}_2^{\bullet-}$ stvara O_2 i H_2O_2 . Dalje, katalaza ili askorbat peroksidaza uklanjaju H_2O_2 i prevode ga do vode i O_2 . Uklanjanje H_2O_2 ovisno o askorbatu, uz askorbat peroksidazu (APX) treba i glutation reduktazu (GR). Funkcionalna suradnja svih enzima je iznimno važna za učinkovito uklanjanje štetnih reaktivnih jedinki u stanici (Lu i sur. 2007; Khatoon i sur. 2009; Gill i Tuteja 2010).

Fotosintetski aparat mladih listova još nije u potpunosti funkcionalan te je zbog toga osjetljiviji na okolišne čimbenike stresa. Često su mladi listovi direktno izloženi svjetlosti visokog intenziteta i mehanizmi zaštite od svjetlosnog oštećenja su vrlo aktivni tijekom ranih faza razvoja lista (Jiang i sur. 2004; Jiang i sur. 2006b; Lepeduš i sur. 2011). Unatoč nižoj fotosintetskoj učinkovitosti u odnosu na razvijene listove, mladi listovi pokazuju najveću razinu fotoinhibicije tijekom dana te izrazito visoku sposobnost disipacije kao način zaštite od svjetlosnog stresa. Također, kapacitet za učinkovito iskorištenje svjetlosne energije nešto je niži nego kod odraslih listova što ih čini osjetljivijima na fotoinhibiciju (Cai i sur. 2005).

2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. KARAKTERISTIKE SMOKVE (*Ficus carica* L.)

Obična smokva (*Ficus carica* L.) (Slika 1) pripada porodici *Moraceae*. Rodu *Ficus* pripada oko 700 vrsta koje su uglavnom rasprostranjene u tropskom i suptropskom području, a samo nekoliko vrsta ima jestiv plod. Rasprostranjene su od Irana, Male Azije i Sirije pa sve do Mediteranskog područja. Razvijeno je na tisuće kultivara, uglavnom neimenovanih, a kao krajnji rezultat migracije čovjeka, smokva je proširena i izvan prirodnog areala (Flaishman i sur. 2008; Lansky i Paavilainen 2011).



Slika 1. Izgled listova, cvjetova i plodova smokve (*Ficus carica* L.) preuzeto s <http://ilpiaceredi.blogspot.com/2011/03/ficus-carica-fico>, 1.3.2011.

U našim krajevima smokva je listopadna, a u krajevima gdje srednja dnevna temperatura prelazi 12°C, smokva je vazdazelena vo čka. Ima velike, pojedinačne, zelene listove scolikog oblika. Plojka je rijetko cjelovita, najčešće je trodijelna ili peterodijelna te predstavlja jedan od ključnih čimbenika u determinaciji sorti. Razvoj listova započinje u rano proljeće, a produkcija mladih listova nastavlja se sve dok u jesen ne dođe do sniženja temperature. Pred kraj sezone, okolišni uvjeti, kao što su niske temperature, fotoperioda, vjetar i kiša mogu ubrzati opadanje listova. Za rod *Ficus* su specifične stanice koje izlučuju mliječni sok - lateks.

Smatra se da lateks ima ključnu ulogu u obrani od mehaničkih oštećenja te je jedan od najranijih lijekova (Flaishman i sur. 2008).

Klimatski uvjeti snažno utječu na rast smokve i razvoj plodova. Općenito, smokva će najbolje rasti i donijeti urod bolje kvalitete u mediteranskom području i toploj i suhoj klimi. U toplim područjima, stabla smokve mogu kontinuirano rasti i biti vazdazelena, dok u hladnijim područjima, s pojavom niskih temperatura stablo prestaje s rastom, listovi opadaju te ulaze u stadij mirovanja. Neki kultivari mogu tolerirati niske temperature, a koje, naročito na početku faze mirovanja, mogu uzrokovati smrzavanje, opadanje pupova pa čak i smrt čitave biljke. Ipak, stabla smokve su poprilično prilagodljiva na granične uvjete u okolišu (temperatura, svjetlost, vlaga), a mogu tolerirati i visoki postotak kalcija u tlu, pojačani salinitet i sušu. Što se tiče tla, smokve mogu rasti na različitim tipovima tala, uključujući teška glinena tla, ilovaču i pijesak, no idealno tlo za uzgoj smokve trebalo bi biti dobro drenirano, barem u površinskom metru. Mogu se razmnožavati pomoću sjemena, reznica, povaljenica, nagrtanjem i cijepljenjem (IPGRI i CIHEAM 2003; Flaishman i sur. 2008).

Kultivirana ili obična smokva ima važnu ulogu u ljudskoj prehrani kroz stoljeća. S obzirom na oplodnju i nastanak ploda, opisana su četiri glavna tipa smokve. Obična smokva je tip koji ne zahtijeva oprašivanje za stvaranje jestivog, komercijalnog ploda, odnosno, cvjetovi obične smokve imaju dugačke njuške te im za rast i sazrijevanje nije potrebno oprašivanje. Nakupina cvjetova naziva se sikonij koji sastavljen od velikog broja jednospolnih cvjetova te se iz njega razvijaju cenokarpiji sastavljeni od velikog broja oraščića zatvorenih u šupljem i sočnom ovoju cvata (Maegdefrau i Ehrendorfer 1984; Bačić 2003). Ovaj tip smokve daje prinos nekoliko puta godišnje. U slučaju da dođe do oprašivanja, plodovi izrazito povećaju masu, promijene boju te daju intenzivniji okus. Također, poznata su i dva tipa smokve koji su jestivi, ali je za razvoj potrebno oprašivanje. To su Smyrna tip i San Pedro tip. Ovi tipovi smokve imaju vrlo karakterističan način oprašivanja uz pomoć osa iz roda *Blastophaga*. Četvrti tip smokve služi uglavnom kao izvor peludi za Smyrna tip te sadrži uglavnom muške sikonije koji su, uz nekoliko iznimaka, nejestivi (Flaishman i sur. 2008).

S obzirom da je smokva vrsta koja se lako razmnožava reznicama, razvijeni su brojni kultivari. Oni često variraju u nekim značajkama kao što su morfologija lista, bujnost krošnje, vanjska i unutrašnja boja ploda, okus ploda i brojne druge. Većina kultivara, čak 78%, potječe od običnog tipa, oko 4% pripada San Pedro tipu, a 18% Smyrna tipu (IPGRI i CIHEAM 2003; Flaishman i sur. 2008).

Obična smokva je neobično stablo koje može proizvesti i do nekoliko prinosa godišnje. Glavni prinos je ipak od plodova koji se počinju razvijati u ljeto, a dozrijevaju u jesen. Na

kraju razvoja plodova, listovi opadaju i stablo ulazi u period dormancije. Okolišni čimbenici, kao što su temperatura, fotoperioda i vlaga utječu na razvoj i prinos plodova (Flaishman i sur. 2008). Uzgojem smokve u neprikladnim uvjetima može dovesti do gubitka ili pak oštećenja plodova. Plodovi smokve imaju izuzetnu prehrambenu vrijednost, bilo da se radi o svježim ili suhim plodovima (Prgomet i Bohač 2003). Oni su važan izvor minerala i vitamina te su bogati vlaknima, a ne sadrže masti, kolesterol i natrij. Također, visoka količina polifenola i antocijana u plodovima povezana je s njihovim antioksidativnim kapacitetom. U novije vrijeme smokva je svrstana u tzv. funkcionalnu hranu; smanjuje rizik nastanka karcinoma, dijabetesa i srčanih bolesti (Prgomet i Bohač 2003; Veberic i sur. 2008).

2.2. FOTOSINTEZA, OKSIDATIVNI STRES I ANTIOKSIDATIVNI ODGOVOR

2.2.1. Fotosinteza

Osnovni cilj istraživanja fotosintetskih procesa u novije vrijeme je bolje razumijevanje njihovog funkcioniranja u uvjetima *in vivo* te njihove regulacije od strane okolišnih i fizioloških čimbenika. Jedan od pristupa istraživanja fotosintetske učinkovitosti je mjerenje fluorescencije klorofila *a*. To je nedestruktivna metoda koja istražuje raspodjelu energije unutar fotosustava II, a pomoću koje se može egzaktno istražiti fiziološki status biljke.

Fotosintetski organizmi koriste svjetlosnu energiju za sintezu organskih molekula. Biljke, alge i cijanobakterije u atmosferu otpuštaju kisik kao nusprodukt fotosinteze. Fotosintetski procesi se sastoje od dvije odvojene grupe reakcija: svjetlosnih ili primarnih reakcija i sekundarnih reakcija. U primarnim reakcijama apsorbira se svjetlosna energija koja se koristi za stvaranje ATP-a i NADPH. Sekundarne reakcije se mogu odvijati i na svjetlosti i u tami, a iskorištavaju energiju pohranjenu u ATP-u i NADPH kako bi stvorile šećere iz CO₂. Energija koja ulazi u svjetlosne reakcije je linearno proporcionalna količini svjetlosti, ali je neovisna o temperaturi što je jedna od ključnih osobina fotosintetskih procesa. Nasuprot tome, u sekundarnim reakcijama utrošak energije ovisi o temperaturi, no ne ovisi o intenzitetu svjetlosti. Ako opskrba energijom premaši potrošnju, može doći do oštećenja tilakoidnih membrana. Osim u fotokemijskim reakcijama dio apsorbirane energije se gubi u obliku topline ili se emitira kao mjerljiva fluorescencija klorofila *a*. Prema tome, fluorescencija klorofila *a* nosi informaciju koja se može iskoristiti za kvantifikaciju razdiobe energije između fotokemijskih i nefotokemijskih procesa (Hooper 1998; Pevalek-Kozlina 2003).

2.2.2. Biofizika apsorpcije svjetlosti i razdioba energije

Svjetlost je elektromagnetsko zračenje. Zračenje valnih duljina između ~400 i 700 nm je fotosintetski aktivno, odnosno, tu energiju biljni pigmenti mogu apsorbirati i prevesti u kemijsku energiju fotosintezom. Čestica koja nosi kvantum energije naziva se foton. Energija fotona (ϵ) ovisi o frekvenciji elektromagnetskih valova (ν) koja je povezana s valnom duljinom (λ) u izrazu:

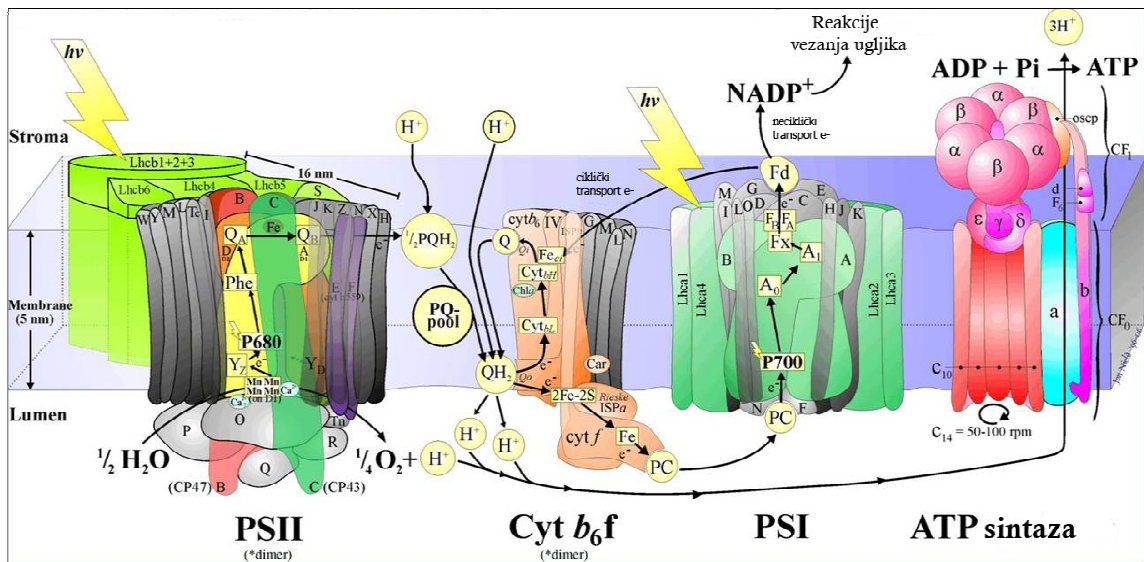
$$\epsilon = h\nu = hc/\lambda$$

gdje je **h** Plankova konstanta ($6,62 \times 10^{-23}$ Js), a **c** brzina svjetlosti u vakuumu (3×10^8 ms⁻¹).

Prema kvantnoj teoriji, atom će apsorbirati foton ako je energija fotona jednaka onoj energiji koja je potrebna da se elektron atoma prenese u više energetska stanje. Slično tome, emitirani foton će prenijeti energiju jednaku onoj koju atom gubi kada je elektron vraća u svoje osnovno stanje (Porcar-Castell 2008). Pigmenti su molekule koje apsorbiraju svjetlost u vidljivom dijelu spektra. Klorofil *a* maksimalno apsorbira svjetlost valnih duljina 430 i 662 nm, a klorofil *b* pri valnim duljinama od 453 i 642 nm što odgovara plavom, odnosno crvenom dijelu spektra. S druge strane, središnji dio spektra u rasponu od 520 do 570 nm, koji odgovara zelenoj svjetlosti, ne koristi za fotosintezu (Pevalek-Kozlina 2003). Kada molekula pigmenta apsorbira foton, jedan od elektrona prelazi u više energetska stanje ili orbitalu. Ako je elektron pobuđen u stanje više od prve orbitale (npr. S_2), energija se brzo i učinkovito gubi termalnim opuštanjem, unutrašnjom pretvorbom ili pak u obliku topline te se elektron vraća u prvo pobudno stanje (S_1) (Clegg 2004). Kada je elektron u tom prvom pobudnom stanju, pobudna energija elektrona (ekscitona) se može preraspodijeliti na molekularnoj razini. Eksciton se može prevesti u foton fluorescencije, otpustiti u obliku topline, prebaciti na susjednu molekulu pomoću Försterovog prijenosa rezonantne energije (FRET) ili djeluje tako da stvara klorofil u tripletnom stanju (Porcar-Castell 2008). Mogućnost stvaranja klorofila u tripletnom stanju se povećava ako se produžuje vrijeme pobuđivanja, odnosno, što je duže vrijeme između apsorpcije fotona i disipacije apsorpirane energije. Tripletno stanje klorofila ima važnu ulogu s obzirom na to da može dovesti do fotooksidativnog oštećenja tilakoidnih membrana zbog svoje mogućnosti stvaranja singletnog kisika (Krause i Jahns 2004). Zbog toga je vrlo bitno da je vrijeme trajanja ekscitona što kraće, odnosno skraćivanje tog vremena trajanja je jedna od glavnih uloga prilikom prilagodbe fotosustava II na stresne uvjete (Porcar-Castell 2008).

Fotosintetski pigmenti koji su odgovorni za apsorpciju svjetlosti, povezani su sa dva proteinska kompleksa: fotosustav II (PSII) i fotosustav I (PSI). Fotosinteza viših biljaka odvija se u kloroplastima, ovalnim organelima veličine od 5-10 μm , smještenim u stanicama mezofila lista (Pevalek-Kozlina 2003). Kloroplasti su omeđeni dvjema membranama između kojih se nalazi međumembranski prostor. Unutrašnjost kloroplasta je ispunjena tekućim matriksom koji se naziva stroma (Lodish i sur. 2003). Unutar strome smješten je kontinuirani sustav tilakoidnih membrana. Reakcije pretvorbe svjetlosne u kemijsku energiju, transport elektrona te stvaranje protonskog gradijenta odvijaju se na tilakoidnim membranama. Razlikujemo grana tilakoide i stroma tilakoide. Grana tilakoidi su posloženi paralelno, jedan iznad drugog, formirajući granume. Stroma tilakoidi protežu se kroz stromu i međusobno povezuju granume (Alberts i sur. 2002).

Glavni proteinski kompleksi fotosintetskog elektrona-transportnog lanca su fotosustav II, citokrom b_6f kompleks (cyt b_6f), fotosustav I i ATP sintaza (Slika 2). Većina reakcijskih središta (RC) PSII, sa svojim (LHCII) smješteni su u grana tilakoidima, dok su PSI sa svojim kompleksima za prikupljanje svjetlosti (LHCI), smješteni u stroma tilakoidima i na rubovima grana tilakoida koji graniče sa stromom. ATP sintaza je smještena u stroma tilakoidima, a cyt b_6f je smješten i na stroma i grana tilakoidima (Toth 2006; Fromme i Grotjohann 2008).



Slika 2. Shematski model fotosintetskog lanca transporta elektrona i strukturalne organizacije proteinskih kompleksa koji su uključeni u prijenos elektrona i protona preko tilakoidne membrane (<http://www.bio.ic.ac.uk/research/nield/downloads.html>, 17.9.2010.).

2.2.3. Struktura glavnih proteina fotosintetskog lanca transporta elektrona

2.2.3.1. Struktura fotosustava II

Fotosustav II građen je od antena kompleksa za prikupljanje svjetla (engl. *light-harvesting*) i reakcijskih središta. LHCII sadrže na stotine molekula pigmenta, uglavnom klorofila a , b i karotenoida. Antena sustavi su građeni od unutrašnje antene koja je smještena blizu reakcijskog središta te vanjskih, perifernih antena (Toth 2006). PSII je najčešće organiziran u obliku dimera, a svaki monomer PSII predstavlja jednu funkcionalnu jedinicu (Shen i sur. 2008). Unutrašnje antene PSII građene su od dvije podjedinice: CP43 (kodiran genom PsbC) i CP47 (kodiran genom PsbB), dok se vanjski dio LHCII sastoji od nekoliko podjedinica.

Veličina antena u PSII je heterogena; antene tzv. α -središta su 2-3 puta veće od antena β -središta. Unutrašnje antene funkcioniraju kao apsorpcijske jedinice te kao poveznica između vanjskih antena i reakcijskog središta. Vanjske antene LHCI su odgovorne za apsorpciju više od polovice fotona u PSII. One su najčešće građene kao trimeri, a svaki monomer sadrži klorofil *a* i *b* te četiri vezujuće strane od kojih jedna (L2) može vezati karotenoide ksantofilskog ciklusa. L2 vezujuća strana je posebno važna jer je povezana s regulatornom komponentom toplinskog rasipanja energije u tilakoidnim membranama, što je jedan od ključnih procesa prilagodbe PSII, a također i procesa prilagodbe PSI. Sam proces rasipanja suviška pobudne energije u obliku topline je najvjerojatnije sastavljen od nekoliko procesa koji se odvijaju u različitom vremenu, međusobno djeluju tijekom procesa prilagodbe te uključuju biokemijske i strukturalne promjene (Porcar-Castell 2008).

Središte PSII čini reakcijsko središte koje je građeno od 17 transmembranskih proteinskih podjedinica i 3 vanjska proteina. Transmembranske podjedinice su D1 (kodiran genom *psbA*) i D2 (kodiran genom *psbD*) čija je molekularna masa 38,2 kDa, odnosno 39,4 kDa. Također, tu su i podjedinice koje vežu klorofil, CP47 (kodiran genom *psbB*) i CP43 (kodiran genom *psbC*) molekularne mase od 56,4 kDa, odnosno 51,6 kDa. Dodatnih 13 podjedinica se odnosi na podjedinice molekularne mase manje od 10 kDa i to su: PsbE, PsbF, PsbH, PsbI, PsbJ, PsbL, PsbM, PsbTc, PsbX, PsbY, PsbZ i Ycf12. Tri vanjska proteina veličine 33 kDa, 23 kDa i 17 kDa, vezana su za luminalnu stranu. Ta tri proteina u kombinaciji s vanjskim regijama D1, D2, CP47 i CP43 proteina te manganski klaster (Mn_4Ca) sa Ca^{2+} i Cl^- ionima koji su uglavnom vezani za D1 protein, grade kompleks koji katalizira oksidaciju vode (engl. *oxygen-evolving complex* - OEC) (He i Malkin 1998; Shen i sur. 2008).

U središtu D1 i D2 podjedinica smještene su četiri molekule klorofila i dvije molekule feofitina (Pheo). Dvije su molekule klorofila smještene između D1 i D2 proteina, a druge dvije, tzv. dodatne molekule su simetrično vezane na D1 i D2 proteine. Jedna je molekula feofitina vezana za D1 protein, a druga za D2 protein. Molekula primarnog akceptora elektrona, plastokinon (Q_A) smješten je na D2 protein, a sekundarni akceptor, Q_B na D1 protein (Toth 2006).

2.2.3.2. Struktura fotosustava I

Fotosustav I građen je od antena kompleksa za prikupljanje svjetla (engl. *light-harvesting*) i reakcijskih središta te djeluje kao plastocijanin-feredoksin oksidoreduktaza (Amuntus i sur. 2008). To je integralni membranski proteinski kompleks koji prenosi elektrone sa plastocijanina (PC) na feredoksin (Fd) (He i Malkin 1998). Antene PSI, građene su od četiri različita LHCI proteina: Lhca1, Lhca2, Lhca3 i Lhca4 proteina koji se spajaju u dimere

(Lhca1/Lhca4 i Lhca2/Lhca3) te tako stvaraju pojas oko reakcijskog središta. Reakcijsko središte PSI je heterodimer građen od 12 proteina (PsaA, PsaB, PsaC, PsaD, PsaE, PsaF, PsaG, PsaH, PsaI, PsaJ, PsaK i PsaL) i otprilike 100 molekula klorofila (Amuntus i sur. 2008). Primarni donor elektrona, P700, je smješten između PsaA i PsaB podjedinica, a građen je od dvije molekule klorofila *a* (He i Malkin 1998; Toth 2006).

2.2.3.3. Struktura *cyt b₆f* kompleksa

Citokrom *b₆f* je integralni membranski proteinski kompleks veličine 217 kDa te predstavlja elektronsku vezu između PSII i PSI (Cramer i sur. 2008). Građen je od tri male i četiri velike podjedinice: *cyt b₆*, *cyt f*, željezo-sumpornog proteina (Riske-ovo FeS središte) i podjedinice IV. *Cyt b₆* komponenta se sastoji od dvije hem-*b* molekule (Whitmarsh 1998; Toth 2006).

2.2.3.4. Struktura ATP sintaze

ATP sintaza je membranski proteinski kompleks, građen od dvije velike podjedinice: CF₀ i CF₁. CF₀ podjedinica je hidrofobna te je sastavljena od četiri manje podjedinice (I, II, III i IV), dok je CF₁ hidrofilna, smještena je iznad CF₀ podjedinice na stromalnoj strani membrane te je sastavljena od 5 manjih podjedinica ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$). CF₀ podjedinica je ugrađena u membranu te ima držak na koji je prihvaćena CF₁ podjedinica. Također, CF₀ podjedinica ima funkciju protonskog kanala, a protok protona regulira CF₁ podjedinica. Transmembranski elektrokemijski protonski gradijent pokreće ATP sintazu koja stvara ATP iz ADP i Pi, što je čini ključnim enzimom u energetskom metabolizmu stanice (Whitmarsh 1998; Bottcher i Graber 2008).

2.2.3.5. Mobilne komponente fotosintetskog lanca transporta elektrona

Mobilne komponente lanca transporta elektrona povezuju PSII, kompleks *cyt b₆f*, PSI i Fd-NADP⁺-oksidoreduktazu (FNR). To su plastokinon (PQ), plastocijan (PC) i feredoksin (Fd). Osim što služi kao mobilni prijenosnik elektrona sa PSII na *cyt b₆f* kompleks, PQ ima sposobnost vezanja protona na stromalnoj strani tilakoidne membrane i njihovog transtilakoidnog transporta u lumen tilakoide. Prisutan je u membrani u omjeru od 6-8 molekula po reakcijskom središtu PSII te se često govori o skupini PQ molekula. Plastocijan je mali protein (~10 kDa) koji u središtu sadrži bakar te prenosi elektrone od *cyt b₆f* do PSI. Najčešće ima do 5 molekula PC po reakcijskom središtu PSI (Toth 2006). Feredoksin (Fd) je mali protein (~11 kDa) koji sadrži željezo i sumpor (2Fe2S), a smješten je na akceptorskoj strani PSI (Whitmarsh 1998; Toth 2006).

2.2.4. Apsorpcija svjetlosti i fotosintetski elektronski transport

Fotosinteza se odvija u vidljivom dijelu spektra (400-700 nm). Prvi korak pretvorbe svjetlosne energije u kemijsku je apsorpcija fotona pomoću antena sustava. Apsorpcija svjetla se događa u ~ 1 fs (10^{-15} s) i uzrokuje promjenu iz osnovnog elektronskog stanja (S_0) u pobuđeno stanje (S_1, S_2, S_3, \dots). Molekule prelaze u S_1 pobuđeno stanje iz viših razina te pri tome gube određenu količinu energije. Svako pobuđeno stanje ima nekoliko vibracijskih podstanja. Dio pobuđujuće energije se prijelazom na niži nivo gubi u obliku topline ili svjetlosti koja se naziva fluorescencija. Fluorescencija se emitira pri većim valnim duljinama nego što je apsorbirana svjetlost. Pobuđujuća energija molekule klorofila će se vrlo vjerojatno prenijeti na susjednu molekulu klorofila. Antena sustavi će prenijeti energiju do reakcijskih središta PSII i PSI, gdje će pobuđujuća energija izazvati razdvajanje naboja. Razdvajanje naboja je reverzibilno te se ta pobuđujuća energija može vratiti do antena sustava i otpustiti se u obliku topline ili fluorescencije (Clegg 2004; Toth 2006).

Nakon što svjetlost pobudi reakcijsko središte PSII, započinje razdioba naboja na molekuli klorofila vezanoj za D1 protein (Krieger-Liszkay i sur. 2008). Prilikom razdvajanja naboja, elektron se prenosi od primarnog donora elektrona (P680) do Pheo te tako postaje reduciran, $P680^+$. Konačni izvor elektrona je voda. OEC ima pet mogućih oksidacijskih stanja (S_0, S_1, S_2, S_3 i S_4). Prijelaz iz S_0 do S_4 stanja, pri čemu dolazi do gubitka četiri elektrona, pokreću fotokemijske reakcije. Prilikom cijepanja vode u S_4 stanju, OEC se spontano vraća u osnovno S_0 stanje uz otpuštanje molekule kisika. Tijekom čitavog ciklusa OEC, u lumen se otpuštaju četiri protona. Ove reakcije oksidacije vode odvijaju se u 50-1500 μ s (Toth 2006).

Nakon cijepanja naboja, elektroni se prenose preko niza redoks reakcija sve do PSI gdje mogu služiti kao izvor elektrona za sekundarno razdvajanje naboja. Sljedeći korak je redukcija primarnog akceptora Q_A , a nakon toga dolazi do redukcije sekundarnog akceptora, Q_B . Q_B može primiti dva elektrona i dva protona. Nakon dvostruke redukcije i protonacije, Q_B se otpušta s vezujuće strane i difundira u tilakoidnu membranu stvarajući skup molekula plastokinona (Krieger-Liszkay i sur. 2008). Taj niz redoks reakcija naziva se Q-ciklus. On povezuje oksidaciju plastokinola na jednoj strani cyt b_6f kompleksa s redukcijom plastokinona na drugoj strani istog kompleksa te tako doprinosi nastajanju elektrokemijskog protonskog potencijala (Kramer i sur. 2004; Cardona i sur. 2012). U PSII, za prijenos elektrona s Pheo na Q_A potrebno je ~ 200 ps. Q_B može primiti dva elektrona s Q_A , pri čemu je prijenos prvog elektrona brži i traje 100-200 μ s, a drugog elektrona 400-600 μ s. Negativni naboj nastao primitkom dva elektrona, Q_B^{2-} kompenzira se tako što preuzima dva protona iz strome (Cardona i sur. 2012). Ako primarni akceptor ostane reduciran zbog blokiranog protoka

elektrona prema naprijed, a zbog reduciranog ukupnog plastokinona (zatvorena reakcijska središta), prinos razdiobe naboja je smanjen zbog prisutnosti Q_A^- . Ako do razdiobe ipak dođe u slučaju kada su reakcijska središta zatvorena, dolazi do rekombinacije naboja (Krieger-Liszkay i sur. 2008). Molekula koja nastaje, PQH_2 (Q_BH_2) difundira do cyt b_6f kompleksa gdje se elektron predaje FeS proteinu (Rieske-ov protein) na akceptorskoj strani kompleksa te dalje do cyt f . Reoksidacijom PQ dva protona se otpuštaju u lumen. Ti protoni doprinose nastanku protonskog gradijenta preko membrane (Osyczka i sur. 2005). Smatra se da je najsporiji korak u lancu transporta elektrona reoksidacija PQH_2 . Taj korak uključuje difuziju PQH_2 , oksidaciju istog pomoću FeS i na kraju otpuštanje dva protona u lumen tilakoida. Molekula PQ na stromalnoj strani je dvostruko reducirana. Takva molekula, PQ^{2-} može preuzeti dva nova protona na stromalnoj strani i difundirati u lumenalnu stranu cyt b_6f kompleksa (Osyczka i sur. 2005; Toth 2006). Na taj način Q-ciklus povećava broj otpuštenih protona po prenesenom elektronu.

Prijenos elektrona s cyt f na PC odvija se unutar 50-100 μ s te PC dalje prenosi elektron na $P700^+$ u 20-200 μ s. Tada se elektron prenosi na A_0 pa na A_1 (na PSI) (40-200 ps), nekoliko FeS-klastera (15-500 ns), Fd (0,5-20 μ s), FNR te na kraju do $NADP^+$ (Toth 2006). (Slika 2).

PSI može funkcionirati neovisno od PSII. U slučaju PSI cikličkog transporta elektrona, elektron se prenosi s Fd ili NADPH na NAD(P)H dehidrogenazu (NDH) i feredoksin-kinon oksidoreduktazu (FQR) koje su najvjerojatnije vezane na cyt b_6f kompleks. Ti enzimi mogu reducirati PQ odakle se elektron vraća natrag do $P700$. Ciklički prijenos elektrona posreduje i u prijenosu protona iz strome u lumen.

Pretvorena svjetlosna energija pohranjuje se u obliku NADPH i ATP koji služe kao izvor energije u reakcijama asimilacije CO_2 . ATP sintaza koristi trans-tilakoidni gradijent protona te stvara ATP iz anorganskog fosfata i ADP. Ovaj proces obuhvaća protonski gradijent (ΔpH) i električno polje ($\Delta \psi$) preko tilakoidne membrane koji nastaje zbog oksidacije vode, redukcije i oksidacije molekula plastokinona i razdvajana naboja u RC (Berg i sur. 2002; Toth 2006; Porcar-Castell 2008). Također, rekombinacijom naboja će u reakcijskom središtu doći do nastanka singletnog kisika ili će $P680$ doći u tripletno stanje koji je uglavnom lokaliziran na jednom od pomoćnih molekula klorofila D1 proteina (Krieger-Liszkay i sur. 2008).

2.2.5. Fluorescencija klorofila a

Fotosinteza je jedan od najvažnijih metaboličkih procesa u biljkama. Mjerenje fotosintetske aktivnosti daje nam informaciju o vitalnosti biljke. Prilikom proučavanja fotosinteze, fluorescencija klorofila a je jedna od najraširenijih metoda (Oquist i Chow 1992; Govindjee 2004; Papageorgiou 2004). To je nedestruktivna i osjetljiva metoda iako fluorescencija klorofila a predstavlja samo 2-10% apsorbirane energije. Može se primijeniti na bilo kakav fotosintetski uzorak bez potrebe za standardizacijom ili kompliciranim pripremama. Na fluorescencijski signal može utjecati mnogo različitih čimbenika. Prema tome, on može dati veliki broj informacija, ali istovremeno i otežati njihovu interpretaciju.

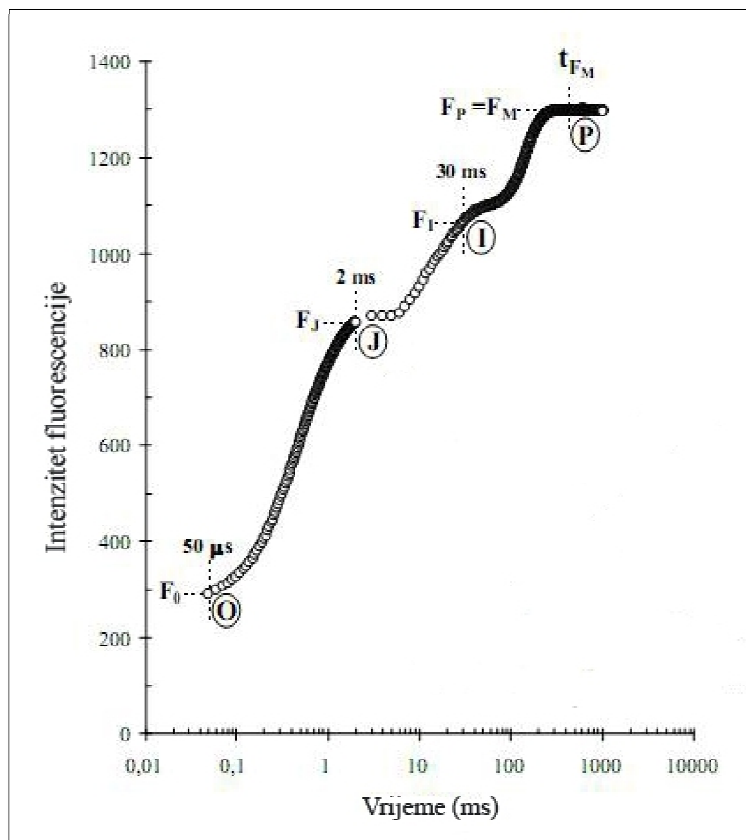
2.2.5.1. Polifazni rast fluorescencije klorofila a

Polifazni rast fluorescencije klorofila a događa se pri kontinuiranom osvjetljenju (crvena svjetlost, maksimum apsorpcije na ~650 nm). Mjerenja koja traju oko 1 sekunde vrše se na listovima koji su prilagođeni uvjetima tame.

Otvorena reakcijska središta (RC) PSII kod kojih su Q_A oksidirani samo oko 2% apsorbirane svjetlosti emitiraju u obliku fluorescencije. Obratno, reakcijska središta kod kojih su Q_A reducirani (zatvorena RC) emitiraju između 8 i 10% energije u obliku fluorescencije. Nužno je fotosintetski materijal prije mjerenja smjestiti u tamu, u trajanju od oko 30 minuta kako bi se reakcijska središta otvorila. Tijekom kontinuiranog osvjetljavanja, fluorescencija raste od minimalne vrijednosti F_0 ili O (engl. *open state*) do najviše vrijednosti F_P ili P (Slika 3) pri čemu dolazi do zatvaranja reakcijskih središta zbog odvajanja naboja na PSII. Slabo će svjetlo ($40-50 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, plavo ili zeleno svjetlo) izazvati stvaranje platoa na krivuljama polifaznog rasta fluorescencije, a to je povezano s reakcijskim središtima PSII koji nisu sposobni reducirati Q_B .

Karakteristične promjene u intenzitetu fluorescencije klorofila a poznate su pod nazivom Kautskyjev efekt. Krivulja tih promjena pokazuje brzi porast intenziteta fluorescencije tijekom 1s nakon čega slijedi postupni pad prema stabilnom stanju (Strasser i sur. 2000; Strauss i sur. 2006). Osnovna pretpostavka jest da rastuća faza krivulje prikazuje primarne reakcije fotosinteze (Krause i Weis 1991). Kod listova koji su prilagođeni na uvjete tame u trajanju od 30-60 minuta, u uvjetima saturirajuće svjetlosti ($>300 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), može se postići maksimalna fluorescencija F_P i u tom je slučaju ona jednaka F_m . Standardni intenzitet svjetlosti je oko $3000 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ te je na krivulji polifaznog rasta moguće razlikovati dva međukoraka: na ~2 ms (korak J), a na ~30 ms (korak I). S obzirom na ove oznake, krivulja polifaznog rasta fluorescencije klorofila a još se naziva OJIP krivuljom. Kod uzoraka

gdje je donorska strana PSII oštećena (često pri visokoj temperaturi), dolazi do pojave dodatnog K koraka koji se javlja na $\sim 0,3$ ms (Lazar 1999). OJIP krivulja se prikazuje na logaritamskoj vremenskoj skali kako bi se svi koraci mogli uočiti na jednom grafu. Prva pouzdana izmjerena točka OJIP krivulje dobije se mjerenjem na 50 μ s (Strasser i sur. 2000).



Slika 3. Tipični OJIP porast fluorescencije klorofila *a in vivo* prikazan na logaritamskoj vremenskoj skali prema Strasser i suradnicima (2004).

2.2.5.2. Metoda saturacijskog pulsa i metoda analize gašenja fluorescencije klorofila *a*

Kod ove metode, svjetlost koja služi za pobuđivanje fotosintetskog uzorka (engl. *actinic light*) razlikuje se od one koja se koristi za detekciju fluorescencije (engl. *measuring beam*). Sama metoda saturacijskog pulsa danas je našla široku primjenu, naročito u ekofiziološkim istraživanjima te je vrlo korisna u kvantifikaciji oštećenja fotosintetskih organizama izazvanih stresom (Krause i Weis 1991; Schreiber i sur. 1994; Rohacek 2002; Schreiber 2004).

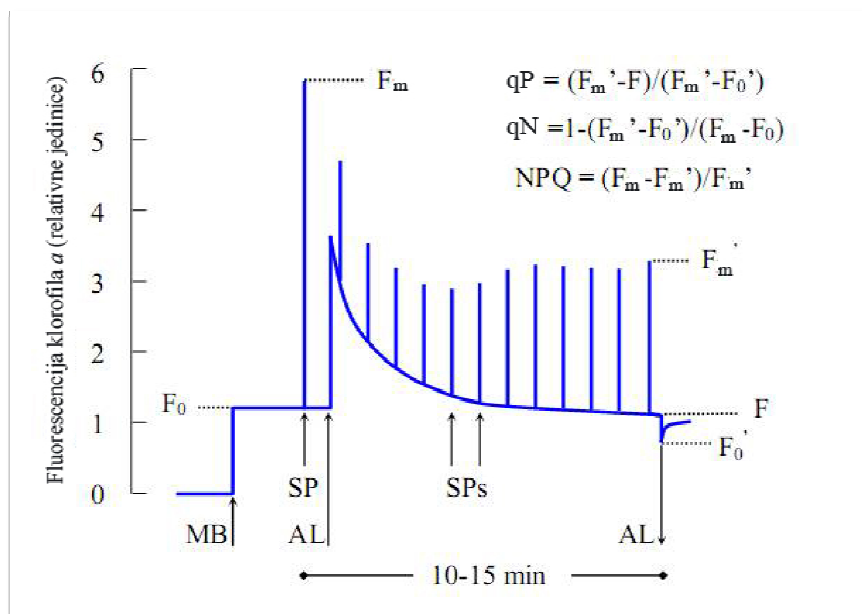
Fluorescencija se detektira pomoću vrlo kratkih pulseva saturacijskog svjetla u trajanju od 800 ms. Prilagodбом listova na uvjete tame, otvaraju se sva reakcijska središta. Za zatvaranje reakcijskih središta PSII koriste se snažni pulsevi saturacijske svjetlosti slične dužine (~200-800 ms). Nakon saturacijskog pulsa, dolazi do porasta fluorescencije od početnog stanja, F_0 do maksimalne vrijednosti, F_m . U tim uvjetima, primarni akceptor elektrona, Q_A , je u potpunosti reduciran (Schreiber i sur. 1994; Maxwell i Johnson 2000). U tom trenutku moguće je odrediti maksimalni kvantni prinos PSII, (F_v/F_m) čija vrijednost u zdravim, potpuno razvijenim listovima iznosi oko 0,83 (Bjorkman i Demming 1987). Porastom fotokemijskih procesa te procesa rasipanja suviška pobudne energije, prinos fluorescencije se smanjuje i dolazi u ustaljeno stanje F . Nakon drugog saturacijskog pulsa, maksimalna fluorescencija osvijetljenog uzorka, F_m' se smanjuje te je niža od one koja je izmjerena uzorcima prilagođenim tami. U tim uvjetima Q_A je ponovo u potpunosti reduciran, a razlika između F_m' i F prikazuje fotokemijski dio gašenja fluorescencije, a razlika između F_m i F_m' pokazuje gašenje fluorescencije koja nastaje zbog rasipanja energiju u obliku topline (Toth 2006). Fotokemijsko gašenje je odraz redoks stanja primarnog akceptora PSII, dok je nefotokemijsko gašenje odraz rasipanja energije u obliku topline. Kvantni prinos prijenosa elektrona je mjera ukupne učinkovitosti reakcijskih središta PSII izloženih svjetlosti dok izraz F_v'/F_m' daje mjeru učinkovitosti otvorenih reakcijskih središta izloženih svjetlosti (Schreiber i sur. 1994; Rohacek 2002). Tipične vrijednosti fluorescencije mjerene metodom saturacijskog pulsa i parametri prikazani su na Slici 4.

Ova metoda razvijena je kako bi se zasebno mogli kvantificirati fotokemijski i nefotokemijski procesi gašenja (engl. *quenching*) prinosa fluorescencije u uvjetima kada je uzorak prilagođen na uvjete svjetlosti. Prema tom konceptu, fotokemijsko gašenje je povezano s redoks stanjem Q_A (tijekom prilagodbe na svjetlost, određeni dio reakcijskih središta može se ponovo otvoriti), dok nefotokemijsko gašenje predstavlja reakcije koje nisu povezane s protokom elektrona (Toth 2006). Drugi pristup kojim je moguće razdvojiti fotokemijske i nefotokemijske procese je dodatak herbicida 3-(3',4'-diklorofenil)-1,1-dimetiluree (DCMU) ili Diurona koji izbacuje Q_B s njegovog vezujućeg mjesta na D1 proteinu, ne potiče redoks reakcije te sprječava ponovnu oksidaciju Q_A^- . Odnosno, dodatkom Diurona, qP je gotovo jednak nuli (Ke 2001).

Točan mehanizam kojim je regulirano termalno rasipanje još uvijek je tema mnogih rasprava te postoji nekoliko predloženih mehanizama (Jiang i sur. 2004; Krause i Jahns 2004; Kalituho i sur. 2007; Porcar-Castell 2008; Takahashi i sur. 2009; Ruban i sur. 2012). Jedan od mehanizama bi mogao biti direktni prijenos pobudne energije s klorofila *a* na pigmente ksantofilskog ciklusa što dovodi do rasipanja pobudne energije u obliku topline (Jiang i sur.

2004). Ovaj mehanizam čini se vrlo vjerojatnim s obzirom na orijentaciju i udaljenost molekula klorofila od L2 mjesta na LHCII (Porcar-Castell 2008). Drugi mehanizam uključuje mogućnost konformacijskih promjena koje izazivaju pigmenti ksantofilskog ciklusa koji tada potpomažu rasipanje energije u obliku topline. *Psbs* proteini u vanjskim antenama također su povezani s rasipanjem energije (Ruban i sur. 2012).

Trenutno prevladava mišljenje da je mehanizam kojim se određeni dio pobudne energije rasipa u obliku topline najvjerojatnije sastavljen od nekoliko procesa koji se ne odvijaju u isto vrijeme, no međusobno djeluju tijekom procesa prilagodbe te uključuju biokemijske i strukturalne promjene. Termalno rasipanje svjetlosne energije ima važnu zaštitnu funkciju tijekom procesa fotosinteze, a doprinose mu tri osnovna procesa: prijelazno stanje (engl. *state transitions*), mehanizmi ovisni o pH te fotoinhibicija. O njima ovise tri komponente nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila (NPQ), a to su: qE, qT i qI (Krause i Jahns 2004; Kalituho i sur. 2007). Mehanizam qE je dominantna komponenta NPQ te se javlja u uvjetima kada je svjetlost u suvišku koja utječe na povišenje trans-tilakoidnog protonskog gradijenta (ΔpH). U takvim uvjetima se suvišna energija prenosi na zeaksantin koji je otpušta u obliku topline (Ruban i sur. 2012). Mehanizam qT ovisi o prijenosu energije između dva fotosustava. Ova je komponenta važna kada je intenzitet svjetlosti relativno nizak te ne dolazi do blokade elektronskog transporta. U uvjetima visokog intenziteta svjetlosti, udio qT u ukupnom NPQ je značajno smanjen (Kalituho i sur. 2007; Takahashi i sur. 2009). qI je povezan s fotoinhibicijom fotosinteze te se pojavljuje uslijed produženog izlaganja listovima vrlo visokom intenzitetu svjetlosti. Do nastanka qI dolazi zbog inaktivacije D1 proteina te je u takvim uvjetima ova komponenta dominantna. U uvjetima visokog intenziteta svjetlosti, qE komponenta najviše doprinosi ukupnom NPQ te gasi do 80% pobuđenog klorofila u biljkama (Krause i Jahns 2004).



Slika 4. Nefotokemijsko gašenje fluorescencije klorofila a analizirano metodom saturacijskog pulsa prema Schreiber (2004). Prikazane su tipične vrijednosti fluorescencije i parametri: F_0 – prinos fluorescencije uzorka prilagođenog na uvjete tame, F_m - maksimalni prinos fluorescencije uzorka prilagođenog na uvjete tame dobiven tijekom saturacijskog pulsa, F_m' – maksimalni prinos fluorescencije u uzorku prilagođenom na svjetlost, F_0' – minimalni prinos fluorescencije izmjeren nakon gašenja svjetlosti koja pobuđuje uzorak, qP – koeficijent fotokemijskog gašenja fluorescencije, qN – koeficijent nefotokemijskog gašenja fluorescencije, NPQ – nefotokemijsko gašenje fluorescencije, MB – zraka koja služi za mjerenje (engl. *measuring beam*), AL – pobudna svjetlost (engl. *actinic light*), SP – saturacijski puls.

2.2.6. Fotoinhibicija

Fotoinhibicija je definirana kao inhibicija fotosinteze uzrokovana prekomjernom količinom svjetlosti; može uzrokovati oštećenje fotosintetskog aparata te uzrokovati oštećenje fotosintetskih pigmenta. Dodatni stresni čimbenici tijekom izlaganja biljaka visokoj količini svjetlosti povećavaju fotoinhibitorne učinke te se inhibicija fotosinteze može smatrati indikatorom stresnih uvjeta. Ona može biti reverzibilna te na taj način ima ulogu u zaštiti fotosintetskog sustava. Također, može biti pokazatelj oštećenja koja su se već dogodila na fotosintetskom aparatu, a koja su ireverzibilna. Pigmenti i enzimi koji se pojavljuju u biljkama u normalnim uvjetima, mogu spriječiti fotoinhibiciju, a izlaganjem neidealnim uvjetima, biljka

može pojačati toleranciju na određeni stresni čimbenik. Mnogi od tih morfoloških, metaboličkih i biokemijskih mehanizama obrane su na neki način povezani s rasipanjem prekomjerne količine energije u obliku topline (Hideg i sur. 2000; Alves i sur. 2002).

Biljke mogu maksimalno iskoristiti svjetlost koja im je na raspolaganju, a da pri tome potencijalna oštećenja, uzrokovana prevelikom količinom svjetlosti, svedu na minimum. Biljke su tijekom dana suočene s promjenama u kvaliteti i kvantiteti svjetlosti te se u skladu s tim mogu prilagoditi ako te promjene nisu prevelike. U slučaju da one ipak premašuju kapacitet biljke za prilagodbu i kada su vanjski stimulansi preintenzivni, dolazi do fotoinhibicije (Murata i sur. 2007). Biljke imaju različite odgovore na suvišak svjetlosti, no bilo da se radi o oštećenju ili ne, oni se javljaju ovisno o vremenskom razdoblju (Alves i sur. 2002). U slučaju svjetlosti niskog intenziteta (manje od $100 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), više od 80% apsorbirane količine može se iskoristiti u fotosintetskim procesima (Bjorkman i Demming 1987). Ako intenzitet svjetlosti premašuje $1000 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, samo se 10-25% apsorbirane svjetlosti može iskoristiti (Alves i sur. 2002).

Posljedice fotoinhibicije su smanjen kvantni prinos, smanjena fotokemijska aktivnost fotosustava II te smanjena maksimalna stopa fotosinteze (Xu i Shen 1996; Takahashi i Murata 2008; Tyystjarvi 2008). Produženo izlaganje biljaka prekomjernom osvjetljenju može rezultirati oštećenjem fotosintetskih pigmenata s obzirom na to da smanjenje količine tih pigmenata ovisi o svjetlosti i količini kisika te se naziva fotooksidacija. Ona je sekundarni fenomen, koji se pojavljuje nakon smanjenja fotosintetske aktivnosti koja ovisi o intenzitetu i dužini izloženosti svjetlosti, a da se pri tome ne mijenja količina pigmenata. Fotoinhibicija fotosinteze ne javlja se nakon smanjenja količine fotosintetskih pigmenata, već upravo suprotno, degradacija pigmenata se javlja tek nakon što je već došlo do fotoinhibicije (Alves i sur. 2002).

Biljke koje su prilagođene na uvjete pojačanog osvjetljenja mogu se vrlo lako prilagoditi sjenovitim uvjetima te imaju pojačan kapacitet iskorištenja tog svjetla za fotosintetske reakcije, ali i rasipanje suviška pobudne energije koje ovisi o ksantofilskom ciklusu (Demmig i sur. 1987). Biljke prilagođene sjeni teško mogu podnijeti pojačano osvjetljenje i u slučaju da se takve biljke nađu u uvjetima pojačanog osvjetljenja, one će u nekom trenutku pojačati fotosintetski kapacitet i prilagoditi se, ali će prije toga pokazivati znakove fotoinhibicije: smanjenje fotosintetske aktivnosti i kvantnog prinosa (Lichtenthaler i Burkart 1999). Biljke koje su prilagođene uvjetima niskog intenziteta svjetlosti i nakon toga izložene visokom intenzitetu svjetlosti pokazuju intenzivniju fotoinhibiciju u odnosu na biljke koje su prilagođene visokom intenzitetu svjetlosti. Potpuno razvijeni listovi koji su pretrpjeli

fotoinhibiciju, mogu pokazivati znakove smanjenja koncentracije fotosintetskih pigmenata. Mladi listovi, koji su se razvili nakon izlaganja visokom intenzitetu svjetlosti pokazuju veću toleranciju prema fotoinhibiciji. Ta razlika pretpostavlja da fotosintetski kapacitet utječe na podložnost fotoinhibiciji (Alves i sur. 2002). Ako je biljka rasla u uvjetima sjene, omjer pigmenata u antenama i pigmenata u reakcijskim središtima će porasti jer antena kompleksi moraju moći učinkovito apsorbirati energiju i prenijeti ju do reakcijskih središta (Horton i Ruban 1992; Lichtenthaler i Burkart 1999). Rezultat ove prilagodbe je mogućnost odvijanja fotosinteze i u uvjetima smanjene količine svjetlosti, dok u uvjetima pojačane osvjetljenosti količina apsorbirane energije premašuje onu količinu koja se može iskoristiti za fotosintezu, odnosno, suvišak svjetlosti će izazvati oštećenje (Alves i sur. 2002; Murata i sur. 2007). Također dolazi do prilagodbe u veličini antena oba fotosustava. Smanjenje veličina antena je najčešća kratkoročna prilagodba u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti. Što su antene fotosintetskih jedinica manje, to su one učinkovitije u prijenosu apsorbirane energije (Pearcy 1998; Lichtenthaler i Burkart 1999). Veće fotosintetske jedinice u drvenih vrsta povezane su s njihovom nižom fotosintetskom učinkovitošću u odnosu na zeljaste vrste. Vrste koje pokazuju nižu stopu fotosinteze imaju veće fotosintetske jedinice no manji broj po površini lista. To podrazumijeva i manji broj reakcijskih centara te manje transportnih lanaca elektrona što rezultira smanjenom potrebom za stvaranjem ATP-a i NADPH, odnosno, nižom mjerom fiksacije CO₂ (Alberte i sur. 1976).

2.2.6.1. Mehanizmi fotoinhibicije i oporavak

Smatra se da je protein D1 primarno mjesto fotoinhibicije (Murata i sur. 2007; Krieger-Liszkay i sur. 2008; Tyystjarvi 2008). Tome u prilog ide činjenica da je prijenos elektrona preko PSII inhibiran kada je svjetlost u suvišku, a inicijalni simptom fotoinhibicije je smanjena fotokemijska učinkovitost PSII. Također, fotosintetski pigmenti koji apsorbiraju energiju te ju usmjeruju do reakcijskih središta koji se pri tom modificiraju i pretvaraju apsorbiranu energiju u toplinu, rezultiraju fotoinhibicijom (Alves i sur. 2002). Uloga D1 proteina odnosno njegova inaktivacija tijekom fotoinhibicije tema je kojom se bave znanstvenici posljednjih petnaestak godina. Modifikacija strukture D1 proteina uključena je u mehanizam oporavka od fotoinhibicije (Tyystjarvi 2008). Ji i Jiao (2000) su na različitim kultivarima riže pokazali da se učinkovitost PSII (F_v/F_m) smanjuje, a nefotokemijsko gašenje fluorescencije klorofila *a* se povećava kada je sinteza D1 proteina inhibirana. Isti autori su pokazali da se inhibicijom ksantofilskog ciklusa pomoću ditiotreitola (DTT) smanjio NPQ, što je za posljedicu imalo i dodatnu degradaciju D1 proteina povezanu s velikim smanjenjem učinkovitost PSII.

Kapacitet izmjene D1 proteina (engl. *turnover*) ključan je u oporavku od fotoinhibicije. Prilikom izmjene nužno je *de novo* sintetizirati D1 protein kako bi se aktivnost PSII vratila u

normalu. Ponovna sinteza D1 proteina može započeti već za vrijeme fotoinhibitornih uvjeta, jer se fotoinhibicija događa kada stopa degradacije proteina premašuje stopu biosinteze. Do maksimalne stope oporavka dolazi nakon što se biljka nađe u optimalnim uvjetima. (Aro i sur. 1993; Krause i sur. 1995; Booij-James i sur. 2002; Khaton i sur. 2009; Keren i Krieger-Liszkay 2011). Kapacitet izmjene D1 proteina je ključni fiziološki uvjet važan u stvaranju tolerancije na fotoinhibiciju. On uključuje nekoliko koraka: proteolitičku degradaciju D1 proteina, sintezu prekursora pre-D1, ugrađivanje novo sintetiziranog prekursora u tilakoidnu membranu nakon čega slijedi sklapanje ostalih proteina PSII, završno sklapanje D1 proteina obradom C-terminalnog kraja, te konačno sklapanje OEC. Ukoliko je stopa oštećenja PSII veća od stope popravka istog, doći će do fotoinhibicije (Takahashi i Murata 2008; Tyystjarvi 2008; Keren i Krieger-Liszkay 2011; Tikkanen i Aro 2012).

2.2.6.2. Međudjelovanje svjetlosti i niske temperature

Izlaganje biljaka niskim temperaturama (0-12°C) ili smrzavanju (<0°C) ima različita djelovanja na njihove metaboličke funkcije. Fotosinteza je prvi proces koji podliježe tom djelovanju. Simptomi oštećenja fotosintetskog aparata uzrokovani niskim temperaturama zajedno s pojačanim intenzitetom svjetlosti su poprilično brzi, a dugoročno se očituju u fotooksidaciji fotosintetskih pigmenata (Alves i sur. 2002). Postoji jasna razlika u odgovoru biljaka na niske temperature kada su one u tami ili na svjetlu. Niske temperature u tami vrlo slabo utječu na fotosintetske procese, naročito na PSII, dok visoki intenzitet svjetlosti ubrzava fotoinhibitorne procese (Suzuki i Mittler 2006). Kod biljaka osjetljivih na niske temperature, glavna meta fotoinhibicije na niskim temperaturama je fotosustav I. Hidroksilni radikal koji nastaje reakcijom vodikovog peroksida i reduciranih FeS središta, oštećuje ta središta te reakcijsko središte PSI. Takve biljke pokazuju fotoinhibiciju kada se nađu u uvjetima niske temperature i visokog intenziteta svjetlosti (Alves i sur. 2002). Rast i razvoj na niskim temperaturama omogućuje biljkama bolju toleranciju na fotoinhibiciju na niskim temperaturama. Prilagodba na nisku temperaturu utječe na promjene u organizaciji tilakoida i LHCII kompleksa fotosustava II. Većina istraživanja fotoinhibicije su bazirana na kratkotrajnom izlaganju biljke stresnim uvjetima. Ako se biljke na neki duži period izlože stresnim uvjetima, npr. niske temperature i umjerena količina svjetlosti, one će se u određenoj mjeri prilagoditi (Allen i Ort 2001; Huner i sur. 1998; Janska i sur. 2011). Usporedbom eksperimenata s rajčicama koje su bile izložene niskim temperaturama (5 i 10°C) i umjerenom osvjetljenosti ($400 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) tijekom pet dana te $1000 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ tijekom dva dana, Venema i suradnici (2000) su zaključili da je degradacija pigmenata bila sporija kod biljaka izloženih nižim temperaturama. Također, nefotokemijsko gašenje fluorescencije se pokazalo veće kod listova na nižim temperaturama, što je ukazalo

na veću količinu pigmenata ksantofilskog ciklusa. Ovi su rezultati ukazali da prilagodba na suboptimalne uvjete povećava toleranciju biljaka na fotoinhibiciju izazvanu niskim temperaturama.

Niske temperature smanjuju fotosintetsku učinkovitost, a također i kapacitet oporavka PSII s obzirom da se mjera promjene D1 proteina usporava (Allen i Ort 2001). Također, povećava se akumulacija zeaksantina u listovima izloženim niskim temperaturama, naročito kada je ona u kombinaciji s visokim intenzitetom svjetlosti što je povezano s pojačanim nefotokemijskim gašenjem fluorescencije, odnosno sa smanjenjem fotosintetske učinkovitosti (Leipner 1998).

Osvjetljenje značajno pojačava aktivnost enzima Calvinovog ciklusa, posebice enzima ribuloza 1,5-bisfosfat karboksilaze oksigenaze (Rubisco) i to na tri načina: NADPH proizveden pomoću fotosustava I je alosterički aktivator enzima Rubisco, svjetlosti utječe na pH tilakoidnog prostora koji postaje kiselij, a stroma lužnatija i to aktivira Rubisco, a ioni magnezija, koji ulaze u stromu kada se protoni pod utjecajem svjetlosti potiskuju u tilakoidni prostor, aktiviraju Rubisco (Pevalek - Kozlina 2003). U biljaka koje su prilagođene na niske temperature, povećana količina i aktivnost nekoliko enzima Calvinovog ciklusa nužna je za održavanje fotosintetske aktivnosti (Janmohammadi 2012). To su pokazali Perez-Torres i suradnici (2006) na dvije zeljaste arktičke vrste, *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. i *Deschampsia antarctica* Desv., u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti i niske temperature te Strand i suradnici (1999) na vrsti *Apabidopsis thaliana* (L.) Heynh. koja je uzgajana na niskoj temperaturi. Biljke otporne na niske temperature mogu povisiti ili sniziti maksimalnu stopu fotosinteze, a time i količinu i aktivnost enzima Calvinovog ciklusa, no taj je fenomen najčešće specifičan za vrstu i kultivar (Perez-Torres i sur. 2006). Kada takve biljke rastu na niskim temperaturama, pokazuju iznimnu sposobnost obnavljanja fotosintetskog kapaciteta. Čak i kratkotrajno izlaganje niskim temperaturama izaziva pojačanu aktivaciju enzima Calvinovog ciklusa na vrstama koje su otporne na niske temperature, kao što su špinat, raž i uljana repica (Strand i sur. 1999).

2.2.6.3. Međudjelovanje svjetlosti i visoke temperature

Visoka temperatura i količina svjetlosti je uobičajena pojava tijekom ljetnih dana. Fotoinhibicija fotosinteze zbog velike količine svjetlosti je moguća čak i kada ne postoji ni jedan dodatni stresni čimbenik. Kada se temperatura digne iznad optimalne razine, fotosintetska aktivnost se smanjuje. Na početku, smanjenje je postupno i reverzibilno, no nakon kritične temperature postaje sporo i ireverzibilno. Reverzibilna inaktivacija fotosinteze

je posljedica oštećenja kloroplasta koje može trajati i nakon što se temperatura spusti na optimalnu (Alves i sur. 2002; Takahashi i Murata 2008).

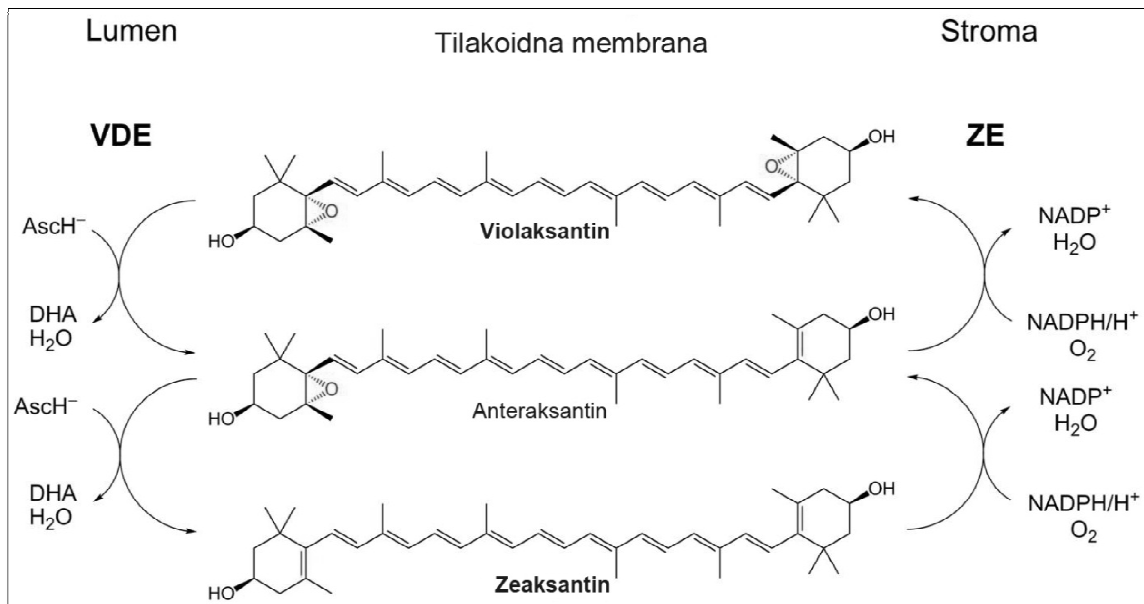
Što se tiče fotoinhibicije u šumama ili nasadima, gdje je drveće relativno zbito, malo se zna. U takvim uvjetima čak i kada je količina osvjetljenja maksimalna, biljkama je dostupna mala količina svjetlosti te je one moraju moći učinkovito upotrijebiti. Krause i suradnici (1995) su proučavali utjecaj fotoinhibicije na maksimalni kvantni prinos (F_v/F_m) kod mladih i razvijenih listova šest različitih vrsta kišnih šuma. Zabilježili su viši stupanj fotoinhibicije kod mladih listova, no mladi su se listovi oporavili mnogo bolje zbog povećane količine α -karotena i zeaksantina (u odnosu na manju količinu ukupnih klorofila).

Izlaganje svjetlu tijekom kraćeg tretmana na visokim temperaturama pogoduje biljkama tako one postaju tolerantnije (Suzuki i Mittler 2006). Isto tako, kraće izlaganje povišenim temperaturama također može kod biljaka izazvati toleranciju na povišenu temperaturu (Larkindale i sur. 2005). Osim toga, visoka temperatura uzrokuje smanjenje aktivnosti enzima Calvin-Bensonovog ciklusa, naročito Rubisco aktivaze te uzrokuje strukturalne promjene tilakoidne membrane. Tilakoidne membrane djeluju kao senzori za promjene koje izaziva povišena temperatura. Čak i 10-15°C iznad optimalne temperature može uzrokovati značajan stres (Larkindale i sur. 2005; Allakhverdiev i sur. 2008). Najosjetljivija komponenta fotosintetskog aparata na povišenu temperaturu je OEC i to zbog toga jer povišena temperatura uzrokuje gubitak dva od četiri Mn iz manganskog klastera (Allakhverdiev i sur. 2008). Izlaganje biljaka kombinaciji visoke temperature i visokog intenziteta svjetlosti uzrokuje smanjenje fotosintetske aktivnosti te stvaranje reaktivnih kisikovih jedinki (ROS) koje pak utječu na procese popravka oštećenog PSII (Hewezi i sur. 2008; Takahashi i Badger 2011).

2.2.7. Inhibitori fotosinteze

Kako bi se pobliže proučili pojedinačni procesi tijekom fotosinteze, kao inhibitori određenih fotosintetskih procesa često se koriste različite organske tvari (npr. karbamati, nitrili), biljni hormoni (npr. etilen), antibiotici (npr. nigericin) i herbicidi. Upotreba nekoliko herbicida direktno uzrokuje fotoinhibiciju fotosinteze. Poznati su brojni su inhibitori koji djeluju na različitim razinama fotosintetskih procesa te se u tu svrhu najčešće koriste inhibitori PSII (Diuron), PSI (metil viologen), sinteze karotenoida (DTT) i proteina (flazasulfuron) (Neubauer 1993; Alves i sur. 2002; Eullaffroy i sur. 2009). U ovom radu korištena su dva inhibitora: DTT

kao inhibitor sinteze karotenoida te nigericin kao inhibitor trans-tilakoidnog protonskog gradijenta.



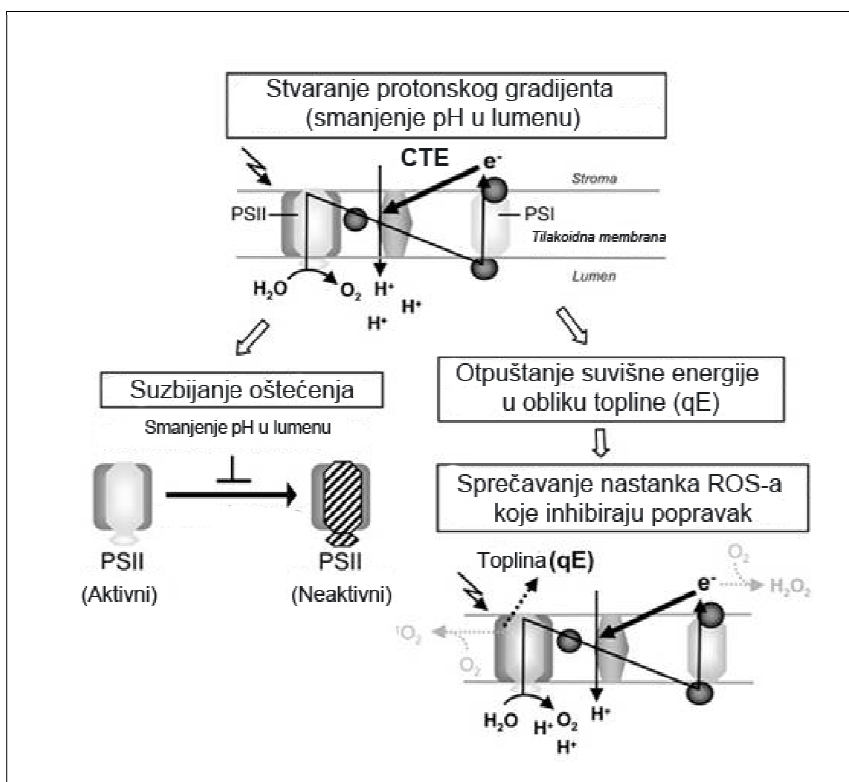
Slika 5. Prikaz ksantofilskog ciklusa, prema Demming-Adams i Adams (1996). VDE – violaksantin de-epoksidaza, ZE – zeaksantin epoksidaza, AscH⁻ - askorbat, DHA - dehidroaskorbat,

2.2.7.1. Ditiotreitol

Ditiotreitol (DTT) je nespecifični inhibitor violaksantin de-epoksidaze (VDE; EC 1.10.99.3). Ksantofilski ciklus (Slika 5) koji kod viših biljaka uključuje de-epoksidaciju violaksantina u zeaksantin u dva koraka, omogućava disipaciju suviška pobudne energije u obliku topline. De-epoksidacija violaksantina preko anteraksantina u zeaksantin odvija se u tilakoidnom lumenu (pH 5,0). Reakciju katalizira enzim violaksantin de-epoksidaza koji se nalazi vezan na tilakoidnu membranu, uz askorbat kao reducens. Nastali zeaksantin pobudnu energiju primljenu od klorofila u tripletnom stanju rasipa u obliku topline. Violaksantin regenerira se u uvjetima tame u stromi kloroplasta (pH 7,5 – 8,0), djelovanjem enzima epoksidaze uz utrošak NADPH i kisika (Niyogi i sur. 1998; Demmig-Adams i sur. 1999; Metzler 2001). U listovima i izoliranim kloroplastima, DTT značajno smanjuje nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ) te je učinkoviti inhibitor aktivnosti enzima askorbat peroksidaze (Bilger i sur. 1989; Neubauer 1993).

2.2.7.2. Nigericin

Nigericin (NGC) je antibiotik dobiven iz vrste *Streptomyces hydroscopicus* (Jensen) Waksman i Henrici koji inhibira prijenos protona preko tilakoidne membrane te stvaranje ATP-a u kloroplastima (Shavit i sur. 1968). To je ionofor (antiporter) koji inhibira nastanak trans-tilakoidnog protonskog gradijenta (ΔpH) tako što inducira zamjenu H^+ iona s K^+ ionima. Modifikacija ΔpH koju uzrokuje nigericin snažno utječe na linearni i ciklički transport elektrona. Uklanjanje ΔpH ubrzava protok elektrona u elektronskom transportnom lancu (Matsubara i Chow 2004; Fernandez-Marin i sur. 2009; Bulychev i sur. 2010). Nizak pH u lumenu, koji nastaje zbog stvaranja ΔpH , regulira ksantofilski ciklus (VDE je aktivna na niskom pH), a on je ključan u aktiviranju qE, odnosno NPQ (slika 6) Stvaranje povećanog ΔpH kroz ciklički protok elektrona je također važan u aktivaciji NPQ. Ukoliko NPQ nije funkcionalan, dolazi do povećane fotoinhibicije PSII u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti. Također, inhibirani ΔpH preko tilakoidne membrane uzrokuje akumulaciju protona u lumenu kloroplasta što dovodi do inhibicije nekih od ključnih komponenata elektronskog transporta (cyt *b₆f* i OEC) što će pak uzrokovati smanjenu mjeru elektronskog transporta odnosno, doći će do ubrzane fotoinhibicije (Takahashi i sur. 2009; Ruban i sur. 2012). Tretman nigericinom trebao bi polučiti sličan odgovor kao i tretman DTT-om, no u znatno manjoj mjeri (Matsubara i Chow 2004).

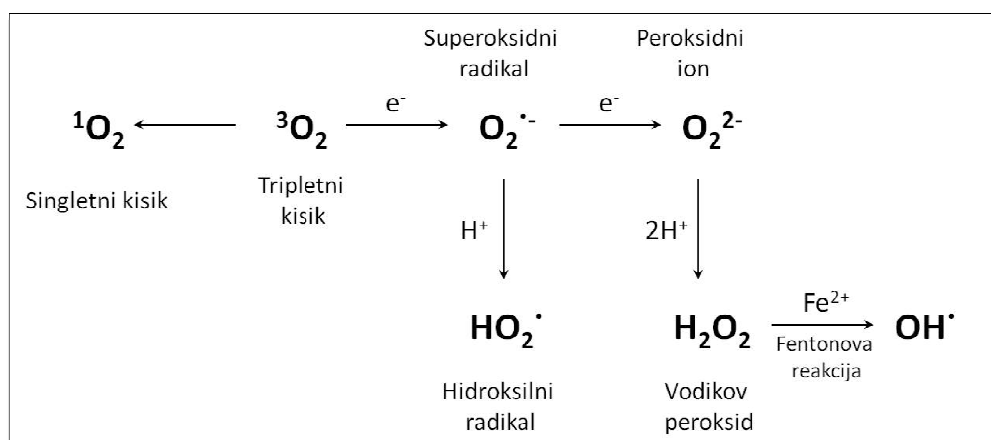


Slika 6. Shematski prikaz zaštite PSII od suviška svjetlosti (prema Takahashi i sur. (2009)).

Ciklički tok elektrona (CTE) stvara ΔpH preko tilakoidne membrane koji pomaže pri izbjegavanju fotoinhibicije pomoću dva mehanizma: jedan je neovisan o qE te suzbija oštećenja PSII smanjenjem pH u lumenu, a drugi je ovisan o qE te sprječava inhibiciju popravka oštećenog PSII na razini sinteze proteina.

2.2.8. Oksidativni stres i antioksidativni odgovor u biljkama

Biljke su neprestano izložene promjenama u okolišu koje narušavaju ravnotežu između stvaranja i potrošnje energije. Te promjene, kao što su npr. oscilacije u temperaturi, intenzitetu svjetlosti, količini vode, UV radijaciji i slično, uzrokuju abiotički stres. Kako biljke imaju relativno ograničene mehanizme izbjegavanja stresa, razvile su sposobnost prilagodbe na promjenjive okolišne čimbenike. Metabolički putovi u biljaka su vrlo osjetljivi na te promjene, pa metabolička neravnoteža može izazvati oksidativni stres u stanicama i to tako da dolazi do pojačanog stvaranja i akumulacije reaktivnih kisikovih jedinki (engl. *reactive oxygen species* – ROS) (Arora i sur. 2002; Bhattacharjee 2005; Suzuki i sur. 2012). ROS nastaju u stanicama i tijekom normalnih metaboličkih procesa (Slika 6).



Slika 7. Shematski prikaz nastanka reaktivnih kisikovih jedinki (ROS) prema Gill i Tuteja (2010).

Fotosintetski elektronski transport je jedan od glavnih izvora reaktivnih kisikovih jedinki u fotosintetski aktivnim biljnim tkivima, a koji ima potencijal stvoriti singletni kisik, $^1\text{O}_2$ i superoksidni radikal $\text{O}_2^{\bullet-}$. Klorofil smješten u antenama i reakcijskim središtima vrlo je učinkovit u apsorpciji svjetlosti. Također ima dodatnu prednost da kada dođe u pobuđeno stanje, u tom stanju ostaje dovoljno dugo kako bi tu pobudnu energiju pretvorio u elektrokemijski potencijal razdiobom naboja. Ako se pak ta energija ne iskoristi učinkovito, elektronski spinovi u pobuđenom stanju mogu prevesti klorofil u tripletno stanje ($^3\text{Chl}^*$). Ako u blizini nema molekula karotenoida („quencher“), klorofil u takvom obliku može reagirati s osnovnim stanjem kisika, $^3\text{O}_2$ te tako stvoriti iznimno reaktivnu molekulu singletnog kisika,

$^1\text{O}_2$ (Krieger-Liszkay i sur. 2008; Triantaphylides i Havaux 2009; Gill i Tuteja 2010). Kontrola elektronskog protoka između PSII i PSI regulira redukcijsko stanje akceptorske strane PSI, što znači da redoks stanje PSI akceptora ne limitira značajno elektronski transport. Također, regulirana aktivacija Calvin-Bensonovog ciklusa te kontrola mjere protoka elektrona su važni čimbenici koji određuju redoks stanje ukupnog feredoksina (Fd). Feredoksin i prenosioci elektrona na reducirajućoj strani PSI imaju dovoljno negativan elektrokemijski potencijal te tako doniraju elektrone kisiku što rezultira nastankom superoksidnog radikala $\text{O}_2^{\bullet-}$. Superoksidni radikal je srednje reaktivna, kratko živuća molekula (2-4 μs). To vrijeme poluživota nije dovoljno da može prelaziti preko membrana te je podložna brzom dismutaciji u vodikov peroksid H_2O_2 (Arora i sur. 2002; Bhattacharjee 2005).

H_2O_2 je vrlo stabilna, srednje reaktivna molekula, no za razliku od $\text{O}_2^{\bullet-}$, ima relativno dugačko vrijeme poluživota, oko 1 ms. S obzirom da se radi o nenabijenoj molekuli, ona vrlo lako prelazi preko biomembrana. H_2O_2 ima dvostruku ulogu: u niskim koncentracijama djeluje kao signalna molekula te aktivira toleranciju na različite tipove stresa, dok u visokim koncentracijama oksidira druge molekule, a u konačnici može izazvati programiranu staničnu smrt (Gill i Tuteja 2010). Također, H_2O_2 može oksidirati i reducirati organske molekule, no ako ne postoje metalni katalizatori, vrlo slabo će reagirati s njima (Foyer i sur. 1997; Cheeseman 2007). U prisutnosti metalnog katalizatora, H_2O_2 podliježe oksidaciji (Fentonova ili Haber-Weissova reakcija) kojoj je krajnji produkt hidroksilni radikal (OH^{\bullet}). To je vrlo reaktivna molekula s kratkim poluživotom (1 μs) i vrlo visokim afinitetom prema biološkim molekulama (Dat i sur. 2000; Arora i sur. 2002; Gill i Tuteja 2010). ROS su slobodni radikali kisika koji reagiraju s nizom različitih molekula kao što su lipidi, proteini ili DNA te uzrokuju njihova oštećenja. Kako bi smanjile ili spriječile oštećenja koja ROS uzrokuju, biljke su razvile funkcionalan antioksidativni mehanizam kojeg čine antioksidativni enzimi (npr. superoksid dismutaza, katalaza, enzimi glutation-askorbatnog ciklusa) i neenzimatski antioksidansi (npr. tokoferol, askorbinska kiselina, karotenoidi) (Bhattacharjee 2005; Gill i Tuteja 2010).

2.2.8.1. Antioksidativni enzimi

Superoksid dismutaza (SOD; EC 1.15.1.1) pripada obitelji metaloenzima koji katalizira pretvorbu $\text{O}_2^{\bullet-}$ u molekularni kisik i H_2O_2 (Tablica 1, Slike 7 i 8). SOD predstavlja prvu liniju obrane biljke od toksičnog efekta povišenih razina ROS. To je jedan od najefikasnijih enzimatskih antioksidansa koji uklanja $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Gill i Tuteja 2010). Kombinacija abiotičkih čimbenika će potaknuti pojačanu produkciju ROS, no aktivnost enzima SOD će imati dvojaku aktivnost, ovisno i o vrsti, odnosno kultivaru ili mutanti. Do povećanja aktivnosti može doći kod povećane količine svjetlosti (Sofa i sur. 2004), solnog stresa (Meloni i sur. 2003), niske temperature (Huang i Guo 2005), nedostatka vode (Iturbe-Ormaetxe i sur. 1998; Beis i

Patakas 2012), odnosno do smanjene aktivnosti kod niske temperature (Hodges i sur. 1997; Huang i Guo 2005).

Katalaza (CAT; EC 1.11.1.6) je enzim koji direktno može prevesti H_2O_2 u H_2O i O_2 (Tablica 1, Slike 7 i 8). Ima vrlo visoku aktivnost, no iznimno nizak afinitet prema H_2O_2 jer reakcija zahtijeva simultani ulazak dvije molekule H_2O_2 na aktivno mjesto (Noctor i Foyer 1998). Iako nije locirana u kloroplastima, katalaza je vrlo značajna u uklanjanju H_2O_2 u peroksisomima. Za ovaj enzim karakteristično je da ima iznimno visoku stopu izmjene, no razine enzima u ravnoteži mogu biti brzo smanjene u slučaju da uvjeti uzrokuju inhibiciju izmjene (Foyer i Noctor 2000). Različiti abiotički čimbenici imaju vrlo varijabilni utjecaj na aktivnost ovog enzima. Ovisno o tipu biljke, i smanjenje i povećanje aktivnosti katalaze zabilježeno je u uvjetima suše (Sofa i sur. 2004; Nair i sur. 2008; Beis i Patakas 2012), niske temperature (Hodges i sur. 1997; Huang i Guo 2005), solnog stresa (Meloni i sur. 2003) i povećane količine svjetlosti (Dat i sur. 2000).

Peroksidaze kataliziraju redoks reakcije između H_2O_2 i različitih reduktanata. Biljne se peroksidaze dijele u tri razreda: razred I obuhvaća intracelularne peroksidaze, razred II su peroksidaze koje sintetiziraju gljive i razred III obuhvaća peroksidaze koje se izlučuju u apoplast biljnih stanica (Hiraga i sur. 2001).

Gvajakol peroksidaze (GPOD; EC 1.11.1.7) koriste aromatske fenole kao što su gvajakol ili pirogalol kao donore elektrona (Tablica 1). Aktivnost GPOD značajno varira ovisno o vrsti biljke i stresnim uvjetima (Gill i Tuteja 2010). Brojne su fiziološke funkcije u kojima gvajakol peroksidaza sudjeluje: biosinteza lignina, suberinizacija, zacjeljivanje ozljeda, katabolizam auksina, obrana od patogena (Hiraga i sur. 2001). Promjene aktivnosti gvajakol peroksidaze zabilježene su kod biljaka izloženih solnom stresu (Mika i Luthje 2003; Yamane i sur. 2009; Tayefi-Nasrabad i sur. 2011), visokoj i niskoj temperaturi te suši (Lu i sur. 2007).

Askorbat peroksidaza (APX; EC 1.11.1.11) pripada u razred I biljnih peroksidaza, a glavna funkcija ovog enzima je brzo uklanjanje H_2O_2 na mjestu njegova nastanka, a kao donor elektrona koristi askorbat (Tablica 1, Slike 7 i 8). Uključena je u glutation-askorbatni ciklus koji uklanja suvišak H_2O_2 (Noctor i Foyer 1998). APX ima znatno veći afinitet prema H_2O_2 od katalaze, no u slučaju kada je redukcija kisika limitirana, aktivnost APX-a je značajno smanjena (Asada 2006). Do povećanja aktivnosti APX može doći kod povećane količine svjetlosti (Yoshimura i sur. 2000; Yabuta i sur. 2004; Golan i sur. 2006), suše (Sofa i sur. 2004; Beis i Patakas 2012), odnosno do smanjenja aktivnosti također kod manjka vode (Iturbe-Ormaetxe i sur. 1998) ili smrzavanja (Huang i Guo 2005).

Glutation reduktaza (GR; EC 1.6.4.2) je također enzim glutation-askorbatnog ciklusa (Tablica 1, Slike 7 i 8). Katalizira redukciju oksidiranog glutationa (GSSG) u reducirani oblik (GSH). Reakcija je ovisna o NADPH. GR igra važnu ulogu u obrambenom sustavu protiv ROS tako što održava glutation u reduciranom stanju. Lokalizirana je u kloroplastima, no određene, male količine enzima su pronađene i u mitohondrijima i citoplazmi (Foyer i sur. 1997; Noctor i Foyer 1998; Arora i sur. 2002; Gill i Tuteja 2010). Kao i ostali antioksidativni enzimi, ovisno o tipu stresa i biljnoj vrsti, aktivnost GR je promjenjiva. Zabilježene su povećanje aktivnosti tijekom smrzavanja (Hodges i sur. 1997), solnog stresa (Meloni i sur. 2003) i povišene količine svjetlosti (Logan i sur. 1998), dok su smanjene aktivnosti izazvane niskom temperaturom (Huang i Guo 2005) i sušom (Iturbe-Ormaetxe i sur. 1998).

Tablica 1. Prikaz djelovanja najvažnijih enzima antioksidativnog sustava u biljkama.

Enzim	Reakcija
Superoksid dismutaza (SOD)	$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$
Katalaza (CAT)	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$
Askorbat peroksidaza (APX)	$H_2O_2 + AA \rightarrow 2H_2O + DHA$
Glutation reduktaza (GR)	$GSSG + NAD(P)H \rightarrow 2GSH + NAD(P)^+$
Gvajakol peroksidaza (GPOD)	$H_2O_2 + GSH \rightarrow H_2O + GSSG$

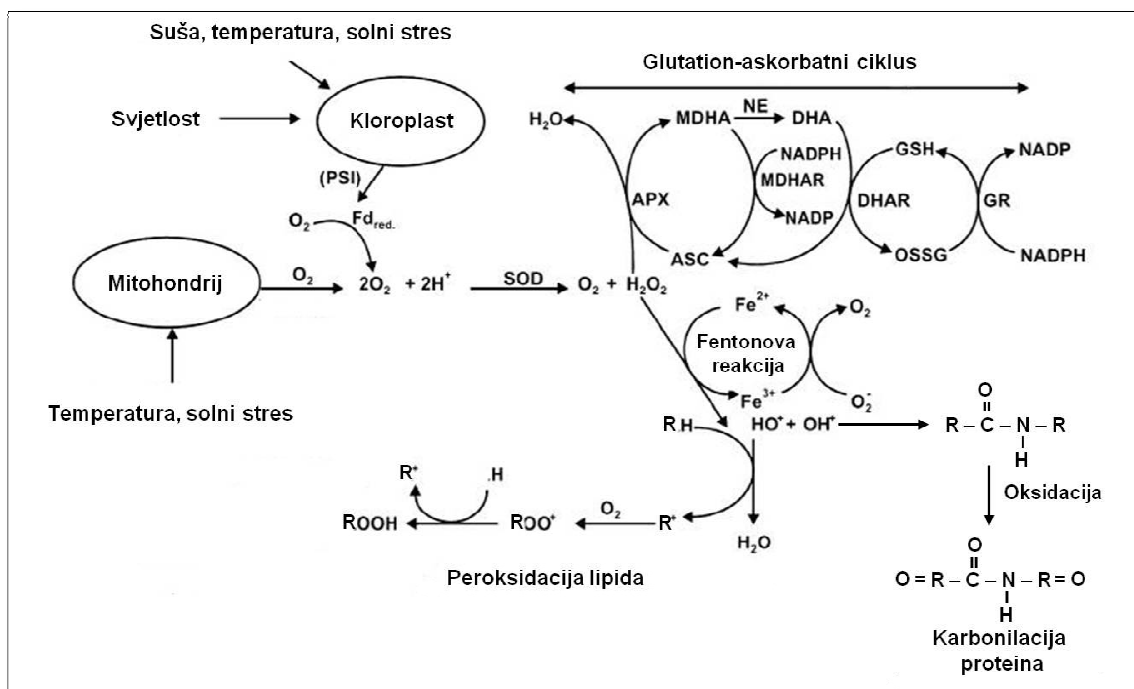
2.2.8.2. Peroksidacija lipida

Peroksidacija lipida je proces za koji se smatra da uzrokuje najviše oštećenja u živom organizmu. Tijekom peroksidacije lipida (Slika 8), iz polinezasićenih prekursora stvaraju se produkti koji mogu reagirati sa tiobarbiturnom kiselinom stvarajući obojene produkte TBARS (engl. *thiobarbituric acid reactive substances*). Često se ovaj parametar koristi kao jedini kojim se može odrediti razina oštećenja uslijed stresa. Cjelokupni proces peroksidacije lipida uključuje tri odvojena koraka: inicijacija, propagacija te terminacija. Za inicijaciju su nužni kompleksi prijelaznih metala, najčešće Cu i Fe. Inicijaciju najčešće uzrokuju OH^{\bullet} radikali i to tako da oduzimaju vodikov atom iz masnih kiselina nakon čega nastaju alkilni radikali (R^{\bullet}). Oni reagiraju s molekulskim kisikom što uzrokuje stvaranje peroksilnih radikala (ROO^{\bullet}). Jednom kad oni nastanu, mogu dalje uzrokovati lanac peroksidacijskih reakcija oduzimanjem atoma vodika iz bočnih lanaca polinezasićenih masnih kiselina (engl. *polyunsaturated fatty acids* – PUFA). Čitava reakcija završava kada nastali radikali reagiraju međusobno te tako formiraju produkte koji dalje ne mogu nastaviti propagaciju lančanih reakcija. Samo jedna reakcija inicijacije može uzrokovati brojne lančane reakcije peroksidacije.

Cjelokupni proces lipidne peroksidacije smanjuje membransku fluidnost te omogućava zamjenu fosfolipida u dvosloju. Također smanjuje selektivnost biomembrana što se očituje u povećanom „curenju“ molekula koje bi inače prolazile kroz specifične prijenosne kanale (Berger i sur. 2001; Bhattacharjee 2005; Gill i Tuteja 2010).

2.2.8.3. Proteinski karbonili

Oksidacija proteina (Slika 8) je kovalentna modifikacija proteina koju najčešće uzrokuju ROS, (najčešće HO•, H₂O₂ i O₂•⁻) ili reaktivne dušikove jedinice (engl. *reactive nitrogen species* – RNS) koji nastaju kao posljedica oksidativnog stresa. To su najčešće ireverzibilne promjene. Najzastupljenija oksidativna promjena je karbonilacija te se kao takva koristi kao marker oksidacije, odnosno oštećenja proteina. Brojne aminokiseline, naročito arginin, histidin, lizin i prolin imaju slobodne karbonilne grupe koje inhibiraju ili mijenjaju aktivnost samog proteina. Karbonilacija nastaje kao direktna oksidacija aminokiselinskog bočnog lanca. Reaktivni kisik oduzima atom vodika iz aminokiselinskog ostatka te tako nastaju radikali koji se mogu međusobno povezivati (Juszczuk i sur. 2008; Rinalducci i sur. 2008; Gill i Tuteja 2010).



Slika 8. Shematski prikaz nastanka i uklanjanja reaktivnih kisikovih jedinica (ROS): superoksidnog radikala (O₂•⁻), vodikovog peroksida (H₂O₂) i hidroksilnog radikala (OH•) uslijed oksidativnog stresa te utjecaj ROS-a na peroksidaciju lipida i karbonilaciju proteina, modificirano i prilagođeno iz Wahid i suradnici (2007).

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA

Ciljevi istraživanja su utvrditi učinkovitost PSII i razinu antioksidativnog odgovora u uvjetima svjetlosnog stresa u mladim i razvijenim listovima smokve te istražiti fotokemijske i biokemijske mehanizme prilagodbe fotosintetskog aparata. Nadalje, istražiti međudjelovanje dva tipa stresa (svjetlost i temperatura) na fotosintetsku učinkovitost i antioksidativni odgovor mladih i razvijenih listova. Također, cilj je istražiti doprinos nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila *a* u održavanju fotosintetske učinkovitosti u mladim i razvijenim listovima pod inhibitornim utjecajem ditiotreitola i nigericina.

Osnovna pretpostavka je da mladi i razvijeni listovi imaju različite fotokemijske i biokemijske prilagodbe kojima se brane od svjetlosnog stresa. Te će prilagodbe pokazati različite strategije u obrani mladih i razvijenih listova od fotoinhibitornih uvjeta tijekom dnevnog ciklusa, naročito u vrijeme izražene insolacije i povišene temperature tijekom podneva. Očekuje se da će kombinacija visokog intenziteta svjetlosti s povišenom ili sniženom temperaturom, odnosno niski intenzitet svjetlosti s povišenom ili sniženom temperaturom u kontroliranim uvjetima barem djelomično pokazati koji od primijenjenih stresora ima veći utjecaj na fotosintetsku učinkovitost i antioksidativni odgovor. Pretpostavka je da mladi listovi imaju razvijen fotosintetski aparat koji je sposoban suvišak svjetlosne energije otpustiti te će procesi apsorpcije svjetlosne energije i elektronskog transporta biti neuravnoteženi u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti, a što će u konačnici dovesti do fotoinhibicije. Također, očekuje se da će inhibitori nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila *a* imati različit utjecaj na funkcioniranje mladih i razvijenih listova što će doprinijeti tumačenju različitog odgovora povezanog sa smanjenjem fotosintetske učinkovitosti i fotoinhibicijom.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. BILJNI MATERIJAL I OPIS EKSPERIMENTA

Fotosintetska učinkovitost i antioksidativni odgovor mladih i razvijenih listova smokve (*Ficus carica* L.) istraživana je na dvije lokacije u Osijeku, Hrvatska: 45°33'29,4"S, 18°43'2,7"1 i 45°33'32,7" S, 18°41'7,5"1. Istraživanje je vršeno tijekom tri godine, od 2009. do 2011. godine, u periodu od lipnja do kolovoza, a sastojalo se je od tri dijela: dnevnih promjena učinkovitost fotosustava II, eksperimenta u kontroliranim uvjetima s četiri različita tretmana, te tretmana inhibitorima nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila *a*. U sva tri dijela istraživanja određivana je fotosintetska učinkovitost i antioksidativni odgovor na oba tipa listova. Fotosintetska učinkovitost određena je metodom polifaznog porasta fluorescencije klorofila *a* (OJIP test) te metodom saturacijskog pulsa. Također je određena koncentracija fotosintetskih pigmenata te akumulacija proteina D1 i velike podjedinice (LSU) enzima Rubisco-*a*. Za određivanje antioksidativnog statusa određivane su aktivnosti enzima superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), askorbat peroksidaze (APX), gvajakol peroksidaze (GPOD) i glutation reduktaze (GR) te razina peroksidacije lipida (TBARS) i oštećenja proteina (proteinski karbonili).

4.1.1. Biljni materijal

Za istraživanje su izabrana dva različita genotipa odnosno dvije sorte smokve: Zamorčica i Fico della Madonna (Slika 9). S obzirom da je smokva vrsta koja se lako razmnožava reznicama, postoji velika mogućnost da jedinke odnosno stabla koja rastu relativno blizu jedno drugome imaju isti genotip. U ovom istraživanju izabrana su dva genotipa s vidljivo različitim morfološkim karakteristikama kojima je na temelju morfologije lista i ploda te drugih karakteristika determinirana sorta. Sorte često variraju u nekim značajkama kao što su morfologija lista, bujnost krošnje, vanjska i unutrašnja boja ploda, okus ploda i brojne druge. (IPGRI i CIHEAM 2003; Flaishman i sur. 2008). Zamorčica (Slika 9 A) je naša najbolja i najraširenija sorta. Tolerantna je na sušu i hladnoću, bujna je i rodna, odlikuje se odličnim plodovima za potrošnju u svježemu stanju i za sušenje. Tipična je jednorotka s degeneriranim ženskim cvjetovima. Kruškoliki plod ima duguljasti vrat, tanku svijetlo zelenu kožicu, a žućkasto zelenu u vrijeme dozrijevanja (Prgomet i Bohač 2003; Badelj Mavsar i sur. 2008). Fico della Madonna (Slika 9 B) je raširena u Istri i sjeveroistočnom primorju. To je

tipična dvorotka koja donosi proljetne i kasne ljetne plodove. Ima vrlo bujnu krošnju, a plodovi su krupni i kruškoliki, žute boje, no osrednje kvalitete (Prgomet i Bohač 2003; Badelj Mavsar i sur. 2008).



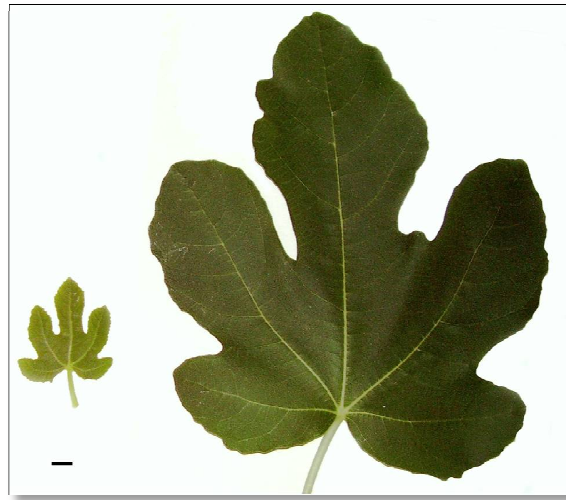
Slika 9. Istraživana stabla smokve sorti Zamorčica (A) i Fico della Madonna (B).

4.1.2. Određivanje dnevnih promjena fotosintetske učinkovitosti i antioksidativnog odgovora

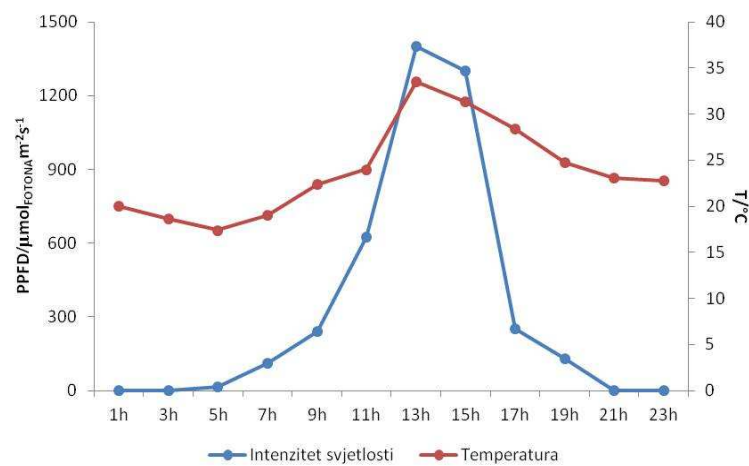
Stablo smokve Zamorčica korišteno je kao primarni objekt ovog dijela istraživanja te su na njoj izvršena sva mjerenja. Uzorkovanje je izvršeno 16. svibnja 2011. godine. Za istraživanje su odabrani mladi listovi veličine 5-6 cm te razvijeni listovi veličine 20-25 cm (Slika 10). Svaka dva sata mjerena je količina svjetlosti i temperatura kako bi se dobio uvid u mikroklimatske promjene tijekom dnevnog ciklusa (Slika 11).

Za određivanje dnevnih promjena fotosintetske učinkovitosti, tijekom 24 sata, u 1h, 7h, 13h i 19h, na listovima smokve u prirodi mjereno je polifazni rast fluorescencije klorofila a pomoću aparata Handy PEA (Hansatech). Svaki put mjereno je po 10 listova oba tipa. Istovremeno su uzorkovani listovi za određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata i akumulacije proteina D1 i enzima Rubisco-a. Također, oba tipa listova uzorkovana su na terenu u 7h i 13h i u prijenosnom hladnjaku prevezena u laboratorij. Ti su listovi korišteni za mjerenje fluorescencije klorofila a metodom saturacijskog pulsa i određivanje razine antioksidativnog odgovora.

Na listovima smokve Fico della Madonna izvršeno je mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* na terenu i to četiri puta tijekom 24 sata, u 6h, 12h, 18h i 0h. Svaki put mjereno je po 10 listova oba tipa. Uzorkovanje je izvršeno 16. svibnja 2011. godine. S obzirom na udaljenost lokacija istraživanih stabala, mjerenja su izvršena sat vremena ranije. Za vrijeme uzorkovanja mjerena je temperatura i količina osvjetljenja, a vrijednosti su se podudarale s onima izmjerenim sat vremena kasnije te su prikazane na Slici 11.



Slika 10. Istraživani listovi smokve: mladi listovi veličine 5-6 cm te razvijeni listovi veličine 20-25 cm. Mjerna linija odgovara duljini 1 cm.

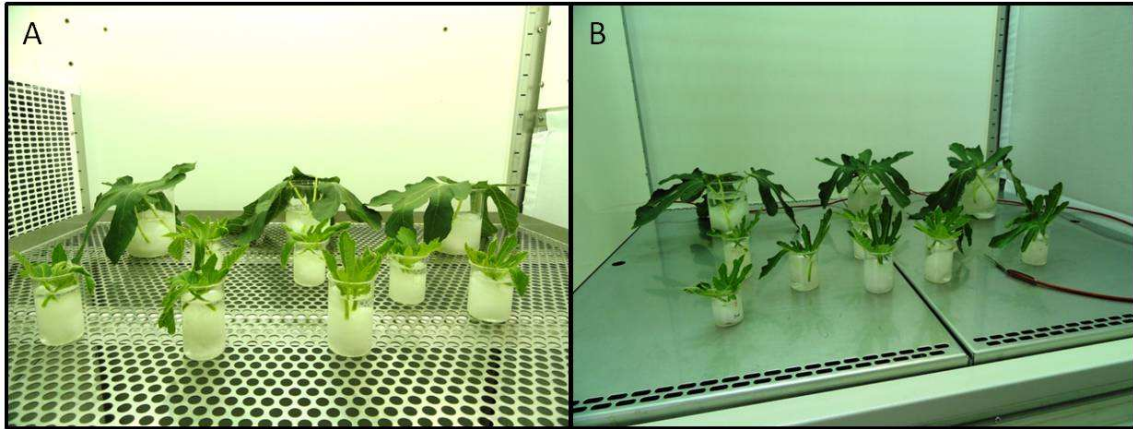


Slika 11. Količina osvjetljenja ($\mu\text{mol}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) i temperatura ($^{\circ}\text{C}$) mjerena tijekom dnevnog ciklusa.

4.1.3. Određivanje fotosintetske učinkovitosti i antioksidativnog odgovora u eksperimentalnim uvjetima

Određivanje fotosintetske učinkovitosti i antioksidativnog odgovor mladih i razvijenih listova u kontroliranim uvjetima vršeno je tijekom lipnja, srpnja i kolovoza 2009. i 2010. godine. Mladi i razvijeni listovi obje sorte (Zamorčica i Fico della Madonna) uzorkovani su oko 19 sati nakon čega su u prijenosnom hladnjaku s ledenim blokovima prevezeni u laboratorij. Kako bi se poništio vanjski utjecaj, listovi su peteljka u uronjenima u vodu smješteni u tamnu komoru na 12 sati na stabilizaciju. Oba tipa listova su nakon stabilizacije smještena u klima komoru (Vösch V7014) na jedan od tretmana u trajanju od 4h (Slika 12). Postavljena su četiri pokusa - kombinacije dva različita intenziteta osvjetljenja i dvije različite temperature. Kombiniran je tretman s visokim intenzitetom svjetlosti (HL – engl. *high light*, $800 \pm 20 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) s povišenom ($35 \pm 1^\circ\text{C}$) i niskom ($10 \pm 1^\circ\text{C}$) temperaturom te tretman niskim intenzitetom svjetlosti (LL – engl. *low light*, $50 \pm 5 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) također s povišenom ($35 \pm 1^\circ\text{C}$) i niskom ($10 \pm 1^\circ\text{C}$) temperaturom. Za tretmane su u daljnjem tekstu korištene kratice HL35 ($800 \pm 20 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i $35 \pm 1^\circ\text{C}$), HL10 ($800 \pm 20 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i $10 \pm 1^\circ\text{C}$), LL35 ($50 \pm 5 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i $35 \pm 1^\circ\text{C}$), i LL10 ($50 \pm 5 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i $10 \pm 1^\circ\text{C}$). Listovi nakon 12h stabilizacije korišteni su za određivanje fotosintetske učinkovitosti i antioksidativnog odgovora u početnom stanju, prije tretmana te je za te rezultate u daljnjem tekstu korištena kratica P.

Čitav eksperiment učinjen je u duplikatu. Za mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila a korišteno je po 20 mladih i 20 razvijenih listova. Isti listovi korišteni su za određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata i akumulacije proteina D1 i enzima Rubisco-a te za određivanje razine antioksidativnog odgovora. Svi su uzorci mjereni u triplicatu. Mjerenje fluorescencije klorofila a metodom saturacijskog pulsa određen je maksimalni kvantni prinos fluorescencije (F_v/F_m) te je u tu svrhu je korišteno je po 5 listova svakog tipa.



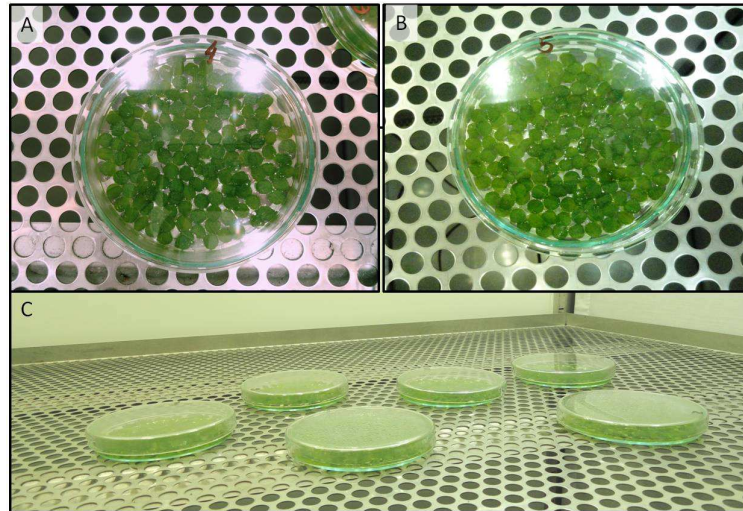
Slika 12. Mladi i razvijeni listovi smokve smješteni u klima komoru na HL35 (A) i LL35 tretman (B).

4.1.4. Određivanje fotosintetske učinkovitosti i antioksidativnog odgovora nakon tretmana inhibitorima nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila a

Za ovaj dio eksperimenta koristili su se mladi i razvijeni listovi sorte Zamorčica. Uzorkovanje je vršeno tijekom lipnja i srpnja 2010. godine. Listovi su uzorkovani oko 19 sati nakon čega su u prijenosnom hladnjaku s ledenim blokovima prevezeni u laboratorij. U tami su pomoću metalnog bušača za čepove izrezani lisni diskovi promjera 6 mm. Po 120 lisnih diskova oba tipa listova poslagani su u Petrijeve zdjelice s 10 mL otopine (Slika 13). Kao kontrola (K) korištena je 0,5%-tna otopina etanola, a $5\mu\text{M}$ otopina nigericina u 0,5%-tnoj otopini etanola (NGC) i 10mM otopina DTT-a u 0,5%-tnoj otopini etanola (DTT) kao tretmani inhibitorima. S lisnim diskovima iz sva tri tretmana u daljnjem tijeku eksperimenta postupano je na isti način. Ulazak otopina u tkivo potaknut je vakuum infiltracijom u tami, na sobnoj temperaturi ($20\pm 2^\circ\text{C}$), pod tlakom od 25kPa i to tako da je svaki uzorak vakuumiran 3 puta po 30 sekundi. Nakon toga su lisni diskovi u Petrijevim zdjelicama stavljeni na stabilizaciju 12 sati u tamu, a potom smješteni u klima komoru u trajanju od 30 minuta. Uvjeti u klima komori su namješteni na $800\pm 20 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i 35°C (HL35), što je bio tretman koji je izazvao najjači nefotokemijski odgovor kod oba tipa listova u pokusu koji je proveden u kontroliranim uvjetima.

Čitav eksperiment ponovljen je tri puta. Za mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila a korišteno je po 40 lisnih diskova mladih i razvijenih listova. Mjerenje je vršeno nakon 30 min tretmana na visokom intenzitetu svjetlosti i povišenoj temperaturi (HL35). Za mjerenje

fluorescencije klorofila *a* metodom saturacijskog pulsa korišteno je po 5 lisnih diskova oba tipa listova nakon 30 min HL35 tretmana. Za određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata i akumulacije proteina D1 i enzima Rubisco-a te za određivanje razine antioksidativnog odgovora korišteni su lisni diskovi nakon 30 min tretmana HL35. Svi su uzorci mjereni u triplicatu.



Slika 13. Lisni diskovi mladih (B) i razvijeni (A) listova smokve smješteni u klima komoru na HL35, na tretmane inhibitorima nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila *a* (D).

4.2. ISTRAŽIVANJE FOTOSINTETSKE UČINKOVITOSTI

4.2.1. Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila a i OJIP test

Za određivanje fotosintetske učinkovitosti *in vivo* korišten je uređaj **Plant Efficiency Analyzer** (Handy PEA, Hansatech, VB). Sav biljni materijal je prije mjerenja bio prilagođen na uvjete tame tijekom 30 minuta. Za indukciju polifaznog rasta fluorescencije klorofila korišten je puls crvene saturacijske svjetlosti (maksimum 650 nm, $3000 \mu\text{mol}_{\text{FOTONAM}}^{-2}\text{s}^{-1}$). PEA-fluorometar omogućava bilježenje promjena u intenzitetu fluorescencije tijekom 1s, počevši od 50 μs nakon osvjtljavanja. Podaci o intenzitetu fluorescencije nakon 50 μs (F_o), 150 μs , 300 μs , 2 ms (F_J), 30 ms (F_I), maksimalnom intenzitetu fluorescencije (F_m), vremenu potrebnom za postizanje maksimalnog intenziteta te površini iznad OJIP-krivulje (AREA) koriste se u OJIP-testu te se pomoću njih izračunavaju parametri koji opisuju glavne funkcionalne karakteristike fotosustava II (Tablica 2).

Tablica 2. Parametri dobiveni mjerenjem polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* i parametri OJIP testa

Parametar	Opis	Jednadžba
F_o	intenzitet fluorescencije nakon 50 μ s (O stupanj)	
F_{300}	intenzitet fluorescencije nakon 300 μ s	
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	$F_v = F_m - F_o$
t_{max}	vrijeme potrebno da se postigne F_m	
V_J	varijabilna fluorescencija na J stupnju	$V_J = (F_J - F_o) / (F_m - F_o)$
V_I	varijabilna fluorescencija na I stupnju	$V_I = (F_I - F_o) / (F_m - F_o)$
S_m	normalizirana komplementarna površina iznad OJIP krivulje	$AREA / (F_m - F_o)$
M_o	ukupna brzina zatvaranja RC	$(TR_o / RC) - (ET_o / RC) = 4(F_{300\mu s} - F_o) / (F_m - F_o)$
N	prometni broj	$S_m \times [(dV/dt)_0] / V_J$
RC/CS_o	gustoća aktivnih reakcijskih središta	$F_v / F_m \times (V_J / M_o) \times ABS / CS_o$
TR_o/ABS	maksimalni kvantni prinos fotosustava II	$[1 - (F_o / F_m)] = F_v / F_m$
ET_o/ABS	kvantni prinos elektronskog transporta	$1 - (F_o / F_m)$
ET_o/TR_o	učinkovitost kojom „uhvaćeni“ („trapped“) eksciton omogućava prijenos elektrona u elektron-transportnom lancu dalje od Q_A^-	$(1 - V_J)$
ABS/RC	apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu	$M_o \times (1/V_J) \times [1/(F_v/F_m)]$
TR_o/RC	protok uhvaćenih fotona po aktivnom reakcijskom središtu	$M_o \times (1/V_J)$
ET_o/RC	elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu	$M_o \times (1/V_J) \times (1 - V_J)$
DI_o/RC	rasipanje po aktivnom reakcijskom središtu	$(ABS/RC) - (TR_o/RC)$
ABS/CS	apsorpcija po pobuđenoj površini	$ABS/CS_o \approx F_o$
TR_o/CS	protok uhvaćenih fotona po pobuđenoj površini	$[1 - (F_o/F_m)] \times F_o$
ET_o/CS_o	elektronski transport po pobuđenoj površini	$[1 - (F_o/F_m)] \times (1 - V_J) \times F_o$
DI_o/SC_o	rasipanje po pobuđenoj površini	$(ABS/CS_o) - (TR_o/CS_o)$
PI_{ABS}	indeks fotosintetske učinkovitosti	$(RC/ABS) \times (TR_o/DI_o) \times [ET_o / (TR_o - ET_o)]$
RC/ABS	omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta i koncentracije antena klorofila	$(RC/TR_o) \times (TR_o/ABS) = [(F_J - F_o) / 4(F_{300\mu s} - F_o)] \times (F_v / F_m)$
TR_o/DI_o	omjer protok uhvaćenih fotona i rasipanje energije	F_v / F_o
$ET_o / (TR_o - ET_o)$	transport elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A	$(F_m - F_J) / (F_J - F_o)$

4.2.2. Mjerenje fluorescencije klorofila a metodom saturacijskog pulsa

Za mjerenje fluorescencije klorofila a metodom saturacijskog pulsa korišten je „Pulse Amplitude Modulated“ fluorometar (Mini-PAM, Waltz, Njemačka). Metoda saturacijskog pulsa (Schreiber i sur. 1994) temelji se na primjeni dovoljno jakog svjetlosnog impulsa uslijed čega dolazi do potpune redukcije vezanog plastokinona (Q_A). Saturacijski puls trenutno zatvara sva reakcijska središta. Sav biljni materijal je bio prilagođen na uvjete tame u tamnoj komori gdje su vršena i mjerenja. Nakon 30 min prilagodbe na uvjete tame izmjeren je minimalni intenzitet fluorescencije (F_0). Nakon toga je primijenjen puls saturacijske svjetlosti ($5000 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) kako bi se odredio maksimalni prinos fluorescencije (F_m) te izračunao maksimalni kvantni prinos fluorescencije:

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

pri čemu je F_v razlika između minimalne i maksimalne fluorescencije, odnosno varijabilna fluorescencija. Uzorci se tada izlažu različitim količinama svjetlosti (100, 500 i 800 $\mu\text{mol}_{\text{FOTONA}} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) tijekom 30-tak minuta. Za svaku količinu svjetlosti određena je minimalna (F_0') i maksimalna (F_m') fluorescencija uzorka prilagođenog uvjetima svjetla te maksimalna učinkovitost fotosustava II (engl. *photosystem II* - PSII) koja je izražena kao omjer:

$$F_v'/F_m' = \Delta F/F_m' = (F_m' - F_0')/F_m'$$

Neciklički transport elektrona kroz PSII (engl. *relative electron transport rate* - reIETR) je izračunat iz formule:

$$\text{reIETR} = \Delta F/F_m' \times \text{PPFD} \times 0,5$$

gdje je PPFD predstavlja gustoću fotosintetski aktivnog toka fotona (engl. *photosynthetically active photon flux density* – PPFD), a 0,5 faktor koji pretpostavlja da su fotosustavi II i I pobuđeni u jednakoj mjeri. Nefotokemijski „*quenching*“ (NPQ) ili nefotokemijsko gašenje fluorescencije klorofila a je izračunat iz formule:

$$\text{NPQ} = (F_m - F_m')/F_m'.$$

Za izračun svih parametara se koriste vrijednosti izmjerene na kraju svakog svjetlosnog koraka kada se vrijednosti više nisu značajno mijenjale.

4.2.3. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata

Za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata tkivo je usitnjeno u tekućem dušiku uz dodatak magnezijevog hidrogenkarbonata (MgHCO_3) do finog praha. Otprilike 0,05 g tkiva je prebačeno u prethodno označene i izvagane tubice te je određena točna masa tkiva. Nakon toga je u tubicu dodano 1 mL hladnog acetona. Pigmenti su ekstrahirani 15 minuta na ledu nakon čega su centrifugirani 10 minuta pri 15000 g na 4°C. Supernatant je prebačen u plastičnu epruvetu s čepom na navoj. Reekstrakcija se ponavljala više puta sve dok talog nije bio potpuno obezbojen. Supernatanti su spojeni, a prije mjerenja je očitana ukupni volumen spojenih ekstrakata. Koncentracije fotosintetskih pigmenata, klorofila *a* (Chl *a*), klorofila *b* (Chl *b*) i ukupnih karotenoida (Car), određene su spektrofotometrijski (Analytik Jena Specord 40) mjerenjem apsorbancije na 661,6, 644,8 i 470 nm. Za izračun su korišteni ekstincijski faktor prema Lichtenthaleru (1987):

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

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

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

gdje je:

V – ukupni volumen ekstrakta fotosintetskih pigmenata, izražen u mL i

m – masa uzorka, izražena u gramima.

Koncentracija fotosintetskih pigmenata izražena je u mg g^{-1} svježe tvari (Sv.T).

4.3. SDS-ELEKTROFOREZA TOPLJIVIH I MEMBRANSKIH PROTEINA

4.3.1. Ekstrakcija topljivih i membranskih proteina

Biljni materijal je usitnjen u tekućem dušiku do finog praha te je oko 0,5 g tkiva prebačeno u prethodno izvaganu tubicu i određena točna masa tkiva. U tubice je dodano 1 mL ekstrakcijskog pufera zagrijanog na 80°C, a koji je sadržavao 0,1M Tris/HCl (pH = 8), 18,9 mL 0,1 M Tris/HCl (pH=8), 34,5 mL 20% SDS, 27,48 mL 87% glicerol i 0,231g DTT. Ekstrakcija se odvijala na termobloku (Termomixer compact, Eppendorff) na 80°C tijekom 10 minuta. Uzorci su nakon toga ohlađeni na ledu, a nakon toga centrifugirani na 4°C tijekom 10 minuta pri 18000 g. Postupak je ponovljen, a supernatanti dvije ekstrakcije spojeni. Koncentracija proteina određena je metodom prema Bradfordu (1976) koja se temelji na brzom pomaku maksimuma apsorbancije od 465 nm na 595 nm, a do kojeg dolazi zbog vezivanja boje Coomassie briljant plavo (engl. *Coomassie brilliant blue* – CBB) na proteine. Elektrostatske sile između sulfatnih skupina boje i bazičnih aminokiselinskih ostataka te hidrofobne interakcije s ostacima aromatskih aminokiselina ključne su za vezanje boje CBB na proteine. Koncentracija proteina izračunata je na temelju baždarne krivulje koja je napravljena s poznatim koncentracijama albumina goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumine* – BSA). Koncentracija proteina je izražena kao mg g⁻¹ svježe tvari te je ista korištena za izračun količine proteina za SDS-elektroforezu.

4.3.2. SDS-elektroforeza u poliakrilamidnom gelu

Za razdvajanje proteina korišten je 12% poliakrilamidni gel (Laemmli 1970) uz dodatak SDS-a i DTT-a. Svaki alikvot proteinskog ekstrakta je sadržavao 20 µg proteina te mu je dodano 1-2 µL Laemmli pufera za uzorke, koji je sadržavao 2,5 mL 1,5M Tris/HCl pufera, pH 6,8, 1,2g SDS-a, 3mL glicerola, 20mg boje bromfenol plavo i 1,2mL β-merkaptioetanol. Uzorci su denaturirani na 95°C u termobloku u trajanju od 5 minuta nakon čega su prebačeni na led. Uz uzorke je na gel dodan i marker molekularnih masa (Prestained SDS marker, Biorad). Elektroforeza je tekla u puferu za razdvajanje (3,02g Tris-a, 14,4g glicina, 1g SDS-a u 1L vode) otprilike 2 sata pri konstantnoj jakosti struje od 20 mA.

4.3.3. Western blot i imunodetekcija

Nakon razdvajanja proteina SDS – elektroforezom, proteini su prebačeni na nitroceluloznu membranu (Biorad) metodom Western blot (Towbin i sur. 1979). Za prijenos je korišten polusuhi (engl. *semi-dry*) sustav Fastblot (Biometra) te su korišteni anodni (20mM Tris, 150mM glicin, 30% (v/v) metanol) i katodni (20mM Tris, 150mM glicin, 0,1% (W/v) SDS) pufer. Nitrocelulozna membrana je prethodno inkubirana nekoliko minuta u anodnom puferu, a poliakrilamidni gel u katodnom puferu. Za prijenos je sastavljen tzv. „sendvič“: katoda (-), filter-papir za prijenos namočen u katodni pufer, poliakrilamidni gel, nitrocelulozna membrana, filter-papir namočen u anodni pufer, anoda (+). Prijenos je trajao 2 sata na 4°C pri konstantnoj jakosti struje od 0,65 mA po cm² membrane. Nakon prijenosa, membrana je obojana otopinom Ponceau (0,2%-tni Ponceau S u 3%-tnoj trikloroctenoj kiselini) u svrhu provjere valjanosti prijenosa te isprana u destiliranoj vodi. Nakon toga, membrana je blokirana 1 sat u TBS puferu koji je sadržavao 1% Tween 20 i 5% nemasno mlijeko. Nakon blokiranja, membrana je inkubirana u primarnom protutijelu preko noći na 4°C. Korištena su komercijalna protutijela; za detekciju D1 proteina korišteno je anti-PsbA (1:2000, Agrisera), a za detekciju Rubisco LSU anti-RbcL (1:5000, Agrisera) u TBST puferu i 5%-tnom nemasnom mlijeku. Nakon inkubacije, membrana je ispirana 3x5 minuta u TBST puferu te inkubirana 2 sata u HRP anti-rabbit IgG sekundarnom antitijelu (1:10000, Santa Cruz). Nakon inkubacije slijedilo je ponovno ispiranje 3x5 minuta u TBST puferu. Detekcija proteinskih vrpce provedena je metodom luminiscencije na ECL filmu (AGFA) u tamnoj komori. Membrana je stavljena na prozirnu foliju te inkubirana s 1 mL otopine luminola i peroksida (Roche) u omjeru 1:1. Membrana je prekrivena drugim djelom prozirne folije te se nakon 10 minuta istisne višak tekućine. Membrana je uložena u kazetu za eksponiranje te je preko nje položen ECL film. Film je eksponiran u trajanju od 2 do 10 minuta te je razvijen i fiksiran standardnim postupkom u skladu s uputama proizvođača. Filmovi su skenirani, a proteinske vrpce kvantificirane programom Kodak 1D Image analysis.

4.4. ODREĐIVANJE KOMPONENTI ANTIOKSIDATIVNOG ODGOVORA

Listovi smokve su usitnjeni do finog praha u porculanskom tarioniku u tekućem dušiku uz dodatak polivinilpirolidona (PVP). PVP veže polifenole koji bi mogli smetali prilikom mjerenja aktivnosti enzima. Izuzetak je bila priprema ekstrakta za određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije kada PVP nije dodavan. Usitnjeno tkivo je prebačeno u prethodno izvaganu tubicu te mu je određena točna masa. Masa svježe tvari potrebna za dobivanje sirovog ekstrakta je oko 0,2 g. Izuzetak je tkivo potrebno za mjerenje aktivnosti gvajakol peroksidaza za koje je odvagano oko 0,5 g svježe tvari.

4.4.1. Mjerenje koncentracije produkata lipidne peroksidacije

Koncentracija produkata lipidne peroksidacije je određena kao količina supstanci koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (engl. *thiobarbituric acid reactive substances* –TBARS) metodom po Verma i Dubey (2003). Pripremljeno tkivo je ekstrahirano s 1 mL 0,1% trikloroetene kiseline (TCA). Nakon centrifugiranja na 4°C pri 6000 g tijekom 5 min, u 0,5 mL supernatanta dodano je 1 mL 0,5%-tne tiobarbiturne kiseline (TBA) u 20%-tnoj TCA. Tako dobivena smjesa je zagrijavana 30 min u termobloku na 95°C te je nakon toga ohlađena na ledu i centrifugirana pri 18000 g tijekom 15 min na 4°C. Dobiveni supernatant korišten je za spektrofotometrijsko mjerenje (Analytik Jena Specord 40) očitavanjem apsorbancije pri valnim duljinama od 532 i 600 nm. Kao slijepa proba korištena je 0,5% TBA u 20% TCA. Za pripremu svih otopina korištena je destilirana voda. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije izračunata je korištenjem molarnog ekstincijskog faktora $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ te izražena kao $\text{nM g}^{-1} \text{ Sv.T.}$

4.4.2. Mjerenje koncentracije proteinskih karbonila

Za utvrđivanje količine oštećenja proteina korištena je metoda po Levine i suradnicima (1994), a određuje se kao sadržaj karbonilnih skupina u proteinskom uzorku. Karbonilne skupine proteinskog lanca reagiraju s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) otopljenim u HCl-u, te daju 2,4-dinitrofenilhidrazon. Na pripremljeno tkivo dodano je 1 mL pufera (pH 7,5) koji je sadržavao 0,1M KH_2PO_4 , 0,1M K_2HPO_4 i 1mM EDTA. Nakon 15 minuta ekstrakcije na ledu, uzorci su centrifugirani na 4°C pri 18000 g tijekom 20 minuta. U tubicu je odpipetirano 200 μL

uzorka te dodano 300 μ L 10mM DNPH u 2M HCl. Kao slijepa proba korišten je alikvot istog uzorka (200 μ L) te dodano 300 μ L 2M HCl. Tako pripremljeni uzorci i slijepa probe su inkubirani na sobnoj temperaturi tijekom jednog sata uz povremeno miješanje. Proteini su precipitirani sa 10% (W/V) TCA na -20 $^{\circ}$ C tijekom 5 minuta te nakon toga centrifugirani na 4 $^{\circ}$ C pri 12000 g 10 minuta. Supernatant je bačen, a precipitat resuspendiran u mješavini etanola i etil acetata u omjeru 1:1 i centrifugiran pri istim uvjetima. Postupak ispiranja peleta je ponovljen sve dok se sav nevezani DNPH nije isprao. Nakon toga, precipitat je otopljen u 6M urei u ultrasoničnoj kupelji (Bielin Sonorex digitec) na 35 $^{\circ}$ C. Dobivena otopina je korištena za mjerenje apsorbancije na 370 nm. Koncentracija proteina je određena iz slijepih proba i to tako da je 100 μ L otopljeno u 900 μ L 6M uree te je izmjerena apsorbancija na 280 nm. Koncentracija proteina izračunata je na temelju baždarne krivulje koja je napravljena s poznatim koncentracijama BSA, a izražena je kao mg mL⁻¹ te je ista korištena za izračun količine proteinskih karbonila. Koncentracija proteinskih karbonilnih skupina je izračunata korištenjem molarnog ekstincijskog faktora 0,022 μ M⁻¹cm⁻¹. Prikazana je kao omjer količine karbonila i koncentracije proteina te izražena kao nmol mg⁻¹ prot.

4.4.3. Određivanje aktivnosti katalaze

Nakon što je određena točna masa, na tkivo je dodan pufer za ekstrakciju. Tkivo je ekstrahirano tijekom 10 min na ledu te centrifugirano 10 min pri 18000 g na 4 $^{\circ}$ C. Supernatant je odvojen mikropipetom u čistu tubicu, a na preostali talog je dodan još 1 ml istog ekstrakcijskog pufera te je ponovljen postupak ekstrakcije. Spojeni supernatanti korišteni su kao sirovi ekstrakt za određivanje aktivnosti svih enzima.

Ukupna aktivnost katalaze (CAT) određena je metodom prema Aebi (1984). Korišten je ekstrakcijski pufer (pH 7,5) koji je sadržavao 0,1M KH₂PO₄, 0,1M K₂HPO₄ i 1mM EDTA. Reakcijska smjesa (pH 7,0) je sadržavala 0,05 mM KH₂PO₄, 0,05 mM K₂HPO₄ te 0,01 mM H₂O₂. Reakcija je započeta dodatkom sirovog ekstrakta u reakcijsku smjesu (ukupni volumen 2 mL) u kivetu od kvarcnog stakla. Praćeno je sniženje apsorbancije svakih deset sekundi tijekom dvije minute pri valnoj duljini od 240 nm. Ukupna aktivnost enzima katalaze je izražena kao promjena apsorbancije po minuti po gramu svježeg tkiva.

4.4.4. Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze

Ukupna aktivnost askorbat peroksidaze (APX) određuje se prema Nakano i Asada (1981). Korišten je ekstrakcijski pufer (pH 7,0) koji je sadržavao 0,1M KH_2PO_4 , 0,1M K_2HPO_4 , 5mM Na-askorbat i 1 mM EDTA. Reakcijska smjesa (pH 7,0) sadržavala je 0,05M KH_2PO_4 , 0,05M K_2HPO_4 , 0,1mM EDTA, 50mM askorbinsku kiselinu i 12mM H_2O_2 . U kivetu od kvarcnog stakla dodano je 50mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0) sa 0,1mM EDTA, 50mM askorbinske kiseline, sirovog ekstrakta proteina te 30% H_2O_2 čijim je dodatkom započela reakcija (ukupni volumen 1 mL). Smanjenje apsorbancije praćeno je pri valnoj duljini od 290 nm svake sekunde tijekom jedne minute. Ukupna aktivnost enzima APX izražena je kao promjena apsorbancije u minuti po gramu svježeg tkiva.

4.4.5. Određivanje aktivnosti gvajakol peroksidaze

Ukupna aktivnost enzima gvajakol peroksidaze (GPOD) određena je prema Siegel i Galston (1967). Kao ekstrakcijski pufer korišten je 0.1M Tris/HCl pufer (pH 8,0). Reakcijska smjesa (pH 5,8) sadržavala je 5mM gvajakola, 0,2M KH_2PO_4 , 0,2M $\text{Na}_2\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ te 5mM H_2O_2 koji je dodan neposredno prije mjerenja. Na 800 μL reakcijske smjese dodano je 200 μL ekstrakta proteina, a povećanje apsorbancije je mjereno pri valnoj duljini od 470 nm svake sekunde tijekom dvije minute. Ukupna aktivnost enzima GPOD izražena je kao promjena apsorbancije u minuti po gramu svježeg tkiva.

4.4.6. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze

Ukupna aktivnost enzima glutation reduktaze određena je prema Dolphin i suradnicima (1989). Korišten je ekstrakcijski pufer (pH 7,0) koji je sadržavao 0,1M KH_2PO_4 , 0,1M K_2HPO_4 , 5mM Na-askorbat i 1 mM EDTA. Reakcijska smjesa (pH 7,5) sadržavala je 0,1M KH_2PO_4 , 0,1M K_2HPO_4 , 1mM EDTA, 2mM NADPH i 2mM GSSG. U kivetu od kvarcnog stakla dodano je 500 μL 2mM GSSG, 440 μL 100mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,5) koji je sadržavao 1mM EDTA, 10 μL sirovog ekstrakta proteina te 50 μL 2mM NADPH. Smanjenje apsorbancije praćeno je pri valnoj duljini od 340 nm svake sekunde tijekom jedne minute. Ukupna aktivnost enzima glutation reduktaze izražena je kao promjena apsorbancije u minuti po gramu svježeg tkiva.

4.4.7. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) određena je prema Gianopolitis i Ries (1977). Korišten je ekstrakcijski pufer (pH 7,5) koji je sadržavao 0,1M KH_2PO_4 , 0,1M K_2HPO_4 i 1mM EDTA. Reakcijska smjesa (pH 7,5) sadržavala je 0,05 mM KH_2PO_4 , 0,05 mM K_2HPO_4 , 13mM metionin, 75 μM NBT, 0,1mM EDTA i 2 μM riboflavin koji je dodan neposredno prije mjerenja. U plastične kivete dodana je reakcijska smjesa, ekstrakcijski pufer i riboflavin. Ta je smjesa je stavljena pod neonsku lampu (35W) koja daje osvjetljenje od 120 $\mu\text{mol}_{\text{FOTON}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ koja je potaknula reakciju redukcije NBT-a (engl. *nitroblue tetrazolium*). Nakon 10 min na svjetlu, reakcija je prekinuta te je takva smjesa korištena za mjerenje maksimalne apsorbancije (A_{max}) nastalog formazana na 560 nm. Za mjerenje apsorbancije uzorcima, umjesto ekstrakcijskog pufera dodan je razrijeđeni uzorak, a mjerenje je vršeno na isti način. Jedna jedinica enzima SOD je definirana kao količina enzima potrebna da izazove 50% inhibiciju redukcije NBT-a. Ukupan broj jedinica enzima SOD je izražena kao količina jedinica po gramu svježe tvari, a specifična količina jedinica kao kvocijent ukupnih jedinica i koncentracije proteina te izražena kao U mg^{-1} svježe tvari (engl. *unit* – U). Za jedinicu je određen onaj uzorak razvijenih listova koji je u svakom od tri dijela istraživanja predstavljao kontrolu.

4.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Svi podaci statistički su obrađeni u programu StatSoft Inc. STATISTICA, verzija 8.0 (2007). Korištene su sljedeće statističke metode: Studentov t-test za male uzorke, analiza varijance (engl. *analysis of variance* – ANOVA), *post hoc* statistički test značajnosti utjecaja primijenjenih tretmana – LSD (engl. *least significant difference*). Rezultati analize varijance i LSD testa su prikazani slovima (različita slova znače statistički značajnu razliku). Rezultati Studentovog t-testa su prikazani zvjezdicom (*) u slučaju postojanja statističke razlike, odnosno slovima NS u slučaju da statističke razlike nije bilo. Razina značajnosti je određena na 0,05 ($p \leq 0,05$). Za statističku obradu, podaci dobiveni ponavljanjima skupljeni su u jednu skupinu te su kao takvi podvrgnuti statističkoj obradi.

Za usporedbu podatka u sva tri dijela istraživanja dobivene mjerenjem polifaznog porasta fluorescencije klorofila *a* korištena je ANOVA i LSD *post hoc* test. Podaci mjerenja na mladim i razvijenim listovima obrađeni su zasebno.

Koncentracije fotosintetskih pigmenata tijekom praćenja dnevnih promjena te nakon tretmana inhibitorima nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila *a* korištena je ANOVA i LSD *post hoc* test. Podaci mjerenja na mladim i razvijenim listovima obrađeni su zasebno.

Rezultati mjerenja fluorescencije klorofila *a* metodom saturacijskog pulsa tijekom dnevnih promjena, nakon tretmana u kontroliranim uvjetima te nakon tretmana inhibitorima nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila *a* korištena je ANOVA i LSD *post hoc* test za međusobnu usporedbu mladih i razvijenih listova.

Aktivnosti antioksidativnih enzima te koncentracije produkata lipidne peroksidacije i proteinskih karbonila tijekom dnevnih promjena (u 7 i 13h) uspoređene su Studentovim t-testom. Za podatke dobivene mjerenjem nakon tretmana inhibitorima nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila *a* korištena je ANOVA i LSD *post hoc*. Podaci mjerenja na mladim i razvijenim listovima obrađeni su zasebno.

Aktivnosti antioksidativnih enzima, koncentracije produkata lipidne peroksidacije i proteinskih karbonila te koncentracije fotosintetskih pigmenata dobivene mjerenjem listova na tretmanima u kontroliranim uvjetima pokazali su nehomolognost varijanci te kao takvi nisu mogli biti statistički obrađeni. Iz tog razloga, izvorni podaci su logaritmirani te je analiza varijance izvedena na osnovi transformiranih podataka (Horvat i Ivezić 2005). Podaci mjerenja na mladim i razvijenim listovima obrađeni su zasebno.

5. REZULTATI

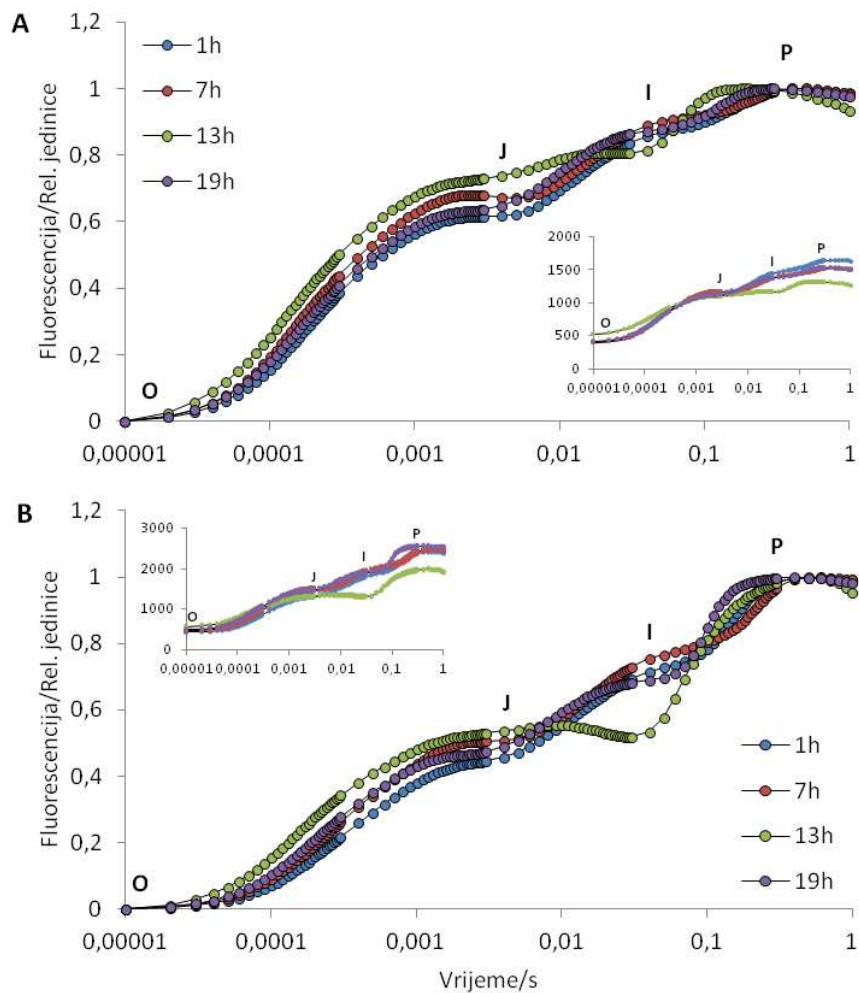
5.1. DNEVNE PROMJENE FOTOSINTETSKE UČINKOVITOSTI I ANTIOKSIDATIVNOG ODGOVORA

5.1.1. OJIP porast fluorescencije klorofila *a*

Slika 14 prikazuje OJIP krivulje intenziteta fluorescencije na logaritamskoj vremenskoj skali mladih i razvijenih listova smokve, sorte Zamorčica, mjerenih svakih 6 sati tijekom 24 sata.

Mladi listovi (Slika 14 A) mjereni u 1h pokazali su tipičan oblik normalizirane OJIP krivulje, dok su listovi mjereni u 13h najviše odstupali od tipičnog oblika. Korak J mjereno u 13h je pokazao najviše vrijednosti, dok je korak I pokazao najniže vrijednosti u usporedbi s vrijednostima krivulje izmjerene u 1h. Krivulja mjerena na mladim listovima u 7h pokazala je nešto više vrijednosti u J koraku u odnosu na krivulju listova izmjerenu u 1h. Razvijeni listovi (Slika 14 B) su pokazali tipičan oblik OJIP krivulje mjereno u 1h i 19h, dok su u 13h, kao i mladi listovi najviše odstupali od tog tipičnog oblika. Korak J krivulje mjerene u 13h je pokazao najviše vrijednosti, dok je korak I pokazao najniže vrijednosti. Sva odstupanja od tipičnog oblika OJIP krivulje su bila izraženija kod razvijenih listova što je vidljivo iz native krivulje na umetnutom grafu slike 14 B.

Normalizirane i native OJIP krivulje intenziteta fluorescencije klorofila *a* na logaritamskoj vremenskoj skali mjerena na mladim i razvijenim listovima smokve, sorte Fico della Madonna prikazuje Slika 35 u Prilogu.



Slika 14. Normalizirani OJIP porast fluorescencije klorofila a izmjeren tijekom dnevnog ciklusa na mladim (**A**) i razvijenim (**B**) listovima smokve sorte Zamorčica. Umetnuti grafovi prikazuju native OJIP krivulje. Promjene intenziteta fluorescencije prikazana je na logaritamskoj vremenskoj skali.

5.1.2. Parametri OJIP porasta fluorescencije klorofila a

Parametri OJIP porasta fluorescencije klorofila a prikazani su u Tablici 3. Intenzitet fluorescencije na O stupnju mjereno u 1h iznosio je 365,82 kod mladih listova, odnosno 398,73 kod razvijenih listova. Kod oba tipa listova intenzitet fluorescencije je značajno porastao u 13h. Vrijednost se kod mladih listova povećala na 543,36, dok je kod razvijenih listova ta vrijednost bila samo malo viša, 553,50. Maksimalni intenzitet fluorescencije na stupnju P se značajno smanjio u 13h kod oba tipa, no to je smanjenje bilo jače kod mladih listova (oko 23% kod mladih u odnosu na 18% kod razvijenih). Vrijednost se sa 1641,98 spustila na 1260,09 kod mladih listova, odnosno, sa 2416,06 na 1978,90 kod razvijenih listova.

Mladi listovi pokazali su značajan porast varijabilne fluorescencije na J stupnju u 7h (0,69) i 13h (0,73) u odnosu na vrijednost izmjerenu u 1h (0,62). Varijabilna fluorescencija na I stupnju značajno je porasla u 7h (0,87) i 19h (0,87) u odnosu na početnu vrijednost izmjerenu u 1h (0,84), dok je u 13h (0,81) bio izmjereno značajan pad (oko 5%). Vrijeme koje je potrebno da se postigne maksimalna vrijednost fluorescencije, t_{max} , pokazalo je značajan pad za oko 50% već u 13h i ostao je na toj razini i u 19h. Normalizirana komplementarna površina iznad OJIP krivulje (S_m) daje mjeru energije koja je potrebna da se zatvore sva reakcijska središta. Vrijednost je značajno pala u 7h (21,25) i 13h (15,17) u odnosu na početnu vrijednost (24,79), dok je vrijednost lagano, ali značajno porasla u 19h (18,43) u odnosu na vrijednost izmjerenu u 13h. Na isti način su se mijenjale i vrijednosti prometnog broja N, odnosno, mjera redukcije i oksidacije Q_A . Srednja vrijednost izmjerena u 1h je iznosila 63,80. U 7h je došlo do značajnog pada na 56,01, u 13h na 42,44 da bi se nakon toga vrijednost lagano povećala na 48,26. Ukupna brzina zatvaranja reakcijskih središta, odnosno M_0 parametar značajno je porastao u 7h (1,81) i 13h (2,05), dok se u 19h vrijednost spustila na razinu one izmjerene u 1h (1,67).

Razvijeni listovi su pokazali sličan porast varijabilne fluorescencije na J koraku, bez razlike u intenzitetu izmjerenu u 7h (0,51) i 13h (0,52), dok je I korak pokazao značajan pad za gotovo 30% u 13h; s vrijednosti 0,70 pala je na 0,51. Parametar t_{max} pokazao je značajan pad tek u 19h za otprilike 40%. Mjera energije potrebna za zatvaranje svih reakcijskih središta, odnosno vrijednosti parametra S_m izmjerena u 7h (50,61) i 13h (55,18) su porasle u odnosu na 1h (46,40), no ne razlikuju se značajno. U 19h, vrijednost S_m parametra iznosila je 35,45 i nije se razlikovala od vrijednosti izmjerene u 1h, no značajno je niža nego u 7h i 13h. Slično kao i kod mladih listova, ukupna brzina zatvaranja reakcijskih središta, odnosno M_0 parametar značajno je porastao u 7h (1,12) i 13h (1,40) u odnosu na 0,94, vrijednost

izmjerenu u 1h, vrijednost izmjerena u 19h (1,18) se spustila na razinu one izmjerene u 7h. Prometni broj N pokazuje značajno povećanje vrijednosti od 60% u 13h.

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara OJIP testa tijekom dnevnog ciklusa za smokvu sorte Fico della Madonna prikazani su u Tablici 6 u Prilogu.

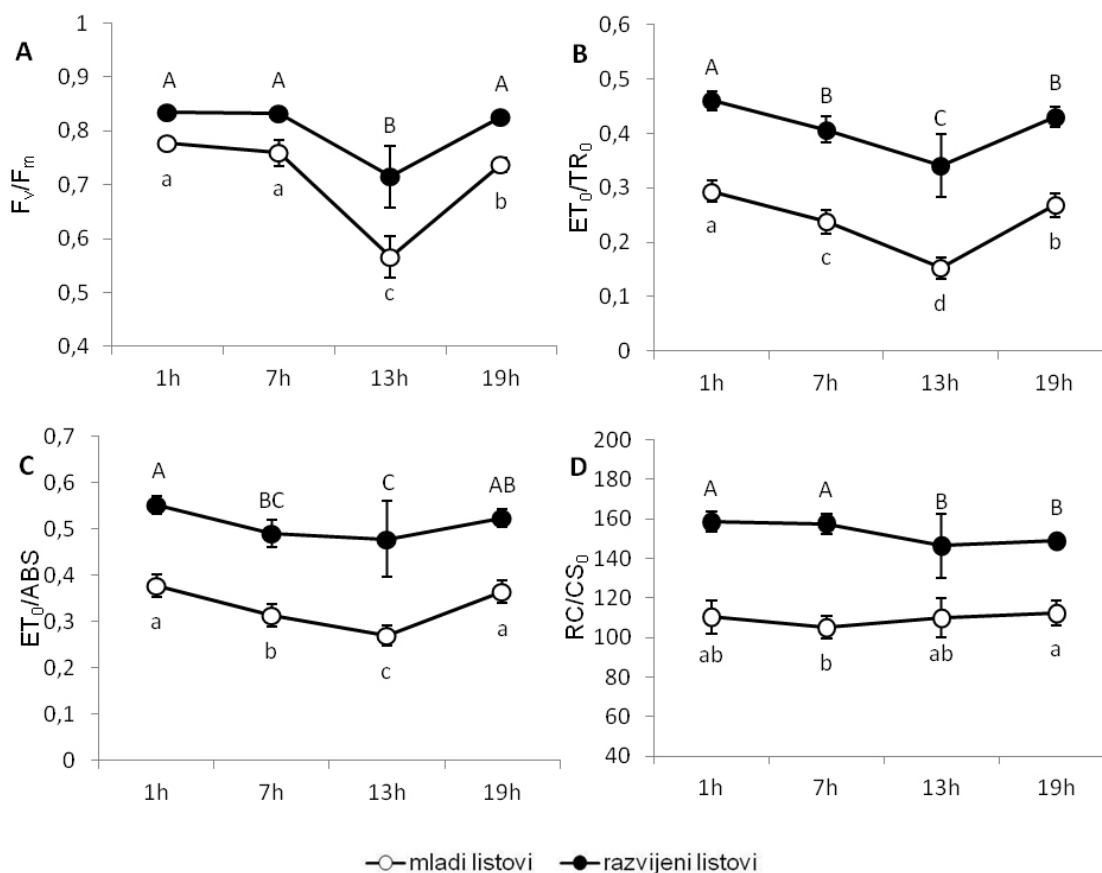
Tablica 3. Srednje vrijednosti i standardne devijacije OJIP parametara (F_0 , F_m , V_J , V_I , t_{max} , S_m , N) izmjerenih tijekom dnevnog ciklusa na i mladim (M) i razvijenim (R) listovima smokve sorte Zamorčica. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c, d) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu, $p < 0,05$. Vrijednosti OJIP parametara prikazane su u relativnim jedinicama.

Parametar		1h	7h	13h	19h
F_0	M	365,820 ±30,189 c	364,244 ±17,730 c	543,364 ±33,137 a	400,305 ±32,094 b
	R	398,725 ±14,172 c	413,645 ±24,484 c	553,500 ±54,917 a	444,295 ±18,706 b
F_m	M	1641,948 ±151,059 a	1523,280 ±122,850 a	1260,091 ±126,036 b	1523,765 ±121,760 a
	R	2416,057 ±123,790 a	2460,309 ±192,590 a	1978,900 ±207,416 b	2543,557 ±144,158 a
V_J	M	0,623 ±0,023 c	0,687 ±0,024 b	0,731 ±0,021 a	0,637 ±0,025 c
	R	0,448 ±0,019 c	0,510 ±0,029 ab	0,522 ±0,081 a	0,478 ±0,019 bc
V_I	M	0,841 ±0,014 b	0,868 ±0,009 a	0,805 ±0,027 c	0,866 ±0,020 a
	R	0,701 ±0,017 a	0,736 ±0,022 a	0,509 ±0,114 b	0,690 ±0,016 a
t_{max}	M	357,578 ±53,936 a	357,578 ±53,936 a	182,727 ±14,206 b	191,516 ±8,481 b
	R	503,476 ±63,090 a	493,516 ±74,606 a	550,000 ±171,594 a	305,201 ±56,162 b
S_m	M	24,791 ±1,523 a	21,248 ±1,410 b	15,169 ±1,356 d	18,433 ±1,520 c
	R	46,398 ±4,422 ab	50,608 ±6,990 a	55,183 ±27,170 a	35,446 ±2,557 b
N	M	63,801 ±4,455 a	56,014 ±4,522 b	42,437 ±3,296 d	48,260 ±3,061 c
	R	97,334 ±8,934 b	109,772 ±9,830 b	155,494 ±93,460 a	87,188 ±4,282 b

5.1.3. Učinkovitost PSII

Srednje vrijednosti i standardne devijacije te analizu varijance maksimalnog kvantnog prinosa fluorescencije, F_v/F_m , prikazuje Slika 15 A. I mladi i razvijeni listovi pokazali su slično ponašanje ovog parametra, odnosno značajan pad vrijednosti u 13h. I kod mladih i razvijenih listova najviše vrijednosti su izmjerene u 1h te su iznosili 0,78 kod mladih listova, odnosno 0,84 kod razvijenih. Vrijednosti izmjerene u 13h su pale na 0,57 kod mladih listova, odnosno 0,72 kod odraslih. Razvijeni listovi u 19h pokazali su oporavak vrijednosti na 0,83, dok su mladi listovi pokazali porast (0,74) u odnosu na 13h, no još uvijek je ta vrijednost bila značajno niža nego u 1h i 7h. Kvantni prinos elektronskog transporta (ET_0/ABS , Slika 15 C) mladih listova pokazao je značajno smanjenje vrijednosti već u 7h, dok je u 13h vrijednost bila najniža (0,15) u odnosu na vrijednosti izmjerene noću (0,29). Slično tome, razvijeni listovi su također pokazali najniže vrijednosti u 13h (0,34) u odnosu na 1h (0,46). Učinkovitost kojom „uhvaćeni“ eksciton omogućava prijenos elektrona u transportnom lancu dalje od Q_A (ET_0/TR_0 , Slika 15 B) pokazao je značajno smanjenje vrijednosti kod oba tipa listova u 13h (0,21 kod mladih, odnosno 0,48 kod razvijenih listova) u odnosu na vrijednosti koje su bile izmjerene u 1h (0,38, odnosno, 0,55). Razvijeni listovi pokazali su značajno smanjenje gustoće aktivnih reakcijskih središta (RC/CS_0 , Slika 15 D) u 13h (146,36) i 19h (148,74) u odnosu na 1h (158,56), dok se kod mladih listova gotovo ne mijenja tijekom dana u odnosu na početnu vrijednost izmjerenu u 1h (110,44).

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara F_v/F_m , ET_0/ABS , ET_0/TR_0 i RC/CS_0 za sortu Fico della Madonna prikazane su u Tablici 7 u Prilogu.



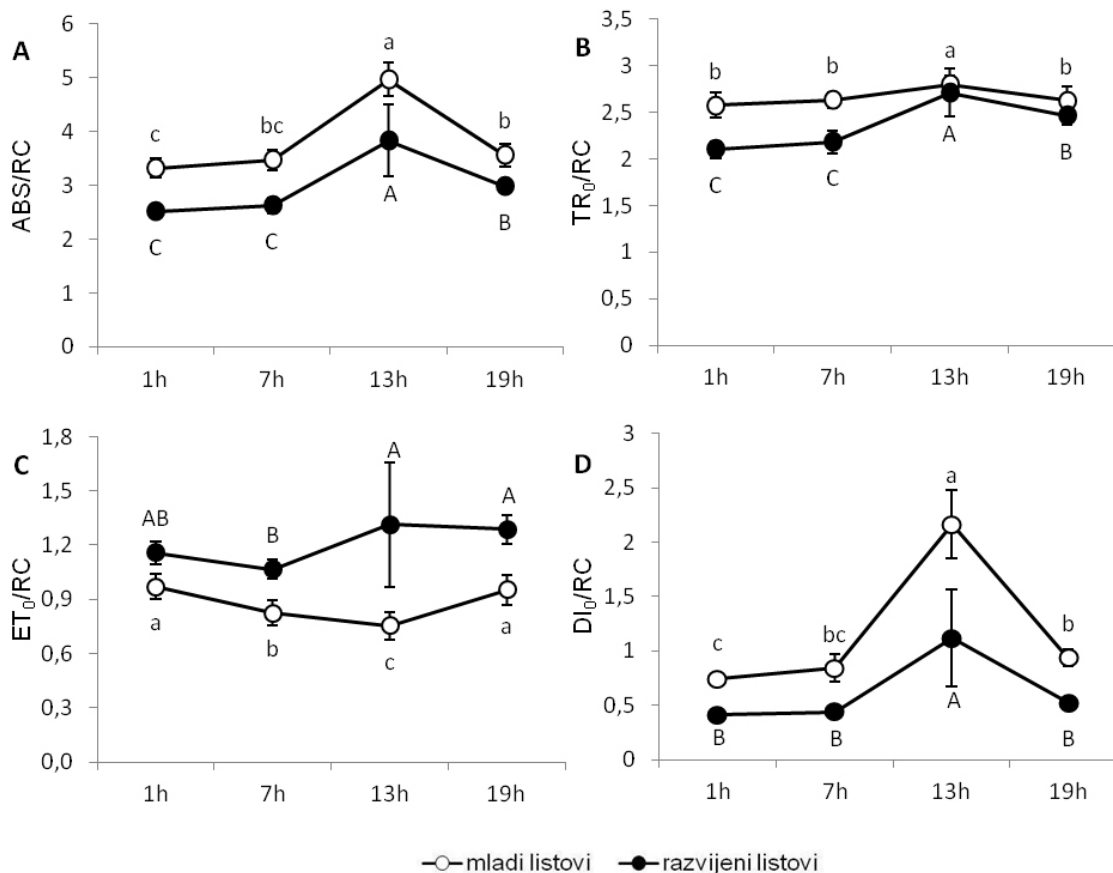
Slika 15. Srednje vrijednosti i standardne devijacije maksimalnog kvantnog prinosa fluorescencije (F_v/F_m ; **A**), kvantnog prinosa elektronskog transporta (ET_0/ABS ; **B**), učinkovitosti kojom „uhvaćeni“ eksciton omogućava prijenos elektrona u transportnom lancu dalje od Q_A (ET_0/TR_0 ; **C**), te gustoće aktivnih reakcijskih središta (RC/CS_0 ; **D**) izmjerene tijekom dnevnog ciklusa na mladim (○) i razvijeni (●) listovima smokve sorte Zamorčica. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c, d; A, B, C) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $p < 0,05$. Vrijednosti parametara prikazane su u relativnim jedinicama.

5.1.4. Prijenos energije po aktivnom reakcijskom središtu

Izračuni specifičnih protoka energije daju nam informacije o raspodjeli energije kroz PSII po aktivnom reakcijskom središtu. Slika 16 prikazuje srednje vrijednosti i standardne devijacije te analizu varijance dnevnih promjena specifičnih protoka energije: apsorpcije (ABS/RC, Slika 16 A), protok uhvaćenih fotona (TR_0/RC , Slika 16 B), elektronskog transporta (ET_0/RC ; Slika 16 C) i rasipanja (DI_0/RC ; Slika 16 D), izmjenjenih na mladim i razvijenim listovima tijekom 24 sata. Mladi listovi su pokazali blagi porast apsorpcije (3,48) i disipacije (0,84) po aktivnom reakcijskom središtu u 7h u odnosu na vrijednost izmjerenu u 1h (3,32 za ABS/RC, odnosno, 0,74 za DI_0/RC). Također, za vrijeme najvećeg osvjetljenja, u 13h, pokazali su značajni porast obje vrijednosti (4,97 za ABS/RC, odnosno, 2,17 za DI_0/RC) koja se nakon toga smanjila na razinu izmjerenu u 7h. Vrijednost protoka uhvaćenih fotona po aktivnom reakcijskom središtu je značajno porasla u 13h (2,80) u odnosu na početnu vrijednosti (2,58) koja se nije značajno razlikovala od vrijednosti izmjenjenih u 7 i 19h. Elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu pokazao je značajni pad vrijednosti već u 7h (0,84), odnosno, intenzivniji pad vrijednosti u 13h (0,76). Vrijednost ET_0/RC se u 19h vratila na početnu vrijednost (0,95) izmjerenu u 1h (0,97).

Od početnih vrijednosti izmjenjenih u 1h, apsorpcija (2,52), rasipanje (0,42) i protok uhvaćenih fotona (2,10) po aktivnom reakcijskom središtu, razvijeni listovi su pokazali značajni porast vrijednosti u 13h (3,83 za ABS/RC, 1,12 za DI_0/RC , te 2,71 za TR_0/RC). Vrijednosti sva tri parametra su se značajno smanjile u 19h u odnosu na vrijednosti koje su postigle za vrijeme najjačeg osvjetljenja (2,99 za ABS/RC, 0,52 za DI_0/RC , te 2,47 za TR_0/RC). Elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu je, za razliku od mladih listova, pokazao blagi porast u 13 h (2,71) u odnosu na početnu vrijednost izmjerenu u 1h (2,10).

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara ABS/RC, DI_0/RC , ET_0/RC i TR_0/RC za sortu Fico della Madonna prikazane su u Tablici 8 u Prilogu.



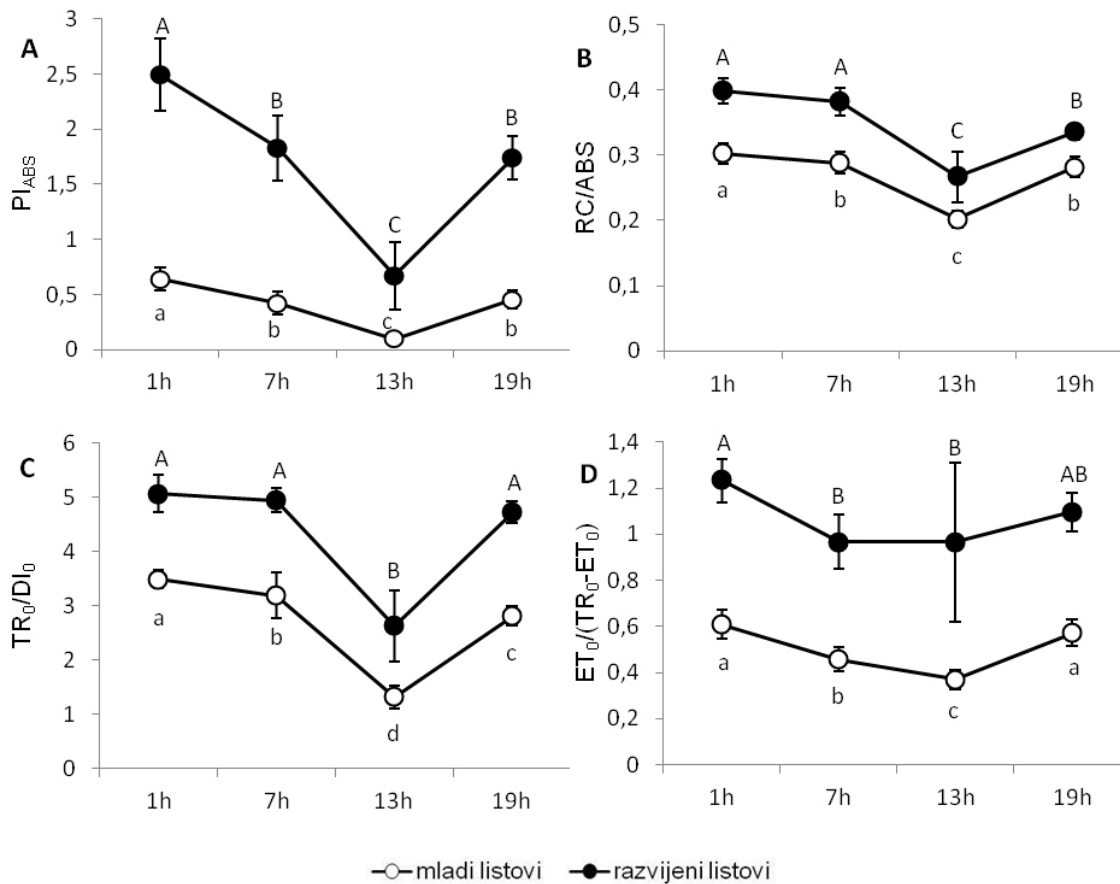
Slika 16. Srednje vrijednosti i standardne devijacije specifičnih protoka energije po reakcijskom središtu: apsorpcije (ABS/RC; **A**), protoka uhvaćenih fotona (TR₀/RC; **B**), elektronskog transporta (ET₀/RC; **C**) i rasipanja (DI₀/RC; **D**) izmjerene tijekom dnevnog ciklusa na mladim (○) i razvijanim (●) listovima smokve sorte Zamorčica. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c; A, B, C) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $p < 0,05$. Vrijednosti parametara prikazane su u relativnim jedinicama.

5.1.5. Indeks fotosintetske učinkovitosti

Analizu varijance, srednje vrijednosti i standardne devijacije indeksa fotosintetske učinkovitosti (Slika 17 A) i tri parametra koja ga čine RC/ABS (Slika 17 B), TR_0/DI_0 (Slika 17 C) i $ET_0/(TR_0-ET_0)$ (Slika 17 D), mjerenih tijekom 24h prikazuje Slika 16. Mladi listovi pokazali su značajno smanjenje svih parametara već u 7h (0,29 za RC/ABS, 3,19 za TR_0/DI_0 te 0,46 za $ET_0/(TR_0-ET_0)$) u odnosu na vrijednosti izmjerene u 1h (0,30 za RC/ABS, 3,49 za TR_0/DI_0 te 0,61 za $ET_0/(TR_0-ET_0)$). Vrijednosti su se dodatno smanjile u 13h (0,20 za RC/ABS, 1,32 za TR_0/DI_0 te 0,37 za $ET_0/(TR_0-ET_0)$), nakon čega je uslijedio oporavak (0,28 za RC/ABS, 2,81 za TR_0/DI_0 te 0,57 za $ET_0/(TR_0-ET_0)$).

Razvijeni listovi pokazali su značajno smanjenje u parametrima RC/ABS (0,27) i TR_0/DI_0 (2,63) tek u 13h. Vrijednosti izmjerene u 1h iznosile su 0,40 za RC/ABS, odnosno 5,07 za TR_0/DI_0 . Stopa elektronskog transporta dalje od primarnog akceptora izmjeren u 1h iznosila je 1,23 te se nakon toga značajno smanjuje već u 7h (0,97) i na toj razini ostaje tijekom čitavog dana. Indeks fotosintetske učinkovitosti pokazuje je slično ponašanje kod oba tipa listova, no mladi listovi pokazali su gotovo 85%-tno smanjenje (0,10) u odnosu na početnu vrijednost (0,64), dok su razvijeni listovi pokazali oko 70% smanjenja (2,49) u odnosu na vrijednost izmjerenu u 1h (0,67).

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara PI_{ABS} , RC/ABS, TR_0/DI_0 i $ET_0/(TR_0-ET_0)$ za sortu Fico della Madonna prikazane su u Tablici 9 u Prilogu.



Slika 17. Srednje vrijednosti i standardne devijacije indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}; **A**) omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta i antena (RC/ABS; **B**), omjer protoka uhvaćenih fotona i disipacije energije (TR₀/DI₀; **C**) te transport elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A (ET₀/(TR₀-ET₀); **D**) izmjerene tijekom dnevnog ciklusa ma mladim (○) i razvijenim (●) listovima smokve sorte Zamorčica. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c, d; A, B, C) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), p<0,05. Vrijednosti parametara prikazane su u relativnim jedinicama.

5.1.6. Fluorescencija klorofila a metodom saturacijskog pulsa

Srednje vrijednosti i standardne devijacije mjerenja efektivnog kvantnog prinosa fotosinteze ($\Delta F/F_m'$), relativne stope elektronskog transporta (relETR) i nefotokemijskog gašenja (NPQ) mjerene metodom saturacijskog pulsa prikazani su u Tablici 4. Mladi listovi su pokazali značajno niže vrijednosti $\Delta F/F_m'$ mjerene u 13h (0,58) na $50 \mu\text{mola}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ u odnosu na vrijednosti izmjerene u 7h (0,70). Razvijeni listovi nisu pokazali značajnu razliku u odnosu na mlade listove izmjerene u 7h kao ni između mjerenja u 7h (0,75) i 13h (0,72). Na intenzitetima od 250 i $800 \mu\text{mola}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mladi su listovi pokazali značajno niže vrijednosti u odnosu na razvijene listove, no mjerenjem u 7h i 13h, ni mladi ni razvijeni listovi nisu pokazali značajnu razliku. Relativna stopa elektronskog transporta pokazala je značajno niže vrijednosti kod mladih listova u 13h (14,40) na $50 \mu\text{mola}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ u odnosu na vrijednosti izmjerene u 7h (17,58). Razvijeni listovi nisu pokazali značajnu razliku u odnosu na mlade listove izmjerene u 7h kao ni između mjerenja u 7h (18,73) i 13h (17,95). Mladi listovi pokazali su značajno smanjenje nefotokemijskog gašenja fluorescencije u 13h s 0,16 na 0 pri $50 \mu\text{mola}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Razvijeni listovi na tom svjetlosnom koraku nisu pokazali značajno drugačije vrijednosti od onih izmjerenih kod mladih listova u 7h, te se nisu značajno mijenjale u 13h (pad s 0,16 na 0,14). Pri $250 \mu\text{mola}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mladi su listovi pokazali značajan pad vrijednosti u 13h s 1,41 na 0,69. Razvijeni listovi nisu pokazali promjenu u 13h (0,18) u odnosu na 7h (0,22), no te su vrijednosti bile značajno niže od onih izmjerenim na mladim listovima. Pri $800 \mu\text{mola}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ razvijeni su listovi pokazali značajno smanjenje nefotokemijskog gašenja sa 0,93 na 0,51 i te su vrijednosti bile značajno niže u odnosu na mlade listove, koji pak nisu pokazali značajnu promjenu NPQ vrijednosti 13h (2,29) u odnosu na 7h (2,34).

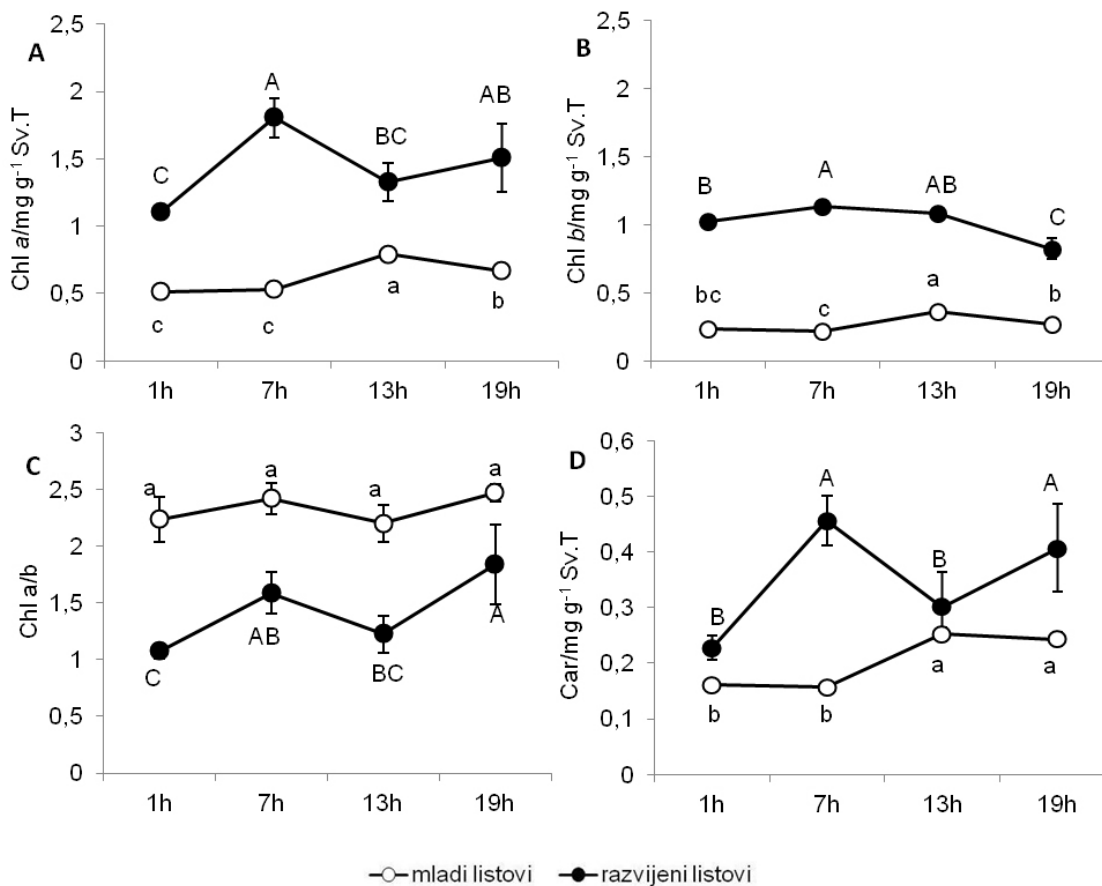
Tablica 4 Srednje vrijednosti i standardne devijacije efektivnog kvantnog prinosa fotosinteze ($\Delta F_v/F_m'$), relativna stopa elektronskog transporta (relETR), te nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ) izmjerene u 7 i 13h na mladim (M) i razvijenim (R) listovima smokve sorte Zamorčica. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $p < 0,05$. Vrijednosti parametara prikazane su u relativnim jedinicama.

Parametar	PPFD		7h	13h
$\Delta F_v/F_m'$	50	M	0,703 $\pm 0,052$ a	0,576 $\pm 0,037$ b
		R	0,749 $\pm 0,016$ a	0,718 $\pm 0,010$ a
	250	M	0,417 $\pm 0,091$ b	0,492 $\pm 0,005$ b
		R	0,685 $\pm 0,030$ a	0,661 $\pm 0,019$ a
	800	M	0,243 $\pm 0,032$ b	0,286 $\pm 0,049$ b
		R	0,499 $\pm 0,040$ a	0,449 $\pm 0,100$ a
relETR	50	M	17,583 $\pm 1,311$ a	14,400 $\pm 0,919$ b
		R	18,725 $\pm 0,390$ a	17,950 $\pm 0,250$ a
	250	M	52,125 $\pm 11,435$ b	61,458 $\pm 0,629$ b
		R	85,667 $\pm 3,744$ a	82,667 $\pm 2,376$ a
	800	M	97,333 $\pm 12,752$ b	114,533 $\pm 19,687$ b
		R	199,600 $\pm 16,060$ a	179,733 $\pm 39,985$ a
NPQ	50	M	0,164 $\pm 0,035$ a	0,000 $\pm 0,000$ b
		R	0,156 $\pm 0,046$ a	0,114 $\pm 0,010$ a
	250	M	1,408 $\pm 0,330$ a	0,696 $\pm 0,166$ b
		R	0,221 $\pm 0,030$ c	0,178 $\pm 0,027$ c
	800	M	2,341 $\pm 0,278$ a	2,288 $\pm 0,159$ a
		R	0,932 $\pm 0,214$ b	0,507 $\pm 0,113$ c

5.1.7. Koncentracija fotosintetskih pigmenata

Analiza varijance, srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracija fotosintetskih pigmenata, Chl *a* (Slika 18 A), Chl *b* (Slika 18 B), Chl *a/b* (Slika 18 C) i Car (Slika 18 D) prikazani su na Slici 18. Mladi listovi pokazali su značajan porast koncentracija klorofila *a* (0,79 mg g⁻¹ Sv.T), klorofila *b* (0,36 mg g⁻¹ Sv.T) i karotenoida (0,25 mg g⁻¹ Sv.T) mjenjenih u 13h u odnosu na početnu vrijednost izmjerenu u 1h (0,52 mg g⁻¹ Sv.T za Chl *a*, 0,23 mg g⁻¹ Sv.T za Chl *b* i 0,16 mg g⁻¹ Sv.T za Car). Koncentracija klorofila *a* (0,67 mg g⁻¹ Sv.T) izmjerena u 19h je pokazala značajan pad u odnosu na podnevnu vrijednost, no nije se smanjila na razinu izmjerenu u 1h. Koncentracija klorofila *b* (0,27 mg g⁻¹ Sv.T) se smanjila na početnu razinu, te nije bilo značajne razlike u odnosu na početnu koncentraciju, dok se koncentracija karotenoida nije promijenila u odnosu na 13h. Omjer koncentracija klorofila *a* i *b* se nije značajno mijenjao tijekom dana.

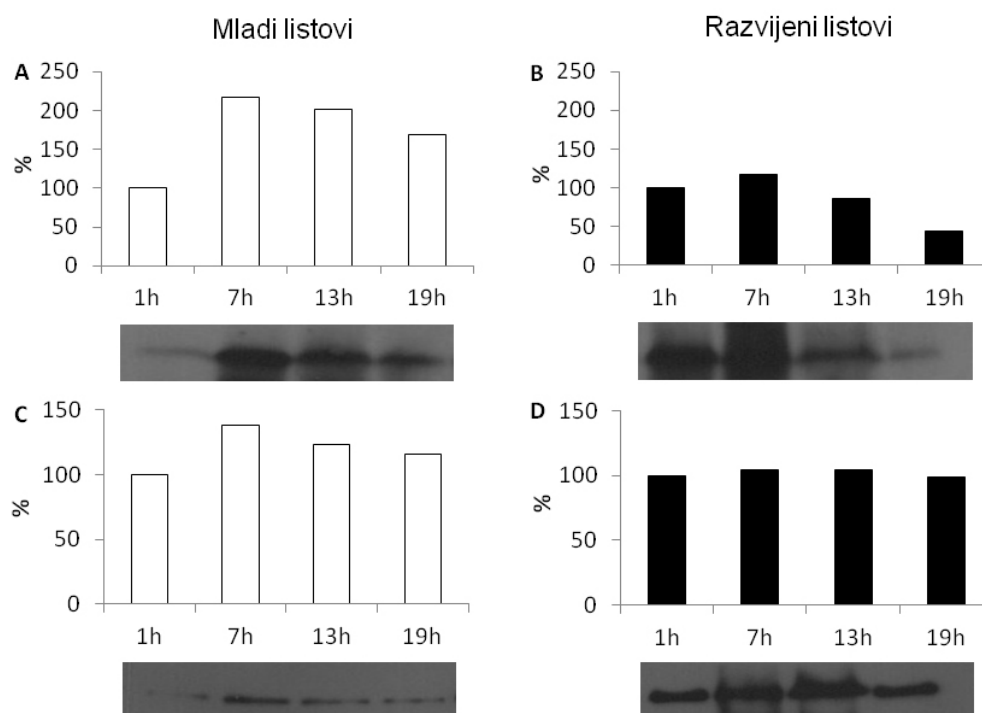
Koncentracija fotosintetskih pigmenata mjenjenih u 1h (1,10 mg g⁻¹ Sv.T za Chl *a*, 1,03 mg g⁻¹ Sv.T za Chl *b*, 0,23 mg g⁻¹ Sv.T za Car i 1,07 za Chl *a/b*) kod razvijenih listova je pokazala značajno povećanje već u 7h (1,81 mg g⁻¹ Sv.T za Chl *a*, 1,14 mg g⁻¹ Sv.T za Chl *b*, 0,46 mg g⁻¹ Sv.T za Car i 1,59 za Chl *a/b*) nakon čega se koncentracija u 13h smanjila na početnu razinu kod klorofila *a* (1,33 mg g⁻¹ Sv.T) i omjera klorofila *a* i *b* (1,26) te karotenoida (0,31 mg g⁻¹ Sv.T), a kod klorofila *b* se nije značajno promijenila (1,06 mg g⁻¹ Sv.T).



Slika 18. Srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracija klorofila *a* (Chl *a*; **A**), klorofila *b* (Chl *b*; **B**), omjera klorofila *a* i *b* (Chl *a/b*; **C**) te karotenoida (Car; **D**) izmjerene tijekom dnevnog ciklusa u mladim (○) i razvijeni listovima smokve sorte Zamorčica. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c; A, B, C,) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $p < 0,05$. Vrijednosti parametara prikazane su u mg g^{-1} Sv.T.

5.1.8. Količina proteina D1 i Rubisco LSU

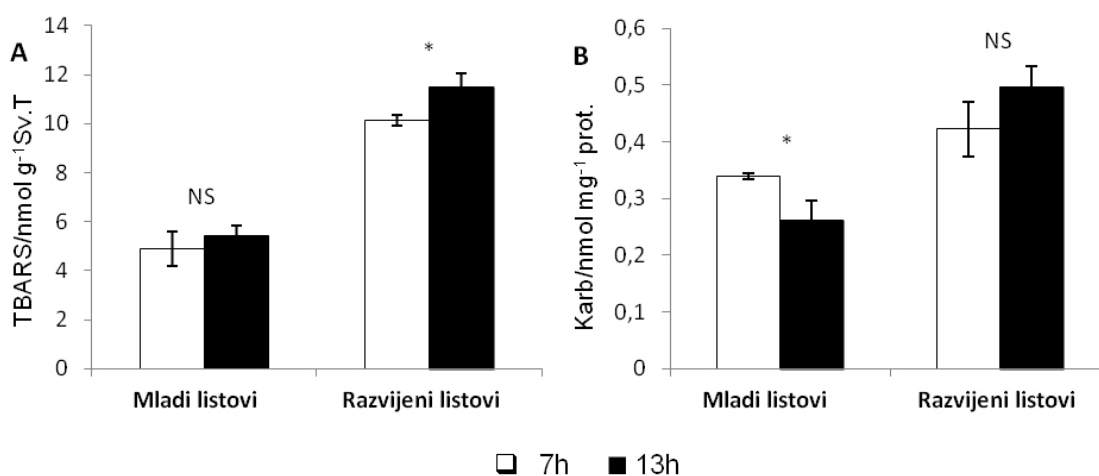
Slika 19 prikazuje dnevne promjene u akumulaciji proteina D1 (Slike 19 A i 19 B) i velike podjedinice Rubisca, LSU (Slike 19 C i 19 D). Protein D1 u mladim listovima (Slika 19 A) pokazao je povećanu akumulaciju u 7h u odnosu na početnu vrijednost u 1h. Nakon toga, akumulacija se postepeno smanjuje prema kraju dana. Slično tome, razvijeni listovi (Slika 19 B) su pokazali najjaču akumulaciju ovog proteina u 7h, nakon čega se počinje postepeno smanjivati. Velika podjedinica Rubisca, slično D1 proteinu, pokazala je najveću akumulaciju u 7h u oba tipa listova. Razina ovog proteina se u mladim listovima (Slika 19 C) postepeno smanjivala prema kraju dana, dok razvijeni listovi (Slika 19 D) nisu pokazali promjenu u 13h. U 19h se akumulacija ovog proteina se vratila na početnu razinu, izmjerenu u 1h.



Slika 19. Promjene u akumulaciji proteina D1 (A, B) i Rubisco LSU (C, D) u mladim (□; A, C) i razvijenim (■; B, D) listovima smokve sorte Zamorčica. Vrijednosti su prikazane kao postotak promjene od početne količine izmjerene u 1h (100%).

5.1.9. Lipidna peroksidacija i proteinski karbonili

Slika 20 prikazuje srednje vrijednosti, standardne devijacije i rezultate Studentovog t-testa koncentracija produkata peroksidacije lipida u obliku koncentracije reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS, Slika 20 A) i koncentracije oštećenih proteina u obliku karbonilnih skupina (Slika 20 B) u mladim i razvijenim listovima smokve mjerene u 7 i 13h. Mladi listovi nisu pokazali promjenu u koncentraciji TBARS u 13h u odnosu na 7h (4,88 nmol g⁻¹ Sv.T, odnosno 5,45 nmol g⁻¹ Sv.T), dok se količina karbonilnih skupina značajno smanjila (0,34 nmol mg⁻¹ prot odnosno 0,26 nmol mg⁻¹ prot). Razvijeni listovi su pokazali značajni porast koncentracije TBARS u 13h u odnosu na 7h (porast s 10,14 nmol g⁻¹ Sv.T na 11,49 nmol g⁻¹ Sv.T), a količina karbonilnih skupina se nije značajno promijenila (0,42 nmol mg⁻¹ prot, odnosno 0,49 nmol mg⁻¹ prot).

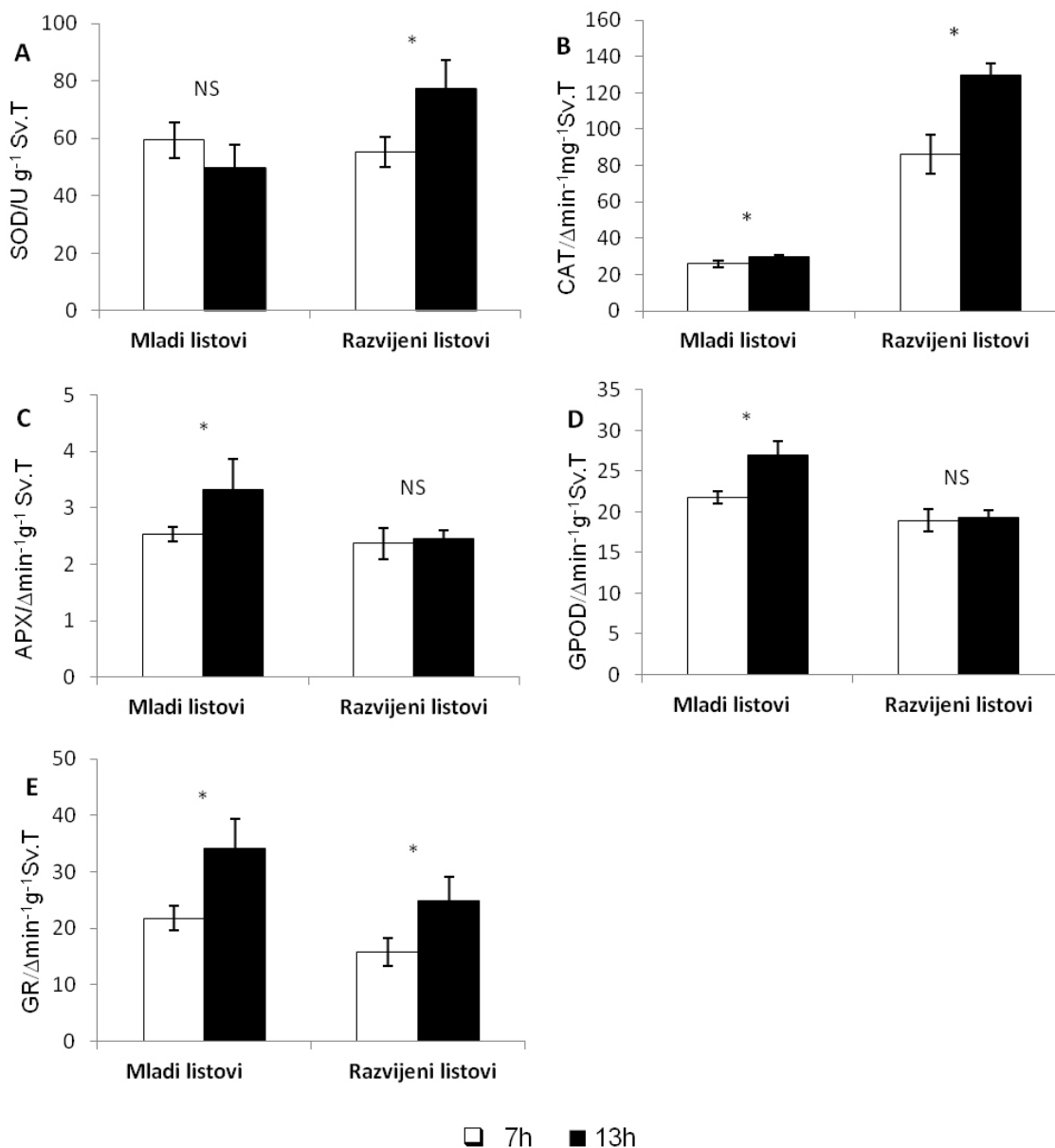


Slika 20. Srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracija produkata lipidne peroksidacije (TBARS (nmol g⁻¹ Sv.T); **A**) i proteinskih karbonila (Karb (nmol mg⁻¹ prot); **B**) izmjerene u 7 i 13h u mladim (□) i razvijenim (■) listovima smokve sorte Zamorčica. Rezultati označeni zvjezdicom (*) pokazuju značajnu razliku, dok rezultati označeni oznakom NS ne pokazuju značajnu razliku prema Studentovom t-testu, p<0,05.

5.1.10. Aktivnost antioksidativnih enzima

Srednje vrijednosti, standardne devijacije i rezultati Studentovog t-testa promjena u aktivnosti antioksidativnih enzima: superoksid dismutaze (SOD, Slika 21 A), katalaze (CAT, Slika 21 B), peroksidaza (gvajakol peroksidaza (GPOD, Slika 21 D) i askorbat peroksidaza (APX, Slika 21 C) i glutation reduktaze (GR, Slika 21 E) kod mladih i razvijenih listova mjerenih u 7 i 13h prikani su na Slici 21. Mladi listovi pokazali su značajan porast aktivnosti CAT (s $25,95 \Delta \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ Sv.T}$ na $30,08 \Delta \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ Sv.T}$), APX (s $2,53 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$ na $3,32 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$), GPOD (s $21,78 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$ na $26,97 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$) i GR ($21,76 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$ na $34,12 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$) u 13h u odnosu na 7h. SOD mjereno kod mladih listova nije pokazao značajan promjenu u 13h s obzirom na vrijednost izmjerenu u 7h ($59,51 \text{ U g}^{-1} \text{ Sv.T}$).

Razvijeni listovi pokazali su porast aktivnosti enzima CAT (s $86,14 \Delta \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ Sv.T}$ na $129,64 \Delta \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ Sv.T}$), GR (s $15,75 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$ na $24,86 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$) i SOD ($55,31 \text{ U g}^{-1} \text{ Sv.T}$ na $77,37 \text{ U g}^{-1} \text{ Sv.T}$), dok aktivnosti enzima APX i GPOD nisu pokazali značajnu promjenu u aktivnosti od 7 do 13h ($2,37 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$ za APX, odnosno $18,96 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$ za GPOD).



Slika 21. Srednje vrijednosti i standardne devijacije aktivnosti antioksidativnih enzima: superoksid dismutaze (SOD ($\text{U g}^{-1} \text{ Sv.T}$); **A**), katalaze (CAT ($\Delta \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ Sv.T}$); **B**), askorbat peroksidaze (APX ($\Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$); **C**), gvajakol peroksidaze (GPOD ($\Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$); **D**) i glutation reduktaze (GR ($\Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$); **E**) izmjerene u 7 i 13h u mladim (\square) i razvijenim (\blacksquare) listovima smokve sorte Zamorčica. Rezultati označeni zvjezdicom (*) pokazuju značajnu razliku, dok rezultati označeni oznakom NS ne pokazuju značajnu razliku prema Studentovom t-testu, $p < 0,05$.

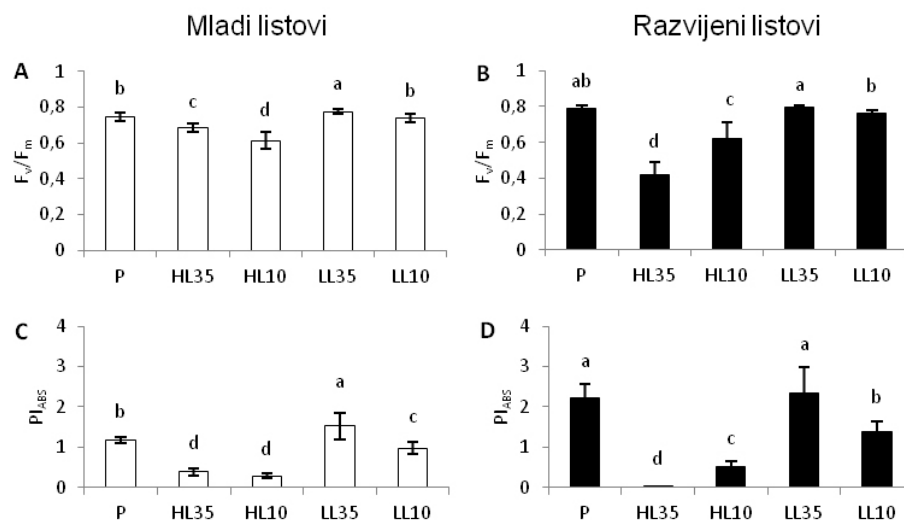
5.2. FOTOSINTETSKA UČINKOVITOST I ANTIOKSIDATIVNI ODGOVOR U EKSPERIMENTALNIM UVJETIMA

5.2.1. Maksimalni kvantni prinos fotosustava II (F_v/F_m) i indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS})

Analizu varijance, srednje vrijednosti i standardne devijacije maksimalnog kvantnog prinosa fluorescencije, F_v/F_m , prikazuju Slike 22 A i 22 B. F_v/F_m izmjeren na mladim listovima (Slika 22 A) pokazao je najjači pad vrijednosti izmjeren na HL10 tretmanu (0,61), a zatim HL35 tretmanu (0,69) u odnosu na P (0,75). LL10 tretman nije pokazao značajnu promjenu (0,74) dok je LL35 tretman pokazao značajan porast (0,78). Maksimalni kvantni prinos fluorescencije izmjeren na razvijenim listovima (Slika 22 B) pokazao je najjači pad vrijednosti izmjeren na HL35 tretmanu (0,42), a zatim HL10 tretmanu (0,62) u odnosu na P (0,79). LL35 i LL10 tretman nisu pokazali značajnu promjenu (0,80, odnosno 0,77) u odnosu na P.

Indeksi fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) mladih i razvijenih listova prikazani su na Slikama 22 C i 22 D. PI_{ABS} mladih listova (Slika 22 C) pokazao je najjači pad na tretmanima HL35 (0,38) i HL10 (0,29), a zatim na tretmanu LL10 (0,98) u odnosu na P (1,17). Tretman LL35 (1,52) nije pokazao značajnu promjenu. PI_{ABS} razvijenih listova (Slika 26 B) pokazao je najjači pad na tretmanu HL35 (0,028) u odnosu na P (2,24). I tretmani HL10 (0,52) i LL10 (1,37) su pokazali značajan pad, dok tretman LL35 (2,35) nije pokazao značajnu promjenu u odnosu na P.

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara F_v/F_m i PI_{ABS} za sortu Fico della Madonna prikazane su u Tablici 10 u Prilogu.



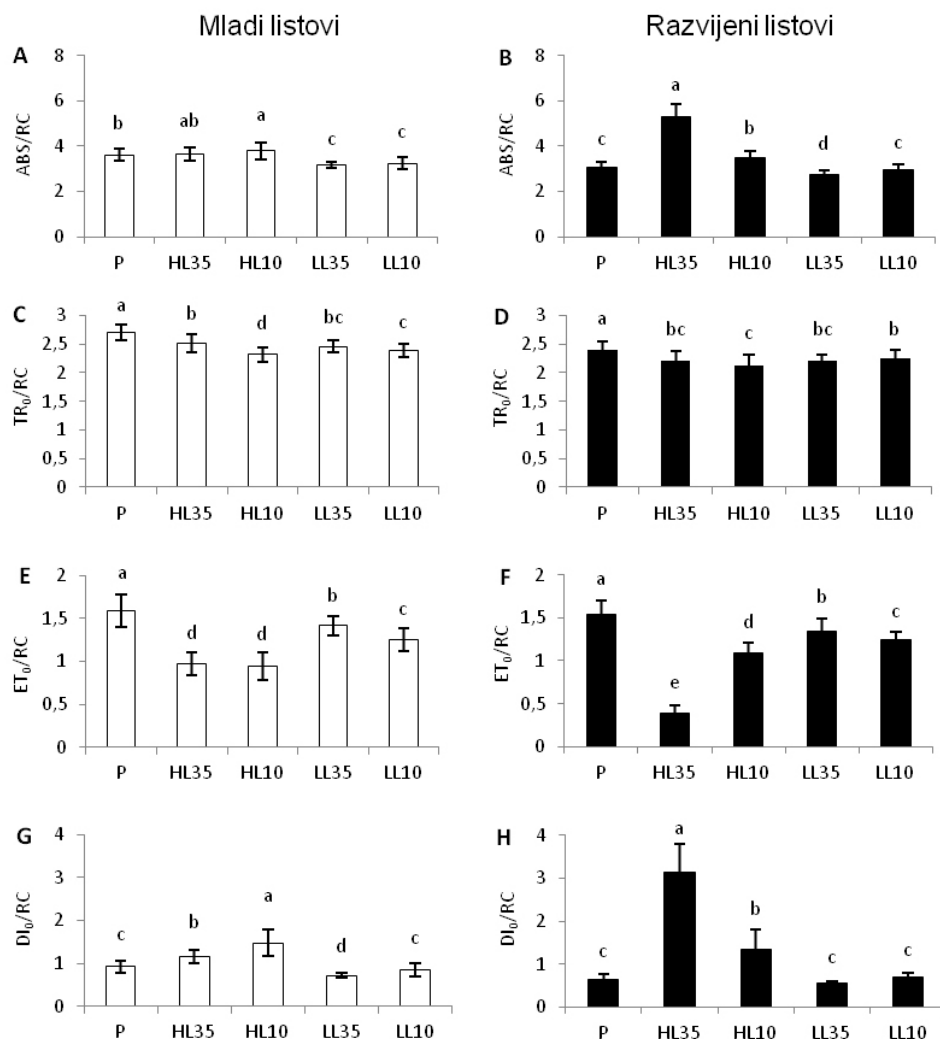
Slika 22. Srednje vrijednosti i standardne devijacije maksimalnog kvantnog prinosa fluorescencije (F_v/F_m ; **A, B**) i indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS} ; **C, D**) izmjereno na tretmanima u kontroliranim uvjetima na mladim (\square ; **A, C**) i razvijanim (\blacksquare ; **B, D**) listovima smokve sorte Zamorčica. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c, d) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $p < 0,05$. Vrijednosti parametara prikazane su u relativnim jedinicama.

5.2.2. Prijenos energije po aktivnom reakcijskom središtu

Slika 23 prikazuje analizu varijance, srednje vrijednosti i standardne devijacije promjene specifičnih protoka energije u kontroliranim uvjetima izmjerenih kod mladih i razvijenih listova. Mladi su listovi pokazali porast apsorpcije (ABS/RC, Slika 23 A) po aktivnom reakcijskom središtu na HL10 (3,80) i HL35 (3,66) tretmanima u odnosu na P (3,62), dok su tretmani LL35 (3,17) i LL10 (3,24) pokazali značajan pad vrijednosti. Protok uhvaćenih fotona po aktivnom reakcijskom središtu (TR_0/RC , Slika 23 C) je pokazao značajan pad vrijednosti na svim tretmanima u odnosu na P (2,70) i to najjači pad na HL10 tretmanu (2,32), a zatim LL10 (2,39), LL35 (2,46) i na kraju HL35 (2,51). Elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu (ET_0/RC , Slika 23 E) pokazao je značajan i najveći pad vrijednosti na tretmanima HL35 (0,97) i HL10 (0,94) u odnosu na P (1,59). Tretman LL10 (2,34) pokazao je nešto manji (1,25), a tretman LL35 (1,42) najmanji pad. Rasipanje po aktivnom reakcijskom središtu (DI_0/RC , Slika 23 G) pokazala je najveći porast vrijednosti na HL10 (1,48) tretmanu te nešto nižu vrijednost na HL35 (1,16) tretmanu u odnosu na vrijednost P (0,92). Tretman LL10 (0,85) nije pokazao značajnu razliku u odnosu na P, a tretman LL35 (0,71) značajan pad vrijednosti.

Razvijeni listovi pokazuju najveći porast apsorpcije (ABS/RC, Slika 23 B) po aktivnom reakcijskom središtu na HL35 tretmanu (5,33), a zatim na HL10 (3,49). Tretman LL35 (2,77) je pokazao značajan pad vrijednosti, dok tretman LL10 (2,96) nije pokazao razliku u odnosu na P (3,05). Protok uhvaćenih fotona po aktivnom reakcijskom središtu (TR_0/RC , Slika 23 D) je pokazao pad svih vrijednosti tretmana u odnosu na P (2,39). Najjači pad vrijednosti je pokazao tretmani HL10 (2,13), zatim HL35 (2,21) i LL35 (2,21), i na kraju LL10 (2,26). Elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu (ET_0/RC , Slika 23 F) pokazao je najvišu vrijednost na P (1,54). Najjači pad vrijednosti je pokazao je tretman HL35 (0,38), zatim HL10 (0,38), dalje LL10 (1,24) i na kraju LL35 tretman (1,35). Rasipanje po aktivnom reakcijskom središtu (DI_0/RC , Slika 23 H) pokazala je najveći porast vrijednosti na HL35 (3,12) tretmanu, te nešto nižu vrijednost na HL10 (1,36) tretmanu u odnosu na vrijednosti P (0,65). Tretmani LL35 (0,56) i LL10 (0,70) nisu pokazali značajnu promjenu u odnosu na P.

Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara ABS/RC, TR_0/RC , ET_0/RC i DI_0/RC za sortu Fico della Madonna prikazane su u Tablici 11 u Prilogu.



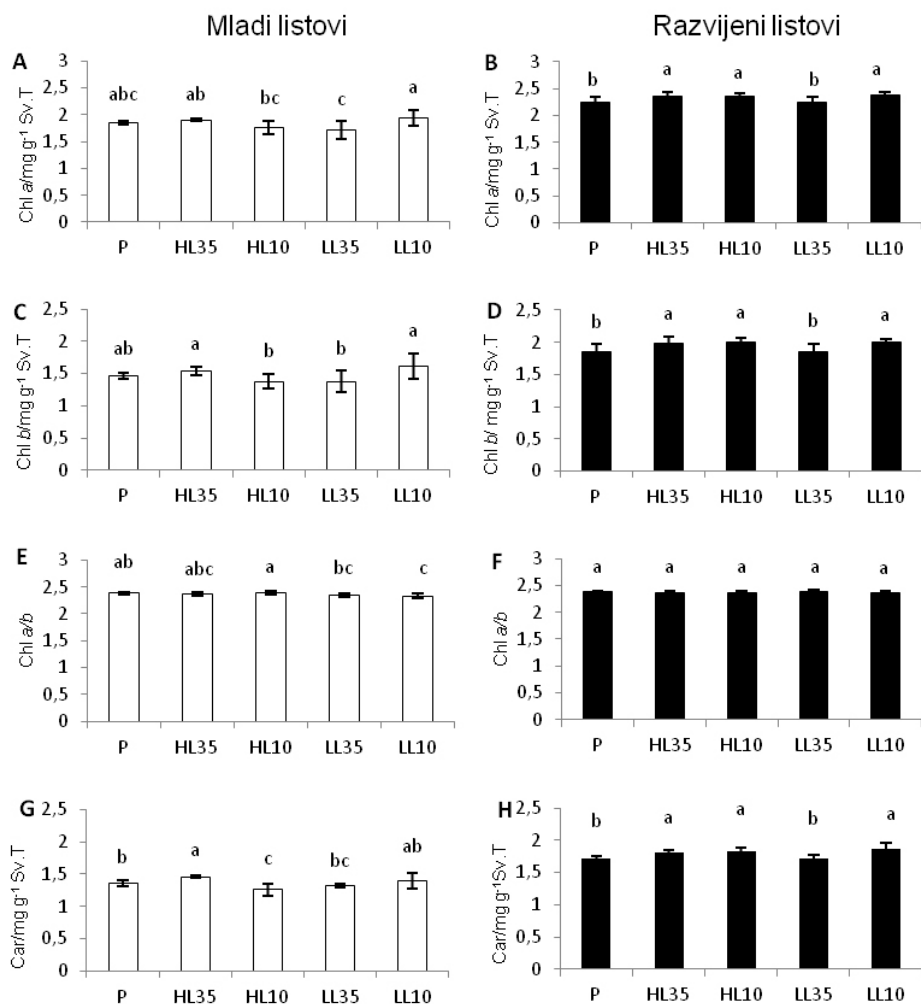
Slika 23. Srednje vrijednosti i standardne devijacije specifičnih protoka energije po reakcijskom središtu: apsorpcije (ABS/RC; **A, B**), protoka uhvaćenih fotona (TR₀/RC; **C, D**), elektronskog transporta (ET₀/RC; **E, F**) i rasipanja (DI₀/RC; **G, H**) izmjerene izmjeren na tretmanima u kontroliranim uvjetima na mladim (□; **A, C, E, G**) i razvijanim (■; **B, D, F, G**) listovima smokve sorte Zamorčica. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c, d, e) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $p < 0,05$. Vrijednosti parametara prikazane su u relativnim jedinicama.

5.2.3. Koncentracija fotosintetskih pigmenata

Analiza varijance srednjih vrijednosti transformiranih podataka koncentracija fotosintetskih pigmenata te njihove standardne devijacije kod mladih i razvijenih listova mjerenih u kontroliranim uvjetima prikazuje Slika 24. Mladi listovi su pokazali najnižu koncentraciju klorofila *a* (Slika 24 A) izmjerenu na LL35 tretmanu ($1,72 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$). Najviša vrijednost izmjerena je na LL10 tretmanu ($1,95 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$) što u usporedbi s LL35 tretmanom pokazuje značajnu razliku, no ipak ne pokazuju značajnu promjenu u odnosu na koncentraciju izmjerenu u P ($1,85 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$), kao ni na tretmanima HL35 ($1,90 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$) i HL10 ($1,76 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$). Najviša koncentracija klorofila *b* (Slika 24 C) izmjerena je na tretmanima HL35 ($1,54 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$) i LL10 ($1,62 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$), a najniža na HL10 ($1,37$) i LL35 ($1,37$), no ni jedan se tretman nije statistički razlikovao od P ($1,47 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$). Značajno viša vrijednost koncentracije karotenoida (Slika 24 E), u odnosu na P ($1,36 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$), izmjerena je na HL35 tretmanu ($1,45 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$). Tretman HL10 pokazao je značajno nižu vrijednost ($1,26 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$), dok ostali tretmani nisu pokazali značajne razlike u odnosu na P. Omjer Chl *a/b* (Slika 24 G) se značajno promijenio samo kod LL10 tretmana ($2,33$) u odnosu na P ($2,38$), dok ostali tretmani nisu pokazali značajne promijene.

Razvijeni listovi su u P ($2,24 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$) i LL35 tretmanu ($2,24 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$) pokazali najniže koncentracije klorofila *a* (Slika 24 B). Ostali tretmani, HL35 ($2,35 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$), HL10 ($2,36 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$) i LL10 ($2,38 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$) pokazali značajno povećanje koncentracije u odnosu na P. Slično se ponašaju i koncentracije klorofila *b* (Slika 24 D) i karotenoida (Slika 24 F). Najniže koncentracija klorofila *b* je izmjerene su na P ($1,86 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$) i LL35 tretmanu ($1,85 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$), dok su tretmani HL35 ($1,99 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$), HL10 ($2,00 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$) i LL10 ($2,00 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$) pokazali značajno povećanje koncentracije. Najniže koncentracije karotenoida su izmjerena na P ($1,72 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$) i LL35 tretmanu ($1,72 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$), a tretmani HL35 ($1,81 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$), HL10 ($1,83 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$) i LL10 ($1,86 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$) su pokazali značajno povećanje koncentracije. Omjer Chl *a/b* (Slika 24 H) nije pokazao značajne promjene u tretmanima u odnosu na P ($2,38$).

Srednje vrijednosti i standardne devijacije logaritmiranih vrijednosti mjerenja koncentracija fotosintetskih pigmenata Chl *a*, Chl *b*, Chl *a/b* i Car za sortu Fico della Madonna prikazane su u Tablici 12 u Prilogu.



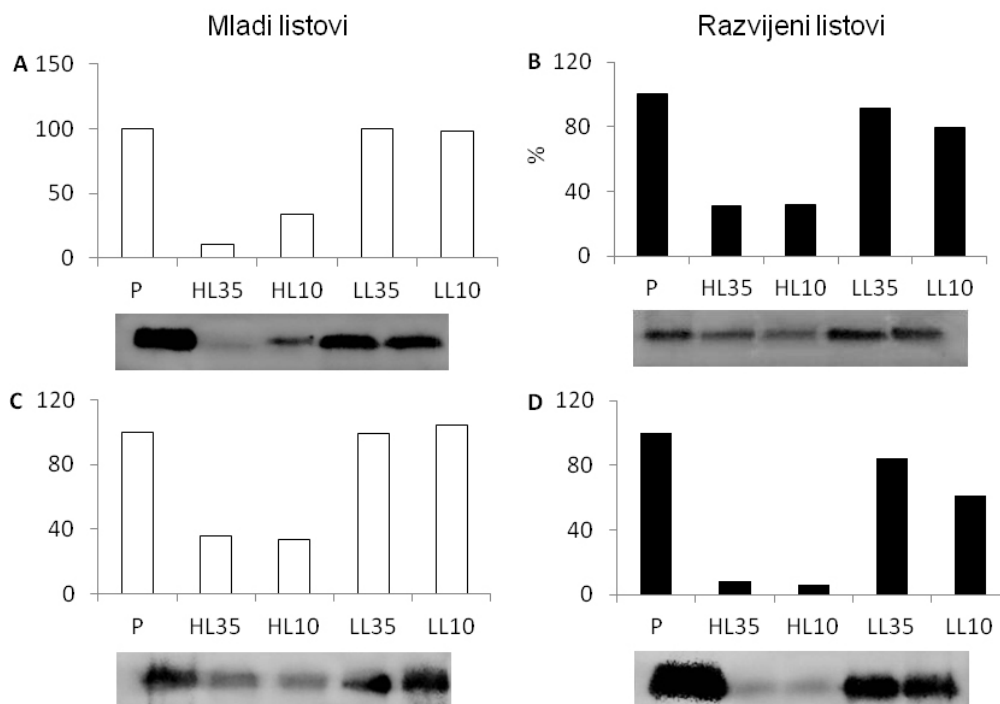
Slika 24. Transformirane (Log_{10}) srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracija klorofila *a* (Chl *a* (mg g^{-1} Sv.T); **A, B**), klorofila *b* (Chl *b* (mg g^{-1} Sv.T); **C, D**), omjera klorofila *a* i *b* (Chl *a/b*; **E, F**) te karotenoida (Car (mg g^{-1} Sv.T); **G, H**) izmjerene na tretmanima u kontroliranim uvjetima na mladim (\square ; **A, C, E, G**) i razvijenim (\blacksquare ; **B, D, F, H**) listovima smokve sorte Zamorčica. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $p < 0,05$.

5.2.4. Količina proteina D1 i Rubisco LSU

Slika 25 prikazuje promjene u akumulaciji proteina D1 (Slike 25 A i 25 B) i velike podjedinice Rubisco-a, LSU (Slike 25 C i 25 D). Protein D1 u mladim listovima (Slika 25 A) pokazao je najveću akumulaciju na P, a na tretmanima s niskim intenzitetom svjetlosti, LL35 i LL10, se ta količina gotovo nije promijenila (pad 0,1, odnosno 1,6%). Tretmani s visokim intenzitetom svjetlosti, HL35 i HL10, su pokazali pad od 89,1%, odnosno 66,5%. Razvijeni su listovi (Slika 25 B) pokazali slično; predtretman je pokazao najveću akumulaciju dok su tretmani LL35 i LL10 pokazali vrlo malo smanjenje akumulacije (pad 8,4%, odnosno 20,6%), a tretmani HL35 i HL10 izazvali izrazito smanjenje akumulacije (pad 68,7, odnosno 67,9%).

Velika podjedinica Rubisca na mladim je listovima (Slika 25 C) pokazala najveću akumulaciju na LL10 tretmanu te je bila za 4,11% viša nego u P. Ostali tretmani su pokazali smanjenje, od čega je tretman LL35 pokazao smanjenje za samo 1,2%. Tretmani s visokim intenzitetom svjetlosti su pokazali jače smanjenje, 54,1% na HL35 tretmanu te 67,9% na HL10 tretmanu. Razvijeni su listovi (Slika 25 D) pokazali najveću akumulaciju na P. Najmanje smanjenje akumulacije pokazao je LL35 tretmanu (15,6%), dok su svi ostali tretmani pokazali jače smanjenje; HL35 za 53,5%, HL10 za 63,8%, a LL10 za 58,9%.

Promjene u akumulaciji proteina D1 i velike podjedinice Rubisca, LSU za sortu Fico della Madonna prikazane su na Slici 36 u Prilogu.



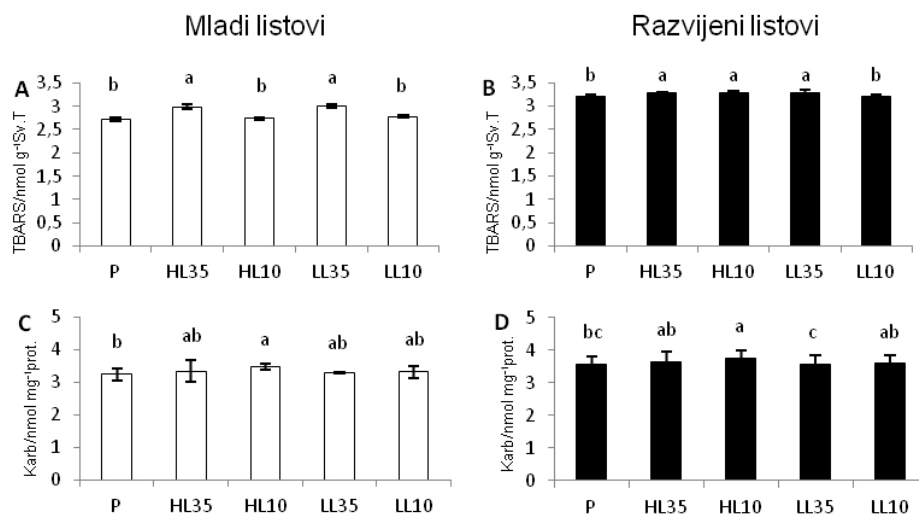
Slika 25. Promjene u akumulaciji proteina D1 (**A, B**) i Rubisco LSU (**C, D**) na tretmanima u kontroliranim uvjetima na mladim (\square ; **A, C**) i razvijenim (\blacksquare ; **B, D**) listovima smokve sorte Zamorčica. Vrijednosti su prikazane kao postotak promjene od početne količine izmjerene nakon stabilizacije (100%).

5.2.5. Lipidna peroksidacija i proteinski karbonili

Slika 26 prikazuje analizu varijance srednjih vrijednosti transformiranih podataka te njihove standardne devijacije koncentracija produkata peroksidacije lipida u obliku količine reaktivnih supstanci tiobarbiturine kiseline (TBARS, Slika 26 A i B) i količinu oštećenih proteina u obliku karbonilnih skupina (Slika 26 C i D) u mladim i razvijenim listovima smokve mjerene u kontroliranim uvjetima. Mladi su listovi pokazali najviše koncentracije TBARS (Slika 26 A) na tretmanima HL35 (2,99 nmol g⁻¹ Sv.T) i LL35 (3,01 nmol g⁻¹ Sv.T), dok tretmani HL10 (2,73 nmol g⁻¹ Sv.T) i LL10 (2,78 nmol g⁻¹ Sv.T) nisu pokazali značajnu razliku u odnosu na P (2,73 nmol g⁻¹ Sv.T). Koncentracija proteinskih karbonila mladih listova (Slika 26 C) se pokazala najvišom na HL35 tretmanu (1,62 nmol mg⁻¹ prot). Tretmani HL35 (1,55 nmol mg⁻¹ prot), LL35 (1,70 nmol mg⁻¹ prot) i LL10 (1,59 nmol mg⁻¹ prot) su pokazali nešto više vrijednosti od P (1,51 nmol mg⁻¹ prot). no one se nisu značajno razlikovale od njega.

Razvijeni listovi su pokazali najnižu vrijednost TBARS (Slika 26 B) na P (3,22 nmol g⁻¹ Sv.T), a tretman LL10 (3,22 nmol g⁻¹ Sv.T) nije pokazao značajnu razliku u odnosu na njega. Ostali tretmani, HL35 (3,29 nmol g⁻¹ Sv.T), HL10, (3,29 nmol g⁻¹ Sv.T) i LL35 (3,30 nmol g⁻¹ Sv.T) su pokazali značajno povećanje vrijednosti. Koncentracija proteinskih karbonila razvijenih listova (Slika 26 D) pokazala je najvišu koncentraciju na HL10 tretmanu (1,90 nmol g⁻¹ Sv.T). Ta je vrijednost bila značajno viša od one izmjerene u P (1,67 nmol g⁻¹ Sv.T). Vrijednosti ostalih tretmana, HL35 (1,80 nmol g⁻¹ Sv.T), LL35 (1,63 nmol g⁻¹ Sv.T) i LL10 (1,79 nmol g⁻¹ Sv.T) nisu se značajno razlikovale od P.

Srednje vrijednosti i standardne devijacije transformiranih vrijednosti mjerenja koncentracija TBARS i proteinskih karbonila za sortu Fico della Madonna prikazane su u Tablici 13 u Prilogu.



Slika 26. Transformirane (Log_{10}) srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracija produkata lipidne peroksidacije (TBARS (nmol g^{-1} Sv.T); **A, B**) i proteinskih karbonila (Karb (nmol mg^{-1} prot.); **C, D**) izmjerene na tretmanima u kontroliranim uvjetima na mladim (\square ; **A, C**) i razvijanim (\blacksquare ; **B, D**) listovima smokve sorte Zamorčica. Rezultati označeni istim slovom (a, b) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $p < 0,05$.

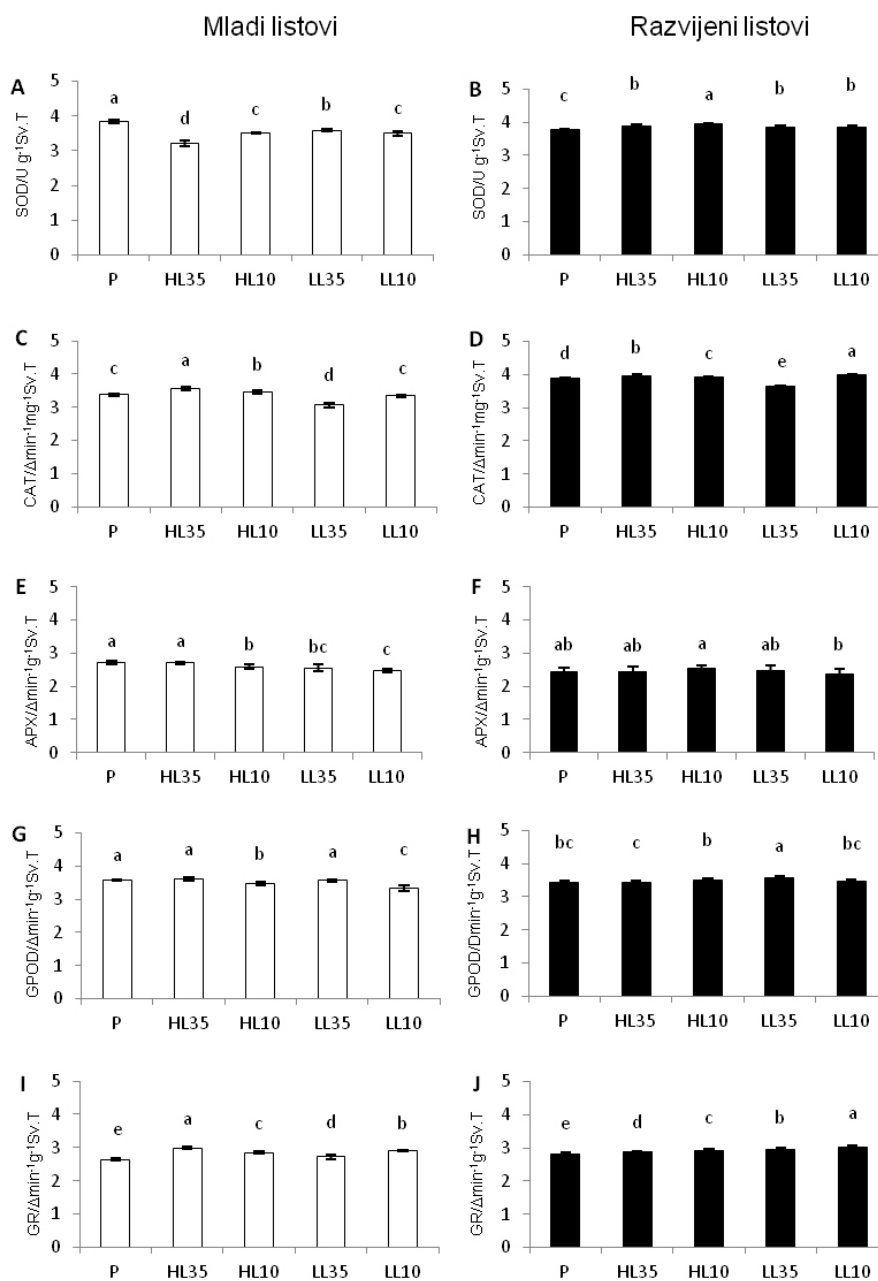
5.2.6. Aktivnost antioksidativnih enzima

Analiza varijance srednjih vrijednosti transformiranih podataka, te njihove standardne devijacije promjena aktivnosti antioksidativnih enzima mjerenih u kontroliranim uvjetima na mladim i razvijenim listovima prikazane su na Slici 27. Aktivnost SOD mladih listova (Slika 27 A) je bila najviša na P (72,11 U g⁻¹ Sv.T), te je pokazala značajan pad na svim ostalim tretmanima i to redom na HL35 (16,90 U g⁻¹ Sv.T), zatim na HL10 (31,02 U g⁻¹ Sv.T) i LL10 (32,11 U g⁻¹ Sv.T), te na kraju na LL35 (38,08 U g⁻¹ Sv.T). Aktivnost CAT izmjerena na mladim listovima (Slika 27 C) pokazala je najnižu vrijednost na LL35 tretmanu (11,66 Δmin⁻¹mg⁻¹ Sv.T) u odnosu na vrijednost P (23,41 Δmin⁻¹mg⁻¹ Sv.T) i LL10 tretmana (22,22 Δmin⁻¹mg⁻¹ Sv.T), dok su tretmani HL35 (35,44 Δmin⁻¹mg⁻¹ Sv.T) i HL10 (28,45 Δmin⁻¹mg⁻¹ Sv.T) pokazali povećanje vrijednosti. Aktivnost APX mladih listova (Slika 27 E) je pokazala najviše vrijednosti na P (5,15 Δmin⁻¹g⁻¹ Sv.T) i HL35 tretmanu (5,07 Δmin⁻¹g⁻¹ Sv.T). Tretmani HL10 (3,94 Δmin⁻¹g⁻¹ Sv.T), LL35 (3,61 Δmin⁻¹g⁻¹ Sv.T) i LL10 (3,03 Δmin⁻¹g⁻¹ Sv.T) su pokazali značajno niže vrijednosti u odnosu na P. Aktivnost GR mladih listova (Slika 27 G) je pokazala najnižu vrijednost na P (4,34 Δmin⁻¹g⁻¹ Sv.T), a vrijednosti su značajno rastle redom na tretmanima LL35 (5,28 Δmin⁻¹g⁻¹ Sv.T), HL10 (7,14 Δmin⁻¹g⁻¹ Sv.T), zatim LL10 (8,13 Δmin⁻¹g⁻¹ Sv.T) i na kraju HL35 (9,69 Δmin⁻¹g⁻¹ Sv.T). Aktivnost GPOD mladih listova (Slika 27 I) je pokazala da među P (37,36 Δmin⁻¹g⁻¹ Sv.T) i tretmanima HL35 (41,69 Δmin⁻¹g⁻¹ Sv.T) i LL35 (36,59 Δmin⁻¹g⁻¹ Sv.T) nema značajne razlike, dok su tretmani HL10 (29,98 Δmin⁻¹g⁻¹ Sv.T) i LL10 (21,64 Δmin⁻¹g⁻¹ Sv.T) pokazali značajan pad vrijednosti.

Aktivnost SOD je na razvijenim listovima (Slika 27 B) pokazala najnižu vrijednost na predtretmanu (59,92 U g⁻¹ Sv.T). Tretmani HL35 (76,61 U g⁻¹ Sv.T), HL10 (68,48 U g⁻¹ Sv.T) i LL10 (72,31 U g⁻¹ Sv.T) su pokazali značajno više vrijednost u odnosu na P, dok je najviša aktivnost je izmjerena na tretmanu HL10 (86,28 U g⁻¹ Sv.T). Najviša aktivnost CAT razvijenih listova (Slika 27 D) izmjerena je na LL10 tretmanu (101,17 Δmin⁻¹mg⁻¹ Sv.T). Tretmani HL35 (92,91 Δmin⁻¹mg⁻¹ Sv.T) i HL10 (82,82 Δmin⁻¹mg⁻¹ Sv.T) pokazali su povišene vrijednosti u odnosu na P (75,03 Δmin⁻¹mg⁻¹ Sv.T), dok je LL35 (45,51 Δmin⁻¹mg⁻¹ Sv.T) pokazao značajno nižu vrijednost. Aktivnost enzima APX razvijenih listova (Slika 27 F) bila je najviša na tretmanu HL10 (3,51 Δmin⁻¹g⁻¹ Sv.T), a najniža na LL10 tretmanu (2,49 Δmin⁻¹g⁻¹ Sv.T) što je pokazalo značajnu razliku među tretmanima, no nije bilo značajne razlike u odnosu na P (2,77 Δmin⁻¹g⁻¹ Sv.T). Također, tretmani HL35 (2,88 Δmin⁻¹g⁻¹ Sv.T) i LL35 (3,17 Δmin⁻¹g⁻¹ Sv.T) se nisu značajno razlikovali od P. Aktivnost GR razvijenih listova (Slika 27 H) je pokazala najnižu vrijednost na P (6,55 Δmin⁻¹g⁻¹ Sv.T) dok su ostali tretmani pokazali

značajan porast aktivnosti i to redom HL35 ($7,38 \Delta\text{min}^{-1}\text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$), HL10 ($8,26 \Delta\text{min}^{-1}\text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$), LL35 ($9,24 \Delta\text{min}^{-1}\text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$) i na kraju LL10 ($10,38 \Delta\text{min}^{-1}\text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$). Aktivnost enzima GPOD izmjerena na razvijenim listovima (Slika 27 J) pokazala je najvišu vrijednost na LL35 tretmanu ($38,13 \Delta\text{min}^{-1}\text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$), dok se ostali tretmani ne razlikuju značajno od P ($27,93 \Delta\text{min}^{-1}\text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$).

Srednje vrijednosti i standardne devijacije transformiranih vrijednosti mjerenja aktivnosti enzima SOD, CAT, APX, GR i GPOD za sortu Fico della Madonna prikazane su u Tablici 14 u Prilogu.



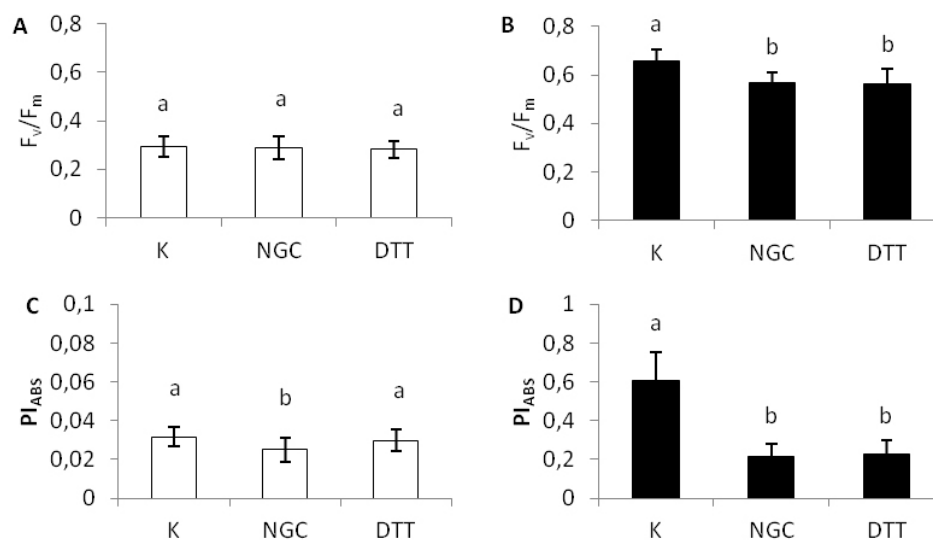
Slika 27. Transformirane (Log_{10}) srednje vrijednosti i standardne devijacije aktivnosti antioksidativnih enzima: superoksid dismutaze (SOD ($\text{U g}^{-1}\text{Sv.T}$); **A, B**), katalaze (CAT ($\Delta\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{Sv.T}$); **C, D**), askorbat peroksidaze (APX ($\Delta\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{Sv.T}$); **E, F**), gvajakol peroksidaze (GPOD ($\Delta\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{Sv.T}$); **G, H**) i glutation reduktaze (GR ($\Delta\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{Sv.T}$); **I, J**) izmjerene na tretmanima u kontroliranim uvjetima na mladim (\square ; **A, C, E, G, I**) i razvijenim (\blacksquare ; **B, D, F, G, J**) listovima smokve sorte Zamorčica. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c, d, e) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $p < 0,05$.

5.3. FOTOSINTETSKA UČINKOVITOST I ANTIOKSIDATIVNI ODGOVOR NAKON TRETMANA INHIBITORIMA NEFOTOKEMIJSKOG GAŠENJA FLUORESCENCIJE KLOOROFILA *a*

5.3.1. Maksimalni kvantni prinos fotosustava II (F_v/F_m) i indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS})

Analizu varijance, srednje vrijednosti i standardne devijacije maksimalnog kvantnog prinosa fluorescencije (F_v/F_m) lisnih diskova mladih i razvijenih listova nakon 30 min HL35 tretmana prikazuju Slike 28 A i 28 B. F_v/F_m izmjeren na mladim lisnim diskovima (Slika 28 A) nije pokazao nikakve razlike između K (0,29) i tretmana NGC-om (0,29) i DTT-om (0,28). Lisni diskovi razvijenih listova su pokazali značajan pad vrijednosti na oba tretmana inhibitorima, 0,57 na tretmanu NGC-om, odnosno 0,56 na tretmanu DTT-om u odnosu na K (0,66)

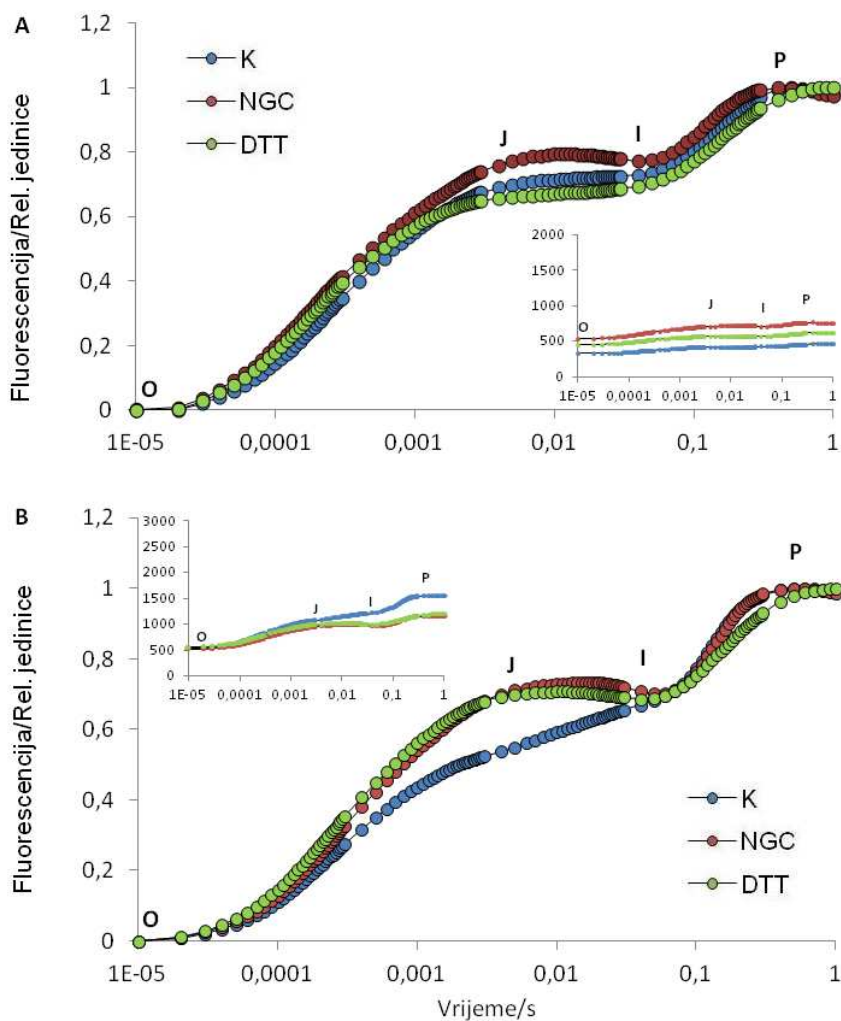
Indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) lisnih diskova mladih i razvijenih listova prikazani su na Slikama 28 C i 28 D. PI_{ABS} mladih lisnih diskova (Slika 22 C) pokazao je značajan pad pri tretmanima NGC-om (0,025) dok između K (0,03) i tretmana DTT-om (0,03) nije bilo značajne razlike. Razvijen lisni diskovi su na oba tretmana inhibitorima pokazali značajan pad u odnosu na K (0,61); na tretmanu NGC-om vrijednost je bila 0,22, a na tretmanu DTT-om 0,23.



Slika 28. Srednje vrijednosti i standardne devijacije maksimalnog kvantnog prinosa fluorescencije (F_v/F_m ; **A, B**) i indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS} ; **C, D**) izmjerene nakon 30 min HL35 tretmana na listnim diskovima mladih (□; **A, C**) i razvijenih (■; **B, D**) listova smokve. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $p < 0,05$. Vrijednosti parametara prikazane su u relativnim jedinicama.

5.3.2. OJIP porast fluorescencije klorofila a

Slika 29 prikazuje OJIP krivulje intenziteta fluorescencije na logaritamskoj vremenskoj skali mladih i razvijenih listova (lisnih diskova) smokve sorte Zamorčica, mjenjenih nakon 30 minuta na HL35 u kontroli i dva tretmana inhibitorima. Lisni diskovi mladih listova (Slika 29 A) pokazali su tipični oblik OJIP krivulje izmjeren u kontroli. Odstupanja su bila su zabilježena na J i I koracima. Tretman NGC-om je pokazao više vrijednosti, dok su na tretmanu DTT-om zabilježene nešto niže vrijednosti. Nativne krivulje (umetnuti grafovi Slike 29 A) pokazale su nestanak tipičnih koraka OJIP krivulje. Također, pokazale su više vrijednosti J, I i P koraka na oba tretmana inhibitorima u odnosu na K. Lisni diskovi razvijenih listova (Slika 29 B) pokazali su na tretmanima NGC-om i DTT-om više vrijednosti na J koraku u odnosu na K, dok odstupanja na I koraku nisu bila toliko intenzivna. Nativne krivulje (umetnuti grafovi Slike 29 B) pokazali nestanak tipičnih koraka OJIP krivulja, a tretmani NGC-om i DTT-om su pokazali niže vrijednosti I i P koraka.



Slika 29. Normalizirani OJIP porast fluorescencije klorofila a izmjeren nakon 30 min HL35 tretmana na listnim diskovima mladih (**A**) i razvijenih (**B**) listova smokve sorte Zamorčica. Umetnuti grafovi prikazuju native OJIP krivulje. Promjene intenziteta fluorescencije prikazana je na logaritamskoj vremenskoj skali.

5.3.3. Parametri OJIP porasta fluorescencije klorofila a

Parametri OJIP porasta fluorescencije klorofila a kod lisnih diskova mladih i razvijenih listova nakon 30 min tretmana HL35 prikazani su u Tablici 5.

Intenzitet fluorescencije na O stupnju (F_0) mjerene na lisnim diskovima mladih listova pokazao je značajan porast vrijednosti na tretmanu NGC-om (520,56), dok je taj porast na tretmanu DTT-om bio nešto manji (444,74) u odnosu na K (322,76). Razvijeni lisni diskovi su pokazali značajan pad vrijednosti na tretmanu NGC-om (498,02), dok tretman DTT-om (518,88) nije pokazao značajnu promjenu u odnosu na K (529,02). Maksimalni intenzitet fluorescencije na P stupnju (F_m) na lisnim diskovima mladih listova pokazao je slično kao i F_0 ; jači porast vrijednosti na tretmanu NGC-om (735,12) i nešto manji porast na tretmanu DTT-om (621,82) u odnosu na K (456,53). Razvijeni lisni diskovi su pokazali značajan pad vrijednosti na oba tretmana inhibitorima u odnosu na K (1572,95); 1159,98 na tretmanu NGC-om, odnosno 1211,65 na tretmanu DTT-om.

Varijabilna fluorescencija na J stupnju (V_j) je na lisnim diskovima mladih listova pokazala značajan porast na tretmanu NGC-om (0,67), odnosno, značajan pad vrijednosti na tretmanu DTT-om (0,61) u odnosu na K (0,64). Slično je pokazala i varijabilna fluorescencija na I stupnju (V_i); značajan porast na tretmanu NGC-om (0,76), odnosno, značajan pad vrijednosti na tretmanu DTT-om (0,68) u odnosu na K (0,72). Razvijeni lisni diskovi su pokazali značajan porast vrijednosti V_j parametra na oba tretmana inhibitorima u odnosu na K (0,49). Porast je bio nešto viši na tretmanu NGC-om (0,63) nego na tretmanu DTT-om (0,58). Sličan trend je pokazao i V_i parametar; porast na tretmanu NGC-om (0,72) je bio nešto viši nego na tretmanu DTT-om (0,67) u odnosu na K (0,66).

Vrijeme koje je potrebno da se postigne maksimalna vrijednost fluorescencije (t_{max}) na lisnim diskovima mladih listova pokazao je značajan porast na tretmanu DTT-om (840,82) u odnosu na K (586,22), dok tretman NGC-om nije pokazao promjenu (555,12). Razvijeni lisni diskovi su pokazali značajan pad na tretmanu NGC-om (617,78), odnosno značajan porast vrijednosti na tretmanu DTT-om (847,50) u odnosu na K (697,56). Slično tome su se ponašale i vrijednosti parametra S_m . Lisni diskovi mladih listova pokazali su značajan porast na tretmanu DTT-om (76,18) u odnosu na K (48,72), dok tretman NGC-om nije pokazao promjenu (43,82). Razvijeni lisni diskovi su pokazali značajan pad na tretmanu NGC-om (47,14), odnosno značajan porast vrijednosti na tretmanu DTT-om (70,00) u odnosu na K (52,12). Ukupna brzina zatvaranja reakcijskih središta (M_0) pokazala je na lisnim diskovima mladih listova pokazao je značajan porast na tretmanu DTT-om (181,55) u odnosu na K

(104,99), dok tretman NGC-om nije pokazao promjenu (102,87). Razvijeni lisni diskovi su pokazali značajan pad na tretmanu NGC-om (95,79), odnosno značajan porast vrijednosti na tretmanu DTT-om (176,07) u odnosu na K (116,29).

Tablica 5. Srednje vrijednosti i standardne devijacije OJIP parametara (F_0 , F_m , V_J , V_I , t_{max} , S_m , N) izmjerenih nakon 30 min tretmana na lisnim diskovima mladih (M) i razvijenih (R) listova smokve sorte Zamorčica. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu, $p < 0,05$. Vrijednosti OJIP parametara prikazane su u relativnim jedinicama.

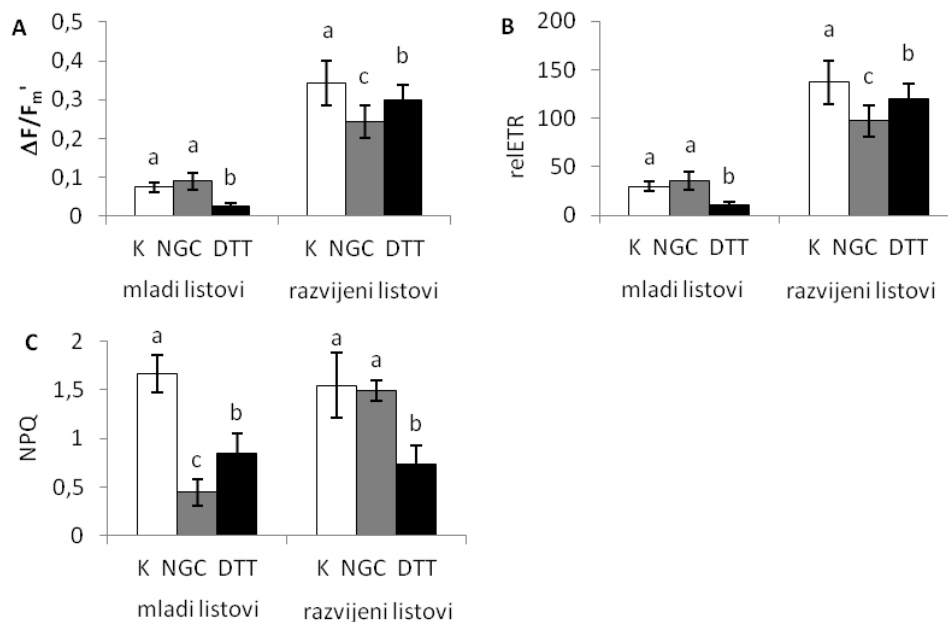
		K	NGC	DTT
F_0	M	322,756 ±66,067 c	520,558 ±101,011 a	444,735 ±90,316 b
	R	529,024 ±37,087 a	498,022 ±38,160 b	518,875 ±54,955 a
F_m	M	459,533 ±100,242 c	735,116 ±155,227 a	621,816 ±138,798 b
	R	1572,951 ±257,399 a	1159,978 ±157,124 b	1211,650 ±211,753 b
V_J	M	0,635 ±0,054 b	0,667 ±0,071 a	0,611 ±0,044 c
	R	0,489 ±0,043 c	0,633 ±0,045 a	0,580 ±0,080 b
V_I	M	0,720 ±0,037 b	0,757 ±0,070 a	0,680 ±0,050 c
	R	0,645 ±0,037 c	0,719 ±0,030 a	0,672 ±0,068 b
t_{max}	M	586,222 ±100,437 b	555,116 ±243,676 b	840,816 ±111,651 a
	R	697,561 ±79,018 b	617,778 ±44,153 c	847,500 ±101,242 a
S_m	M	48,719 ±12,424 b	43,818 ±22,328 b	76,175 ±23,530 a
	R	52,118 ±6,093 b	47,140 ±5,873 c	70,001 ±16,246 a
N	M	104,990 ±20,311 b	102,874 ±55,661 b	181,548 ±60,796 a
	R	116,288 ±12,331 b	95,786 ±9,117 c	176,071 ±73,562 a

5.3.4. Fluorescencija klorofila a metodom saturacijskog pulsa

Srednje vrijednosti, standardne devijacije i analiza varijance efektivnog kvantnog prinosa fotosinteze lisnih diskova mladih i razvijenih listova ($\Delta F/F_m'$; Slika 30 A) relativne stope elektronskog transporta (relETR; Slika 30 B) i nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila a (NPQ, Slika 30 C) prikazuje Slika 30.

Mjerenje efektivnog kvantnog prinosa fluorescencije pri $800 \mu\text{mola}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ na lisnim diskovima mladih listova pokazalo je da između kontrole (0,08) i tretmana NGC-om (0,09) nije bilo značajne razlike, dok je tretman DTT-om pokazao značajan pad vrijednosti (0,03). Nefotokemijsko gašenje fluorescencije mladih lisnih diskova (Slika 37 C) mjereno pri $800 \mu\text{mola}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pokazalo je najvišu vrijednost izmjerenu u kontroli (1,67). Tretman DTT-om (0,85) pokazao je značajan pad u odnosu na kontrolu, no tretman NGC-om je pokazao najjači pad vrijednosti (0,45). Relativna stopa elektronskog transporta (Slika 37 D) pokazala je da između kontrole (29,93) i tretmana NGC-om (35,87) ne postoji značajna razlika, dok tretman DTT-om pokazuje značajan pad (10,26).

Mjerenje efektivnog kvantnog prinosa fluorescencije pri $800 \mu\text{mola}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ na lisnim diskovima razvijenih listova pokazalo je najvišu vrijednost u kontroli (0,34), a tretmani su dali značajno niže vrijednosti s time da je najjači pad bio izmjeren na tretmanu NGC-om (0,24), a na tretmanu DTT-om (0,30) taj je pad bio nešto viši. Nefotokemijsko gašenje fluorescencije razvijenih lisnih diskova (Slika 37 C) mjereno pri $800 \mu\text{mola}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ je pokazalo da između kontrole (1,55) i tretmana NGC-om (1,50) nema značajne razlike, dok tretman DTT-om pokazuje značajno smanjenje vrijednosti (0,73). Najviša vrijednost relativne stope elektronskog transporta (Slika 37 D) je izmjerena u kontroli (136,98), a tretmani su dali značajno niže vrijednosti s time da je najjači pad bio izmjeren na tretmanu NGC-om (97,46), a na tretmanu DTT-om (120,12) nešto manji.



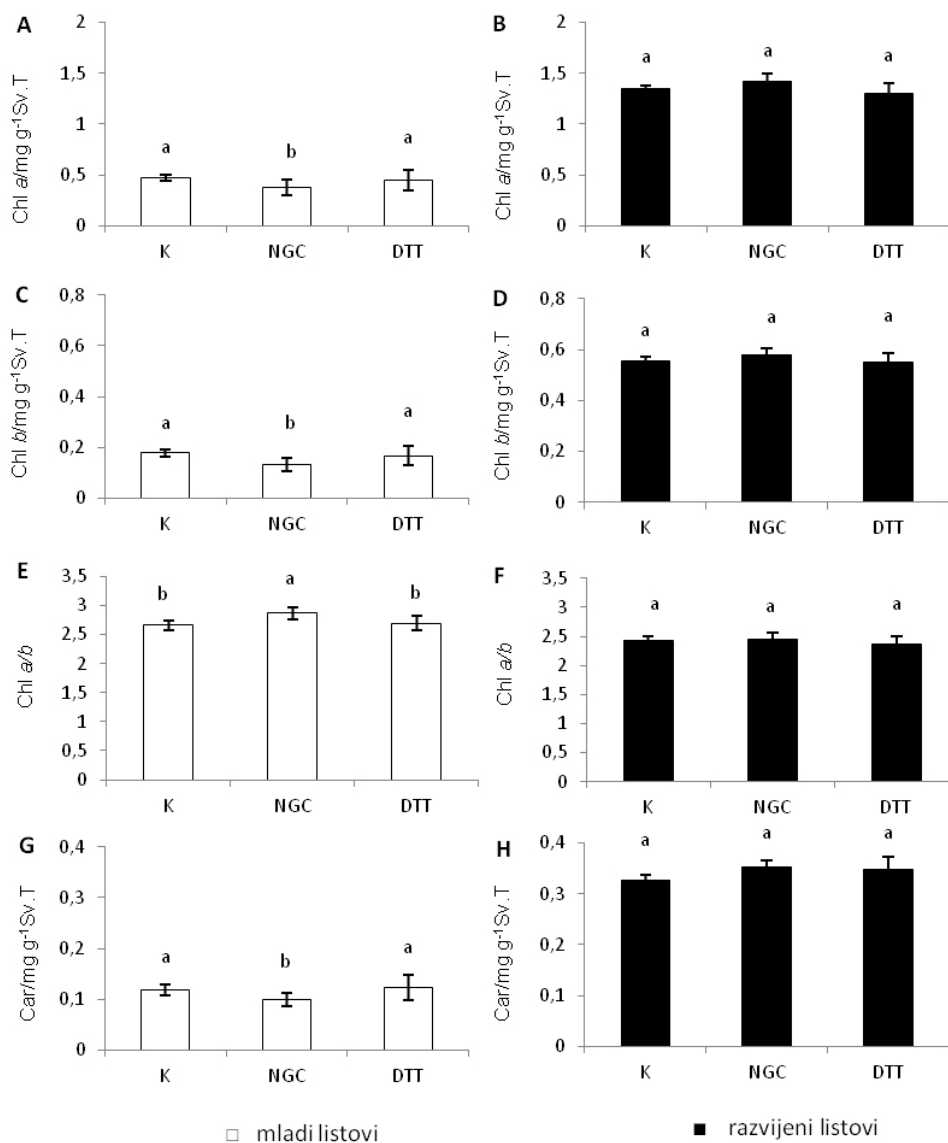
Slika 30. Srednje vrijednosti i standardne devijacije efektivnog kvantnog prinosa fotosinteze ($\Delta F/F_m'$; **A**), relativne stope elektronskog transporta (reIETR; **B**) te nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila *a* (NPQ; **C**) izmjerene nakon 30 min HL35 tretmana na lisnim diskovima mladih (**A**) i razvijениh (**B**) listova smokve sorte Zamorčica. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $p < 0,05$.

Vrijednosti parametara su prikazane kao relativne vrijednosti

5.3.5. Koncentracija fotosintetskih pigmenata

Analiza varijance, srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracija fotosintetskih pigmenata kod lisnih diskova mladih i razvijenih listova mjerenih nakon 30 min HL35 tretmana prikazuje Slika 31. Lisni diskovi mladih listova su pokazali da u koncentraciji klorofila *a* (Slika 31 A) ne postoji razlika između kontrole ($0,47 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$) i tretmana DTT-om ($0,45 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$) dok je kod tretman NGC-om ($0,38 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$) pokazao značajan pad koncentracije. Iste takve rezultate je dala i koncentracija klorofila *b* (Slika 31 C): između kontrole ($0,18 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$) i tretmana DTT-om ($0,17 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$) nije bilo razlike dok je kod tretmana NGC-om ($0,13 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$) pokazao značajan pad koncentracije. Isto se dogodilo i s koncentracijom karotenoida mladih lisnih diskova (Slika 31 E). Između kontrole ($0,12 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$) i tretmana DTT-om ($0,12 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$) nije postojala razlika u koncentraciji klorofila *a*, dok je kod tretman NGC-om ($0,10 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$) pokazao značajan pad koncentracije. Omjer Chl *a/b* (Slika 31.G) se značajno povisio samo kod tretmana NGC-om LL35 (2,87) u odnosu na predtretman (2,66).

Lisni diskovi razvijenih listova nisu pokazali razliku ni u kojem tretmanu te ni na kojoj istraživanoj koncentraciji. Dakle, koncentracija klorofila *a* (Slika 31 B) u kontroli je iznosila $1,35 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$ i u tretmanima nije bilo značajne razlike. Koncentracija klorofila *b* (Slika 31 D) u kontroli je iznosila $0,56 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$ i u tretmanima nije bilo značajne razlike. Koncentracija karotenoida (Slika 31 F) u kontroli je iznosila $0,33 \text{ mg g}^{-1} \text{ Sv.T}$ i u tretmanima nije bilo značajne razlike. Omjer Chl *a/b* (Slika 31 H) u kontroli je iznosila 2,42 i u tretmanima nije bilo značajne razlike.

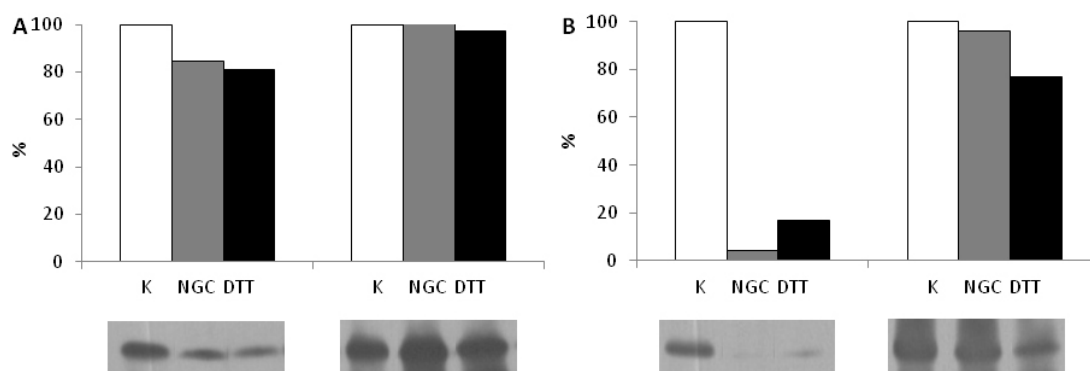


Slika 31. Srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracija klorofila a (Chl a; **A, B**), klorofila b (Chl b; **C, D**), omjera klorofila a i b (Chl a/b; **E, F**) te karotenoida (Car; **G, H**) izmjerene nakon 30 min HL35 tretmana na lisnim diskovima mladih (□; **A, C, E, G**) i razvijениh (■; **B, D, F, H**) listova smokve sorte Zamorčica. Rezultati označeni istim slovom (a, b) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $p < 0,05$. Vrijednosti parametara prikazane su u mg g⁻¹ Sv.T.

5.3.6. Količina proteina D1 i Rubisco LSU

Slika 32 prikazuje promjene u akumulaciji proteina D1 (Slika 32 A) i velike podjedinice Rubisca, LSU (Slika 32 B) nakon 30 min HL35 tretmana na lisnim diskovima mladih i razvijenih listova. Protein D1 u mladim lisnim diskovima (Slika 32 A) pokazao je najveću akumulaciju na K, dok se na tretmanu NGC-om smanjio za 15,29%, a na tretmanu DTT-om za 19,06%. Razvijeni lisni diskovi (Slika 32 A) gotovo da nisu pokazali promjenu u odnosu na K. Tretman NGC-om izazvao je povećanje akumulacije za 2,31%, dok se na tretmanu DTT-om akumulacija smanjila za 2,5%.

Velika podjedinica Rubisca na mladim lisnim diskovima (Slika 32 B) pokazala je također najveću akumulaciju K tretmanu. Tretman NGC-om je izazvao smanjenje akumulacije za 45,54%, a tretman DTT-om za 23,22%. Razvijeni lisni diskovi (Slika 32 B) su također na oba tretmana pokazala smanjenje akumulacije, no u manjem opsegu nego kod mladih listova. Tretman NGC-om je smanjio akumulaciju za 3,95%, a tretman DTT-om za 13,15%.

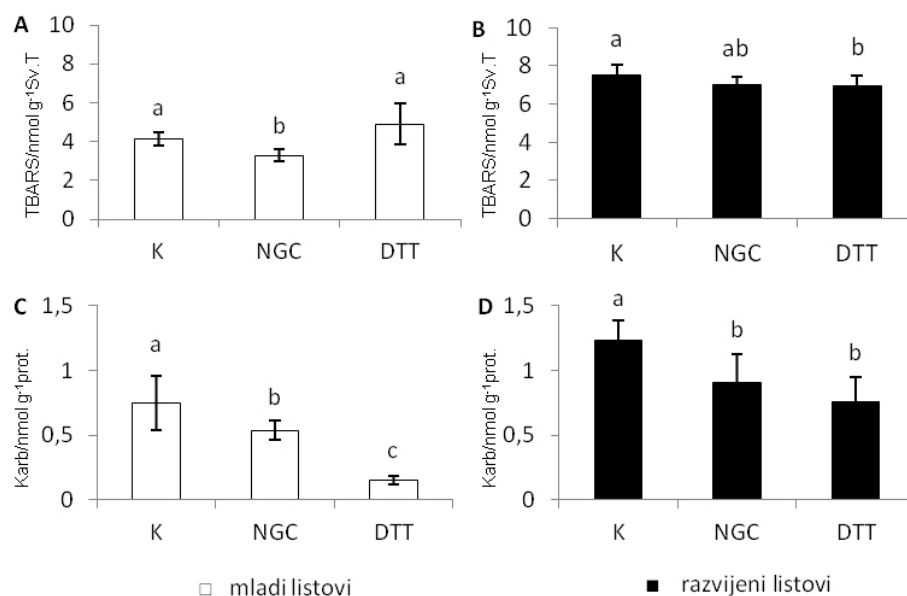


Slika 32. Promjene u akumulaciji proteina D1 (A) i Rubisco LSU (B) nakon 30 min HL35 tretmana na lisnim diskovima mladih i razvijenih listova smokve sorte Zamorčica. Vrijednosti su prikazane kao postotak promjene od početne količine izmjerene u kontrolnom tretmanu (100%).

5.3.7. Lipidna peroksidacija i proteinski karbonili

Slika 33 prikazuje srednje vrijednosti, standardne devijacije i analizu varijance koncentracija produkata peroksidacije lipida u odliku količine reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS) (Slike 33 A i 33 B) i količinu oštećenih proteina u obliku karbonilnih skupina (Slike 33 C i 33 D) je u lisnim diskovima mladih i razvijenih listovima smokve mjerene nakon 30 min HL35 tretmana. Lisni diskovi mladih listova (Slika 33 A) pokazali su značajan pad koncentracije TBARS u tretmanu NGC-om ($3,29 \text{ nmol g}^{-1} \text{ Sv.T}$) u odnosu na kontrolu ($4,13 \text{ nmol g}^{-1} \text{ Sv.T}$), dok je tretman DTT-om ($4,90 \text{ nmol g}^{-1} \text{ Sv.T}$) nije pokazao značajnu promjenu. Oštećenje proteina u obliku proteinskih karbonila (Slika 33 C) pokazalo je značajan pad oba tretmana: tretman NGC-om ($0,54 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ prot}$) i tretman DTT-om ($0,15 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ prot}$) u odnosu na kontrolu ($0,75 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ prot}$).

Lisni diskovi razvijenih listova nisu pokazali značajnu razliku koncentracije TBARS (Slika 33 B) između kontrole ($7,52 \text{ nmol g}^{-1} \text{ Sv.T}$) i tretmana NGC-om ($7,04 \text{ nmol g}^{-1} \text{ Sv.T}$), dok je tretman DTT-om ($6,95 \text{ nmol g}^{-1} \text{ Sv.T}$) pokazao značajno smanjenje koncentracije. Oštećenje proteina u obliku karbonila (Slika 33 D) pokazuju značajan pad oba tretmana: tretman NGC-om ($0,91 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ prot}$) i tretman DTT-om ($0,75 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ prot}$) u odnosu na kontrolu ($\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot}$).

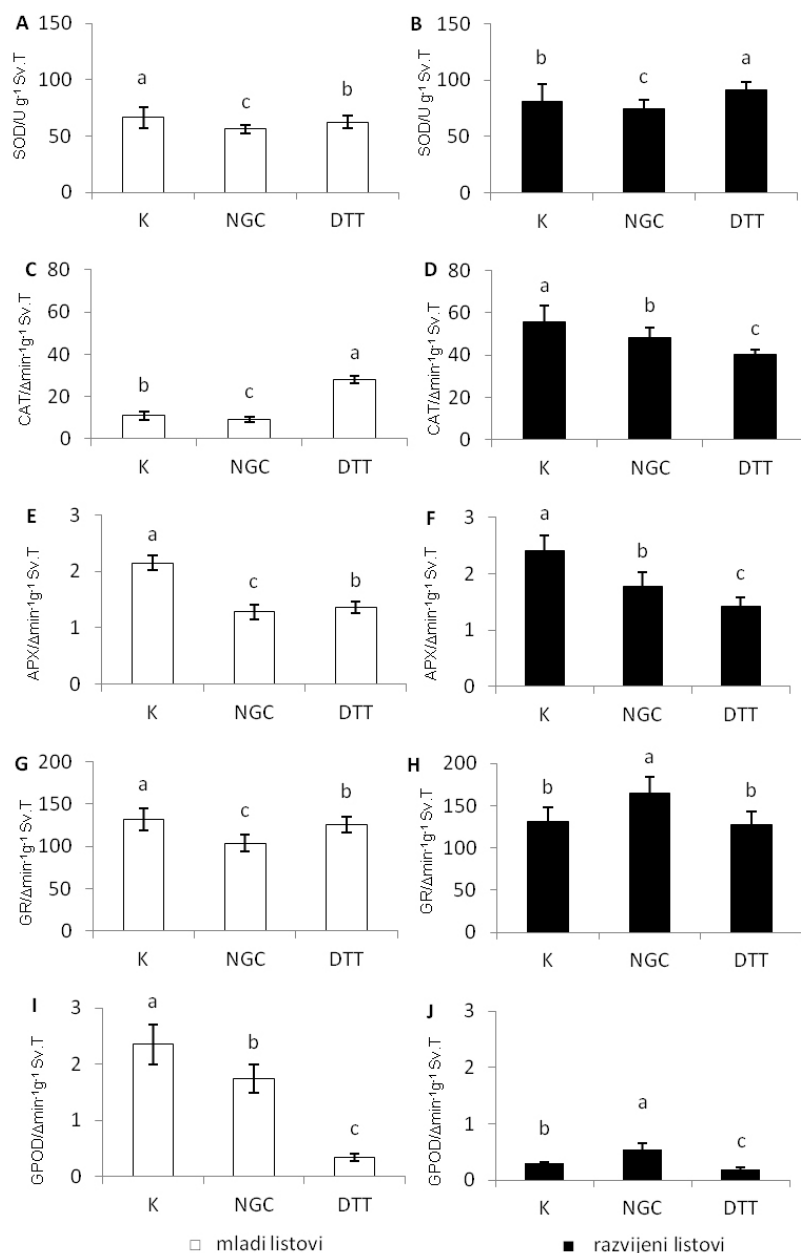


Slika 33. Srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracija produkata lipidne peroksidacije (TBARS (nmol g⁻¹ Sv.T); **A, B**) i proteinskih karbonila (Karb (nmol mg⁻¹ prot); **C, D**) izmjerene nakon 30 min HL35 tretmana na lisnim diskovima mladih (□; **A, C**) i razvijenih (■; **B, D**) listova smokve sorte Zamorčica. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), p<0,05.

5.3.8. Aktivnost antioksidativnih enzima

Analiza varijance, srednje vrijednosti i standardne devijacije aktivnosti enzima antioksidativnog odgovora mjerenih u lisnim diskovima mladih i razvijenih listova smokve mjerene nakon 30 min HL35 tretmana prikazane su na Slici 34. Aktivnost SOD mladih lisnih diskova (Slika 34 A) pokazala je značajan pad na oba tretmana u odnosu na kontrolu ($66,36 \text{ U g}^{-1} \text{ Sv.T}$), na tretmanu DTT-om na $62,26 \text{ U g}^{-1} \text{ Sv.T}$, a na tretmanu NGC-om na $56,22 \text{ U g}^{-1} \text{ Sv.T}$. Aktivnost CAT izmjerena na lisnim diskovima mladih listova (Slika 34 C) pokazala je značajan porast aktivnosti na tretmanu DTT-om ($27,93 \Delta \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ Sv.T}$), odnosno značajan pad na tretmanu NGC-om ($9,11 \Delta \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ Sv.T}$) u odnosu na kontrolu ($10,91 \Delta \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ Sv.T}$). Aktivnost APX mladih lisnih diskova (Slika 34 E) je također pokazala najvišu vrijednosti na K ($2,15 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$). Tretman DTT-om pokazao je značajan pad ($1,35 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$), a tretman NGC-om još jači pad aktivnosti ($1,28 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$). Aktivnost GR mladih lisnih diskova (Slika 34 I) ponašala se isto kao i aktivnost enzima APX. Najviše vrijednosti su bile izmjerene na K ($131,95 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$), dok su tretmani DTT-om i NGC-om pokazali značajan pad ($125,66 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$, odnosno $103,95 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$). Aktivnost GPOD mladih lisnih diskova (Slika 34 G) je pokazala najvišu vrijednost na K ($2,36 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$), a oba tretmana su pokazala značajan pad. Tretman DTT-om jači ($0,31 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$), a tretman DTT-om nešto slabiji ($1,74 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$).

Aktivnost SOD izmjerena na lisnim diskovima razvijenih listova (Slika 34 B) pokazala je značajno višu vrijednost na tretmanu DTT-om ($90,88 \text{ U g}^{-1} \text{ Sv.T}$), odnosno značajno nižu vrijednost na tretmanu NGC-om ($74,57 \text{ U g}^{-1} \text{ Sv.T}$) u odnosu na vrijednost izmjerenu u kontroli ($81,10 \text{ U g}^{-1} \text{ Sv.T}$). Aktivnost CAT (Slika 34 D) pokazala je značajan pad na oba tretmana, na tretmanu NGC-om ($48,30 \Delta \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ Sv.T}$) nešto slabiji, odnosno tretman DTT-om ($40,14 \Delta \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ Sv.T}$) nešto jači u odnosu na kontrolu ($56,00 \Delta \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ Sv.T}$). Aktivnost APX razvijenih lisnih diskova (Slika 34 F) je pokazala najvišu vrijednosti u kontroli ($2,42 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$), dok su tretmani NGC-om ($1,77 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$), a zatim i DTT-om ($1,41 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$) pokazali značajan pad aktivnosti. Aktivnost GR razvijenih lisnih diskova (Slika 34 J) je pokazala najnižu vrijednosti u kontroli ($131,89 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$). Tretman NGC-om je pokazao značajan porast ($164,69 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$), dok tretman DTT-om ($128,17 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$) nije pokazao značajnu promjenu u odnosu na K. Aktivnost GPOD razvijenih lisnih diskova (Slika 34 H) je pokazala najvišu vrijednost na tretmanu NGC-om ($0,54 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$), a tretman DTT-om ($0,19$) najnižu, dok je na kontroli ona iznosila $0,209 \Delta \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ Sv.T}$.



Slika 34. Srednje vrijednosti i standardne devijacije aktivnosti antioksidativnih enzima: superoksid dismutaze (SOD ($\text{U g}^{-1} \text{ Sv.T}$); **A, B**), katalaze (CAT ($\Delta\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1} \text{ Sv.T}$); **C, D**), askorbat peroksidaze (APX ($\Delta\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1} \text{ Sv.T}$); **E, F**), glutation reduktaze (GR ($\Delta\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1} \text{ Sv.T}$); **G, H**) i gvajakol peroksidaze (GPOD ($\Delta\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1} \text{ Sv.T}$); **I, J**) izmjerene nakon 30 min HL35 tretmana na listnim diskovima mladih (\square ; **A, C, D, E, G**) i razvijениh (\blacksquare ; **B, D, F, H, J**) listova smokve sorte Zamorčica. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $p < 0,05$.

6. RASPRAVA

6.1. DNEVNE PROMJENE FOTOSINTETSKE UČINKOVITOSTI I ANTIOKSIDATIVNOG ODGOVORA

Prilagodba biljke na određene uvjete nekog abiotičkog stresa podrazumijeva molekularne, biokemijske i fiziološke procese koji djeluju zajedno. Kombinacija tih procesa će se donekle razlikovati za svaki od okolišnih parametara. Uvjeti određenog abiotičkog tipa stresa će u biljci izazvati određeni odgovor, a kombinacija dvaju ili više različitih stresnih uvjeta može zahtijevati odgovor koji je također jedinstven. Moguće je da će određeni stresni uvjeti u kombinaciji dati proturječne ili antagonističke odgovore. Kako su biljke u prirodnom okolišu najčešće izložene kombinaciji različitih abiotičkih stresova, molekularni mehanizmi prilagodbe biljke na kombinaciju dva ili više tipova stresa još nisu u potpunosti poznati. S obzirom da se većina eksperimenata i znanstvenih studija odvija u laboratorijima u kontroliranim uvjetima, nema pouzdanih dokaza kako se biljke ponašaju u prirodnom okolišu, u nekontroliranim uvjetima (Mittler 2006; Suzuki i Mittler 2006).

Mladi listovi koji se razvijaju na vrhovima grana su najviše izloženi utjecajima okolišnih čimbenika, najčešće izrazito visokom intenzitetu svjetlosti i povišenoj temperaturi. Mehanizmi zaštite koji omogućavaju listovima da se nose s takvim visokim intenzitetom svjetlosti vrlo su aktivni tijekom rane faze razvoja listova (Krause i sur. 1995; Cai i sur. 2005; Jiang i sur. 2005; Jiang i sur. 2006a; Lepeduš i sur. 2011). Takvi uvjeti uzrokuju smanjenje fotosintetske učinkovitosti, što se još naziva fotoinhibicijom, te uključuje oštećenja i procese popravka. Stresni čimbenici tijekom izlaganja biljaka visokoj količini svjetlosti povećavaju fotoinhibitorne učinke te se inhibicija fotosinteze može smatrati indikatorom stresnih uvjeta. Fotoinhibicija može biti kratkotrajna i reverzibilna te na taj način igra zaštitnu ulogu fotosintetskog sustava (García-Plazaola i sur. 1999; Alves i sur. 2002).

Dnevne promjene na mladim i razvijenim listovima smokve u nekontroliranim uvjetima, istraživane su kako bi se utvrdila fotosintetska učinkovitost pod utjecajem visokog intenziteta osvjetljenja i povišene temperature. Mjerenjem fluorescencije klorofila *a* *in vivo* utvrđena je učinkovitost fotosintetskog aparata mladih i razvijenih listova. Slika 14 pokazuje tipične OJIP krivulje dobivene mjerenjem mladih i razvijenih listova svakih 6 sati tijekom dnevnog ciklusa. OJIP krivulja prikazuje redukciju ukupne količine akceptora elektrona fotosustava II. Intenzitet fluorescencije raste od minimalnog, F_0 (O korak), do maksimalnog intenziteta, F_m (P korak), preko dva međukoraka. Na otprilike 2 ms se nalazi J korak, a na otprilike 30 ms nalazi se I korak (Strauss i sur. 2006). Kada je OJIP krivulja iscrtana na logaritamskoj skali

vremena, ona pokazuje polifazni porast koji predstavlja postupnu redukciju specifičnih prenosioca elektrona (Strasser i sur. 2004; Joly i Carpentier 2007). Porast krivulje od O do J koraka prikazuje fotokemijsku fazu te je rezultat redukcije primarnog akceptora Q_A . J korak predstavlja trenutni maksimum reduciranog Q_A , a I korak daljnju redukciju Q_A i Q_B . Porast krivulje od J do I odgovara nastanku Q_B^- i Q_B^{2-} , dok je I-P porast povezan s postupnim gašenjem fluorescencije klorofila *a* do kojeg dolazi zbog oksidacije ukupnog plastokinona (Strasser i sur. 2004). Prema tome, ta dva koraka, J-I te I-P porast krivulje predstavljaju nefotokemijsku fazu (Strauss i sur. 2006; Joly i Carpentier 2007). P korak odgovara nastanku najveće količine Q_A^- , Q_B^{2-} i PQH_2 te predstavlja stanje PSII kada su sva reakcijska središta zatvorena (Govindjee 2004; Joly i Carpentier 2007). Oblik OJIP krivulje je vrlo osjetljiv na stres koji izazivaju promjene u okolišu (Strasser i sur. 2004). Nativne OJIP krivulje dobivene mjerenjem mladih (Slika 14 A) i razvijenih (Slika 14 B) listova u 1h, 7h i 19h pokazuju tipičan oblik kod oba tipa listova, dok krivulje pokazuju odstupanje u 13h. Krivulje su normalizirane između O i P koraka što nam daje relativnu varijabilnu fluorescenciju u bilo kojem vremenu t , V_t , a koja je mjera udjela zatvorenih reakcijskih središta PSII (Strasser i sur. 2004). Mladi listovi su pokazali 8% niže vrijednosti minimalne fluorescencije, F_0 (Tablica 3), odnosno, 32% niže vrijednosti maksimalne fluorescencije od razvijenih listova kada su mjereni u 1h. Porast parametra F_0 u 1h kod oba tipa listova ukazuje da je došlo do odvajanja povećanog broja funkcionalnih molekula klorofila od reakcijskog središta PSII (Pietrini i sur. 2005; Toth i sur. 2007). Do oštećenja fotosintetskog aparata je najvjerojatnije došlo uslijed visoke temperature koja je izazvala fotoinhibiciju (Demmig i sur. 1987; Toth i sur. 2007). Značajan pad vrijednosti parametra F_m (Tablica 3), odnosno P koraka u 13h kod oba tipa listova, indikator je inhibicije OEC aktivnosti, a s obzirom na temperaturu (oko 34°C, Slika 11) i visoki intenzitet svjetlosti (oko 1400 $\mu\text{mol}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, Slika 11) izmjerene u 13h inaktivacija je posljedica povišene temperature (Lazar 1999; Jiang i sur. 2006a), odnosno povećanog intenziteta svjetlosti (Gonçalves i sur. 2007). Krivulje normalizirane između O i P koraka pokazuju značajna odstupanja u J koraku i kod mladih i kod razvijenih listova već u 7h, dok je u 13h to odstupanje jače. Varijabilna fluorescencija u J koraku (V_J , Tablica 3) prikazuje dio reakcijskih središta PSII koja se zatvore tijekom jedne razdiobe naboja (engl. *single charge separation*). Odnosno, V_J je izraz vjerojatnosti s kojom će uhvaćeni eksciton pogurati elektron u transportni lanac elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A . (Strasser i sur. 2004). U slučaju kada je reoksidacija Q_A^- ograničena, V_J će porasti te će dovesti do smanjenja vrijednosti parametra ET_0/TR_0 . Porast vrijednosti varijabilne fluorescencije na I koraku (V_I , Tablica 3) kod mladih listova je najvjerojatnije posljedica akumulacije reduciranog Q_A^- koja je uslijedila zbog nemogućnosti daljnjeg prijenosa elektrona. Razvijeni listovi pokazali su izrazitiji pad parametra V_I u 13h što je indikator reduciranog transporta elektrona na akceptorskoj strani

PSII najvjerojatnije uslijed djelovanja visokog intenziteta svjetlosti. Jiang i suradnici (2006a) su također dobili niže vrijednosti ovog parametra (V_I) na razvijenim listovima brijesta (*Ulmus pumila* L.) i utvrdili da mladi listovi sadrže više razine Q_B ne-reducirajućih reakcijskih središta tijekom početne faze rasta lista te su oni odgovorni za nizak transport elektrona iza primarnog akceptora. Q_B ne-reducirajuća reakcijska središta ne mogu reducirati Q_B te se još nazivaju i neaktivna reakcijska središta. Postojanje ovakvih središta upućuje na heterogenost PSII na njegovoj reducirajućoj strani (Lazar 1999). To je najvjerojatnije slučaj i kod mladih listova smokve kod kojih su izmjerene više vrijednosti V_I parametra (Tablica 3). Tomek i suradnici (2003) su pak na mladim listovima graška (*Pisum sativum* L.) pokazali da količina Q_B ne-reducirajućih reakcijskih središta ovisi o intenzitetu svjetlosti. Visoki intenzitet svjetlosti (oko $1400 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) i povišena temperatura (oko 34°C) izmjereni u 13h (Slika 11) utjecali su na porast parametra V_I (Tablica 3) na oba tipa listova što ukazuje na smanjeni transport elektrona na akceptorskoj strani PSII, odnosno iza primarnog akceptora.

Koliko puta se Q_A reducira, odnosno koliko puta se reakcijska središta PSII zatvore i ponovno otvore između F_0 i F_m , definiran je prometnim brojem N (Tablica 3). Ponovno otvaranje reakcijskih središta zahtjeva prijenos elektrona s Q_A^- na sekundarni akceptor PSII, Q_B (Strasser i sur. 2000). Mladi listovi pokazali su niže vrijednosti prometnog broja nego razvijeni listovi. Također, pokazali su značajan pad vrijednosti tijekom dana, za razliku od razvijenih listova koji su za vrijeme najjačeg osvjetljenja pokazali značajan porast parametra N . Smanjeni protok elektrona s Q_A^- na Q_B ukazuje na povećanu akumulaciju Q_A^- kod mladih listova već u 13h (Tablica 3), dakle u vrijeme najjačeg osvjetljenja (Slika 11). S druge strane, porast prometnog broja (Tablica 3) kod razvijenih listova ukazuje na to da je kod razvijenih listova došlo do povećanog protoka elektrona na sekundarni akceptor. Također, normalizirana komplementarna površina iznad OJIP krivulje S_m (Tablica 3), što je mjera energije koja je potrebna da se sva reakcijska središta zatvore (Strasser i sur. 2004), pokazala je smanjenje kod mladih listova već u 7h, dok su razvijeni listovi pokazali tek neznatno smanjenje u kasno poslijepodne. Sličan trend kao i parametar S_m pokazao je i parametar t_{max} (Tablica 3). Mladi su listovi pokazali pad vrijednosti t_{max} u 13h, dok su razvijeni listovi pokazali smanjenje tek u kasno poslijepodne (Tablica 3). Parametar t_{max} je vrijeme koje je potrebno da se postigne maksimalni intenzitet fluorescencije (Strasser i sur. 2004). Vrijeme postizanja maksimalne vrijednosti fluorescencije je kraće što je manja mjera energije potrebna da se zatvore sva reakcijska središta, te će i signal indukcijske krivulje brže postići maksimalnu vrijednost. Doći će do prijenosa manjeg broja elektrona s Q_A^- u transportni lanac elektrona. Mladi listovi su pokazali niže vrijednosti parametara t_{max} , S_m i N u odnosu na razvijene listove što ukazuje na to da se Q_A u mladim listovima može reducirati, ali ne i

reoksidirati učinkovito kao u razvijenim listovima. To znači da se reakcijska središta PSII kod mladih listova ne mogu više puta otvoriti i zatvoriti. Katanić i suradnici (2012) su na vegetativnim pupovima smreke (*Picea abies* (L.) Karsten) također dobili niže vrijednosti parametara N , S_m i S_m/t_{max} u odnosu na razvijene iglice. Keren i suradnici (2005) objašnjavaju da do nemogućnosti višestrukog otvaranja i zatvaranja reakcijskih središta dolazi uslijed nepotpuno izgrađene donorske i/ili akceptorske strane PSII. S obzirom da su mladi listovi smokve pokazali smanjeni prijenos elektrona u transportnom lancu elektrona dalje od Q_A (Tablica 3), najvjerojatnije je da akceptorska strana PSII nije u potpunosti izgrađena.

Maksimalni kvantni prinos PSII ($F_v/F_m = TR_0/ABS$) izračunava se na temelju početne, minimalne i krajnje, maksimalne vrijednosti intenziteta fluorescencije, F_0 i F_m , te je mjera učinkovitosti primarne fotokemije PSII (Strasser i sur. 2000). Ukoliko se vrijednosti ovog parametra kreću između 0,75 i 0,85, smatra se da je fotosintetski aparat funkcionalan (Bolhar-Nordenkampf i sur. 1989). I mladi i razvijeni listovi, mjereni u 1h, pokazali su vrijednosti više od 0,75 (Slika 15 A). Mladi listovi su pokazali da je početna vrijednost F_v/F_m , izmjerena u 1h, 7% niža nego u razvijenim listovima, što znači da primarna fotokemija PSII nije ograničavajući korak fotosintetske aktivnosti tijekom razvoja. Slično su pokazali i Lepeduš i suradnici (2005) u vegetativnim pupovima i razvijenim iglicama smreke gdje su plastidi vegetativnih pupova pokazali postojanje funkcionalnog PSII, no već niži intenzitet osvjetljenja dovodi do smanjenja stope transporta elektrona. Jiang i suradnici (2006a) pratili su promjenu fotosintetske učinkovitosti tijekom razvoja mladih listova do njihove pune veličine. Listove su uzorkovali rano ujutro (u 7h) kako bi izbjegli utjecaj visokog intenziteta svjetlosti i visoke temperature na funkcioniranje listova. Nešto niži fotosintetski kapacitet u mladim listovima pripisali su različitim razvojnim stadijima PSII kompleksa tijekom razvoja lista, a ne fotoinhibiciji. Shirke i Pathre (2003) su na mladim i razvijenim listovima tropske vrste iz roda *Prosopis* L. pokazali da je fotoinhibicija u podnevnim satima u potpunosti reverzibilna te da je to podnevno smanjenje fotosintetske učinkovitosti rezultat međusobnog djelovanja visokog intenziteta svjetlosti i temperature. Također su pokazali da je do oporavka došlo uslijed učinkovitog mehanizma zaštite koji uključuje otpuštanje suvišne pobudne energije preko ksantofilskog ciklusa i NPQ-a. Kod oba tipa listova vrijednost F_v/F_m se značajno se smanjila kada je izmjerena u 13h (Slika 15 A). To je u skladu s dobivenim rezultatima. Niže vrijednosti maksimalnog kvantnog prinosa mladih listova mjerenih u 1h ukazuju na postojanje PSII kompleksa koji nisu u potpunosti funkcionalni jer su u različitim razvojnim stadijima, no usprkos tome pokazuju sposobnost popravka nakon fotoinhibitornog utjecaja visokog intenziteta svjetlosti i povišene temperature tijekom podneva. Mladi su listovi pokazali jači pad u odnosu na razvijene listove, no oba tipa listova imala su vrijednosti niže

od 0,75 što ukazuje da PSII nije bio potpuno funkcionalan u vrijeme najjačeg osvjetljenja, odnosno da je došlo do fotoinhibicije. Najčešći uzrok smanjenja F_v/F_m vrijednosti jest fotoinhibicija uzrokovana visokim intenzitetom svjetlosti u kombinaciji s visokom temperaturom (Krause i sur. 1995; Lichtenthaler i Burkart 1999). U tom slučaju dolazi do prilagodbe ili pak do zaštite što se očituje u modifikaciji komponenta fotosintetskog aparata, odnosno, uključuju se mehanizmi koji će smanjiti oštećenja (Ragni i sur. 2008). Uz značajno smanjenje učinkovitosti PSII (Slika 15 A), mladi su listovi u 13h pokazali značajan porast koncentracije karotenoida (Slika 18 D) dok se nefotokemijsko gašenje fluorescencije klorofila a (Tablica 4) nije značajno mijenjalo. U 19h došlo je do povećanja maksimalnog kvantnog prinosa PSII no ono je bilo djelomično u odnosu na početne vrijednosti izmjerene u 1h te sporije nego kod razvijenih listova. Slično su se ponašale i stanice alge *Emiliana huxleyi* (Lohm.) Hay i Mohler prilagođene na visoki intenzitet svjetlosti te su unatoč višoj koncentraciji karotenoida i bržem nastanku NPQ-a pokazale jači intenzitet fotoinhibicije. Istovremeno su pokazale sporiji i samo djelomični oporavak od fotoinhibicije (Ragni i sur. 2008). S druge strane, razvijeni su listovi pokazali porast koncentracije karotenoida (Slika 18 D) već u 7h, uz istovremeni porast NPQ-a (Tablica 4) što ukazuje na uravnotežene fotosintetske procese tijekom zaštite od visokog intenziteta svjetlosti, najvjerojatnije zbog prilagodbe razvijenih listova na pojačani intenzitet svjetla (Lichtenthaler i Burkart 1999; Ragni i sur. 2008).

Kvantni prinos elektronskog transporta (ET_0/ABS , Slika 15 C) i učinkovitost kojom „uhvaćeni“ eksciton omogućava prijenos elektrona u elektronskom transportnom lancu dalje od Q_A (ET_0/TR_0 , Slika 15 B) pokazali su niže vrijednosti u mladim listovima u odnosu na razvijene. Također, mladi su listovi pokazali značajno smanjenje obiju vrijednosti mjerene u 13h u odnosu na one izmjerene u 1h. Poznato je da razvijeni listovi posjeduju manji udio Q_B ne-reducirajućih reakcijskih središta (Schansker i Strasser 2005a) što se slaže s dobivenim rezultatima. Niže vrijednosti parametara ET_0/ABS i ET_0/TR_0 mladih listova ukazuju da je aktivnost elektronskog transporta dalje od Q_A značajno onemogućena te da posjeduju više razine Q_B ne-reducirajućih reakcijskih središta što sprečava funkcionalni prijenos elektrona između Q_A i Q_B . Povećanje ovih vrijednosti u 19h na oba tipa listova ukazuje na pretvorbu Q_B ne-reducirajućih središta u funkcionalna (Jiang i sur. 2006a), iako su mladi listovi opet pokazali sporiji oporavak. Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da mladi listovi imaju nešto manje funkcionalan prijenos elektrona u transportnom lancu dalje od Q_A nego razvijeni te da je visoki intenzitet svjetlosti i povišena temperatura u 13h izazvala fotoinhibiciju na oba tipa listova. Iako je ta fotoinhibicija u oba tipa listova bila reverzibilna kako se smanjivao intenzitet

svjetlosti i temperatura, mladi listovi su ipak pokazali veću osjetljivost na takve uvjete u okolišu.

Izračuni specifičnih protoka energije daju nam uvid u raspodjelu energije kroz PSII na razini reakcijskog središta. Ovi parametri uzimaju u obzir samo aktivna reakcijska središta, odnosno ona središta koja mogu reducirati Q_A (Strasser i sur. 2004). Mladi listovi su pokazali 32% višu apsorpciju po aktivnom reakcijskom središtu (ABS/RC, Slika 16 A) od razvijenih listova. Apсорpcija se odnosi na onaj protok fotona koji antena pigmenti apsorbiraju nakon čega nastaje pobuđeni klorofil (Chl^*). Odnosno, ovaj parametar izražava ukupnu količinu svjetlosti koju molekule klorofila mogu apsorbirati podijeljenu s brojem aktivnih reakcijskih središta (Strasser i sur. 2000; Strasser i sur. 2004) te daje podatak o funkcionalnoj veličini antena PSII (Yusuf i sur. 2010). Kod oba tipa listova, apсорpcija se povećala u 13h, kada je intenzitet svjetlosti bio najjači. To povećanje apсорpcije popraćeno je povećanjem protoka uhvaćenih fotona (TR_0/RC , Slika 16 B) uz istovremeni pad F_v/F_m vrijednosti (Slika 15 A) što ukazuje da je došlo do inaktivacije dijela reakcijskih središta. Do inaktivacije je najvjerojatnije došlo dijelom zbog neaktivnih OEC kompleksa na što ukazuje smanjena vrijednost F_m parametra (Tablica 3), a dijelom zbog strukturalne transformacije reakcijskih središta u tzv. „tihan“ središta (engl. *silent centers*) (Strasser i sur. 2004; Yusuf i sur. 2010). To je u suglasnosti i s povećanim vrijednostima DI_0/RC izmjerenim u 13h (Slika 16 D) s obzirom da „tihan“ središta posjeduju modificiranu strukturu koja učinkovito hvata pobudnu energiju, no ne otpušta ju u obliku fluorescencije već ju isključivo rasipa u obliku topline (Strasser i sur. 2004; Gonçaves i sur. 2007). Također, mladi listovi su pokazali gotovo 25% manju gustoću aktivnih reakcijskih središta (RC/CS_0 , Slika 15 D). S obzirom da je prijenos elektrona između Q_A^- i Q_B inhibiran, do porasta ABS/RC došlo je uglavnom zbog inaktivacije reakcijskih središta koja prelaze u „tihan“ (Eullaffroy i sur. 2009; Yusuf i sur. 2010). Također, porast ABS/RC (Slika 16 A), koji je vidljiv u 13h kod oba tipa listova, pretpostavlja smanjenu regulaciju u prijenosu apsorbirane energije do reakcijskih središta (Force i sur. 2003).

Protok uhvaćenih fotona po aktivnom reakcijskom središtu (TR_0/RC , Slika 16 B), koji vodi do redukcije Q_A pokazao je 23% veće vrijednosti u mladim listovima. Značajan je i porast ovog parametra izmjeren u 13h. Porast ABS/RC (Slika 16 A) i TR_0/RC (Slika 16 B) nisu popraćeni i porastom elektronskog transporta iza Q_A^- (ET_0/RC , Slika 16 C). Upravo suprotno, mladi listovi su pokazali 16% niže vrijednosti ovog parametra od razvijenih listova. Mladi listovi pokazali su i značajan pad vrijednosti ET_0/RC odmah po pojavi svjetlosti, dok je najjači pad je bio izmjeren u 13h. Dio apsorbirane energije u najvećem dijelu otpušta se u obliku topline, a manji dio u obliku fluorescencije. Drugi dio prevodi se do reakcijskih središta kao protok

uhvaćenih fotona (TR_0) te služi za redukciju primarnog akceptora elektrona Q_A u Q_A^- koji se može reoksidirati i na taj način potaknuti transport elektrona (ET_0) dalje od Q_A^- (Strasser i sur. 2004). Na ET_0/RC utječe protok uhvaćenih ekscitona koji onemogućavaju redukciju Q_A u Q_A^- (TR_0/RC) te vjerojatnost da će uhvaćeni eksciton pomaknuti elektron dalje od Q_A^- u elektron transportnom lancu (ET_0/TR_0) (Force i sur. 2003; Strasser i sur. 2004). Povećanje nefotokemijskog rasipanja po reakcijskom središtu (DI_0/RC , Slika 16 D) u mladim listovima mjerenim u 13h slaže se sa smanjenjem ET_0/RC (Slika 16 C) za vrijeme najjačeg osvjetljenja. Ako je elektronski transport ograničen, samo dio energije koju apsorbiraju LHC PSII može biti učinkovito upotrijebljena za fotosintezu, odnosno, stvara se veća količina prekomjerne pobudne energije. Kako bi se izbjeglo oštećenje fotosintetskog aparata, aktivira se zaštitni mehanizam koji omogućuje bezopasnu pretvorbu prekomjerne energije u toplinu. Povećanje DI_0/RC i ABS/RC , te smanjenje RC/CS_0 i F_v/F_m u 13h ukazuju na inaktivaciju reakcijskih središta (Slika 16). Također, TR_0/RC (Slika 16 B) je pojačan što ukazuje da antene neaktivnih reakcijskih središta dio apsorbirane energije otpuštaju nefotokemijskim putem što je pak povećalo DI_0/RC (Slika 16 D) (Nussbaum i sur. 2001). Otpuštanje apsorbirane energije nefotokemijskim putem također ukazuju na prisutnost Q_A ne-reducirajućih, odnosno „tihih“ središta (Strasser i sur. 2004; Yusuf i sur. 2010). Takva djelomična inaktivacija može se pripisati fotoinhibiciji. Neaktivna reakcijska središta utječu na smanjenje fotosintetske učinkovitosti, s obzirom da se vrijednost F_v/F_m (Slika 15 A) značajno spustila u 13h kada je osvjetljenje bilo najjače i temperatura najviša.

Indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) je pouzdani pokazatelj vitalnosti i fotosintetske učinkovitosti kod biljaka te je vrlo osjetljiv indikator fiziološkog stanja biljke. (Strauss i sur. 2006; Christen i sur. 2007). Indeks fotosintetske učinkovitosti je znatno osjetljiviji parametar od maksimalnog kvantnog prinosa fotosinteze (F_v/F_m) jer na PI_{ABS} utječu promjene tijekom porasta fluorescencije između dva ekstremna događaja, F_0 i F_m , dok na F_v/F_m utječu samo promjene u vrijednosti tih ekstrema (Nussbaum i sur. 2001; van Heerden i sur. 2007). PI_{ABS} uključuje tri parametra pogodna fotosintetskoj aktivnosti: RC/ABS (gustoća reakcijskih središta na osnovi količine klorofila, a koji je izračunat kao udio klorofila reakcijskih središta i antena), TR_0/DI_0 (omjer protoka uhvaćene i rasipane energije koji doprinose svjetlosnim reakcijama primarne fotokemije) i $ET_0/(TR_0-ET_0)$ (elektronski transport dalje od Q_A^-) (Tsimilli-Michael i sur. 2000; Strasser i sur. 2004; van Heerden i sur. 2007). Mladi listovi su pokazali gotovo 75% niže PI_{ABS} vrijednosti (Slika 17 A) od razvijenih što ukazuje da mladi listovi imaju smanjenu fotosintetsku učinkovitost. Također, mladi listovi pokazali su značajan pad od 85% u odnosu na početnu vrijednost fotosintetske učinkovitosti izmjerene u 1h. PI_{ABS} izmjeren u 13h kod razvijenih listova pokazao je pad od 73% u odnosu na početnu vrijednost izmjerenu

u 1h. Smanjenje u 13h je posljedica smanjenja vrijednosti tri parametra koja čine PI_{ABS} . Mladi listovi pokazali su 37% niže vrijednosti RC/ABS (Slika 16 B), odnosno 40% niže vrijednosti parametra $ET_0/(TR_0-ET_0)$ (Slika 17 C), dok je TR_0/DI_0 (Slika 17 D) pokazao 62% niže vrijednosti što je glavni uzrok smanjenja fotosintetske učinkovitosti mladih listova u 13h. Razvijeni listovi pokazali su pad u sva tri parametra; RC/ABS se smanjio za 33%, TR_0/DI_0 za 48%, a $ET_0/(TR_0-ET_0)$ 22%. To znači da su sva tri parametra podjednako utjecala na pad fotosintetske učinkovitosti razvijenih listova. Iz ovih rezultata može se zaključiti da su mladi listovi podložniji fotoinhibiciji (Thach i sur. 2007). Oporavak fotosintetske učinkovitosti na oba tipa listova bio je djelomičan, s obzirom da su se vrijednosti, nakon fotoinhibicije u 13h, vratile na vrijednosti izmjerene u 7h što ukazuje da i mladi i razvijeni listovi posjeduju funkcionalni mehanizam za popravak neaktivnih reakcijskih središta (Thach i sur. 2007). Također, postoji vjerojatnost da fotosintetski aparat nije bio oštećen, već da je njegovo funkcioniranje bilo samo smanjeno (van Heerden i sur. 2007). Više vrijednosti parametra PI_{ABS} razvijenih listova tijekom dnevnih promjena ukazuju na to da oni puno bolje iskorištavaju energiju u fotosintetskim procesima, odnosno lakše se prilagođavaju promjenjivim okolišnim uvjetima (Gonçalves i sur. 2007).

Smokva sorte Fico della Madonna pokazala je vrlo slične rezultate mjerenja tijekom dnevnog ciklusa (Tablice 9, 10, 11 i 12 u Prilogu). Manja odstupanja u statistici nekih parametara nisu utjecala na krajnji zaključak.

Mjerenjem fluorescencije klorofila *a* metodom saturacijskog pulsa utvrđena je učinkovitost fotosintetskog aparata mladih i razvijenih listova (Tablica 4); maksimalni (F_v/F_m) i efektivni ($\Delta F/F_m'$) kvantni prinos PSII, relativni elektronski transport (relETR) te nefotokemijsko gašenje fluorescencije klorofila *a* (NPQ). Količina svjetlosti u okolišnim uvjetima može varirati tijekom dana i biljke su morale razviti brojne biokemijske i razvojne odgovore na promjenjivu količinu svjetlosti kako bi mogle normalno fotosintetizirati i rasti. Različiti stresni uvjeti uzrokuju poremećaj u radu fotosintetskog aparata (Muller i sur. 2001; Lichtenthaler i sur. 2004). Za mlade listove koji se razvijaju, već nizak intenzitet svjetlosti može zasiti fotosintetski aparat u toj mjeri da ih čini iznimno osjetljivima na fotoinhibiciju (Cai i sur. 2005). Efektivni prinos fluorescencije ($\Delta F/F_m'$, Tablica 4) daje nam podatak o količini apsorbirane energije koja se koristi u fotokemijskim reakcijama i kao takav može nam dati mjeru linearnog transporta elektrona. To je pokazatelj stvarne fotosintetske učinkovitosti uzorka koji je prilagođen na svjetlost (Maxwell i Johnson 2000; Rohacek 2002; Shirke i Pathre 2003; Guo i sur. 2009). Efektivni prinos fluorescencije mjeren je na tri svjetlosna koraka, pri količini svjetlosti od 50, 250 i 800 $\mu\text{mol}_{\text{FOTONAM}}^{-2}\text{s}^{-1}$. Razvijeni su listovi pokazali više vrijednosti

$\Delta F/F_m'$ (Tablica 4) nego mladi listovi. Maksimalni kvantni prinos fluorescencije te efektivni prinos na $50 \mu\text{mola}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pokazao je značajno sniženje u oba tipa listova u 13h, dok na višim intenzitetima svjetlosti, razlike u $\Delta F/F_m'$ izmjenom u 7 i 13h nije bilo. Više vrijednosti razvijenih listova pretpostavljaju da razvijeni listovi, za razliku od mladih, imaju sposobnost iskorištavanja veće količine apsorbirane energije u fotokemijskim procesima. Niži kvantni i efektivni prinos mladih listova povezan je s većom količinom energije koja se otpušta u obliku topline nefotokemijskim procesima koji se prikazuje u obliku nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila a (NPQ) (Muller i sur. 2001; Cai i sur. 2005). Mladi listovi imali su značajno više vrijednosti NPQ-a (Tablica 4) na višim intenzitetima svjetlosti (200 i $800 \mu\text{mola}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) što ukazuje da mladi listovi imaju sposobnost rasipanja pobudne energije koja je u suvišku, odnosno, mladi su listovi sposobniji rasipati veću količinu apsorbirane energiju u obliku topline nego razvijeni listovi. Brojna istraživanja također pokazuju slično; razvijeni listovi veći postotak apsorbirane energije iskorištavaju u fotokemijskim reakcijama, dok mladi listovi više energije rasipaju nefotokemijskim procesima (Cai i sur. 2005; Jiang i sur. 2005; Lepeduš i sur. 2011). Mjerenje efektivnog prinosa fluorescencije u 13h pokazalo je da mladi listovi (Tablica 4) na 50 i $250 \mu\text{mola}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pokazuju značajno niže vrijednosti NPQ u odnosu na vrijednosti izmjerene u 7h, dok je kod razvijenih listova značajno niža vrijednost izmjerena tek na $800 \mu\text{mola}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. NPQ mjeren na $800 \mu\text{mola}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ nije pokazao razliku u 7 i u 13h kod mladih listova, što ukazuje na to da mladi listovi ne mogu učinkovito upotrijebiti višak fotona već ih rasipaju u obliku topline (Jiang i sur. 2005). Uz to, zabilježeno je i povećanje koncentracije karotenoida (Slika 18 D) u 13h koje je u skladu s pojačanim gašenjem fluorescencije klorofila a (Cai i sur. 2005; Tewari i sur. 2007). Zaštitni mehanizmi protiv oštećenja izazvanih visokim intenzitetom svjetlosti uključuju povećano nefotokemijsko gašenje pomoću pigmenata ksantofilskog ciklusa i istovremenog stvaranja ROS te njihovog učinkovitog uklanjanja (Demmig-Adams i Adams 1996; Foyer i sur. 1997). Razvijeni listovi mjereni u 13h, na najvišem intenzitetu svjetlosti nisu uspjeli postići razinu NPQ (Tablica 4) koju su postigli u 7h, što znači da oni čak i pri visokim intenzitetima svjetlosti mogu učinkovito upotrijebiti apsorbiranu svjetlosnu energiju. Istovremeno, razvijeni su listovi pokazali nižu koncentraciju karotenoida u 13h u odnosu na 7h (Slika 18 D). Cai i suradnici (2005) pokazali su da rast listova snažno utječe na fotokemijske i nefotokemijske karakteristike. Na različito starim listovima tri tropske vrste (*Anthocephalus chinensis* (Lam.) Rich. ex Walp., *Litsea pierrei* var. *semois* Liou i *L. dilleniifolia* Py. Pai. i Ph.) pokazali su da mladi listovi puno učinkovitije rasipaju suvišnu energiju nego razvijeni te su pokazali veću sposobnost redukcije Q_A , najvjerojatnije kao rezultat rasipanja suvišne energije termalno. Mladi listovi pokazali su niži reLETR od razvijenih listova (Tablica 4). Na visoku relativnu stopu elektronskog transporta (reLETR) utjecale su vrijednosti efektivnog prinosa fotosinteze.

Postoji dobro poznata linearna povezanost između ta dva parametra pod uvjetom da postoji podjednaka razdioba energije između PSII i PSI (Maxwell i Johnson 2000; Schreiber 2004). Pri nižim intenzitetima svjetlosti, kvantni prinos fotosinteze je maksimalan, a količina svjetlosti koja će zasititi fotosintetski aparat dati će mjeru fotosintetskog kapaciteta, odnosno relativnog transporta elektrona. Povišenje reIETR odgovara povećanju količine aplicirane svjetlosti odnosno povećanju intenziteta svjetlosti u okolišu (Winter i Lesch 1992; Shirke i Pathre 2003). Što je intenzitet svjetlosti viši, to je linearna ovisnost manja (Oquist i Chow 1992; Schreiber 2004).

Dnevne promjene u koncentraciji fotosintetskih pigmenata prikazane su na Slici 18. Mladi listovi pokazali su niže koncentracije svih istraživanih pigmenata nego razvijeni. To je u skladu s prijašnjim istraživanjima koja su pokazala iste rezultate (Krause i sur. 1995; Jiang i sur. 2005; Jiang i sur. 2006a; Lepeduš i sur. 2011). Oba tipa listova su pokazala fluktuacije u koncentraciji pigmenata tijekom dana. Razvijeni listovi su već pojavom svjetlosti, u 7h pokazali značajan porast koncentracije klorofila *a* (Slika 18 A) i Chl *b* (Slika 18 B), kao i karotenoida (Slika 18 C), da bi se ta koncentracija klorofila *a* i karotenoida smanjila na početnu razinu u 13h, kada je intenzitet svjetlosti bio najjači. Mladi su listovi pokazali značajan porast tek u 13h, nakon čega se koncentracija smanjila na početnu razinu. Porast koncentracije klorofila *a* u mladim listovima u 13h se podudara s prijašnjim istraživanjima na smokvi. Winter i Lesch (1992) su na nekoliko vrsta, uključujući i smokvu (*Ficus carica* L.), izmjerili povećane koncentracije Chl *a* i Chl *b* oko podneva. Također su pokazali da je tijekom dana došlo do promjene u sastavu ukupnih karotenoida. Povećanje koncentracije Chl *a* i Chl *b* u razvijenim listovima na niskom intenzitetu svjetlosti najvjerojatnije su prilagodba fotosintetskog aparata na niži intenzitet svjetlosti, odnosno povećanje koncentracije fotosintetskih pigmenata omogućilo je optimalnu razinu fotosinteze (Lichtenthaler i Burkart 1999; Beisel 2010). Smanjenje koncentracije klorofila *a* kod razvijenih listova u 13h podržavaju brojni radovi koji govore u prilog smanjenju koncentracije u stresnim uvjetima, naročito u uvjetima svjetlosnog stresa (Jagtap i sur. 1998; Logan i sur. 1998; Golan i sur. 2006). Ovo smanjenje je najvjerojatnije posljedica fotoinhibitornih procesa i smanjenja fotosintetske aktivnosti. Gubitak klorofila posljedica je stresa izazvanog pojačanim intenzitetom svjetlosti, a fotosintetski aparat se nakon toga mora sintetizirati *de novo*. Dakle, smanjenjem klorofila smanjena je mogućnost dodatnog oštećenja uslijed stvaranja štetnih ROS-a. To je u suglasnosti s rezultatima dobivenim na mladim i razvijenim listovima vrste *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Jung 2004b). Mladi listovi pokazali su značajan porast svih istraživanih pigmenata u 13h što je vjerojatno prilagodba mladih listova na promjenjive uvjete u okolišu. I pojačana apsorpcija (ABS/RC, Slika 16 A) je vjerojatno posljedica povećane

koncentracije klorofila *a* i *b* (Slike 18 A i 18 B). Povećanje koncentracije karotenoida u 13h (Slika 18 C) je zaštitni mehanizam s obzirom da karotenoidi djeluju kao neenzimatski čistači ROS-a. Također, imaju i zaštitnu ulogu jer rasipanjem suvišne svjetlosne energije štite fotosintetski aparat od oštećenja koje bi uzrokovalo visoki intenzitet svjetlosti (Krause i sur. 1995; Tewari i sur. 2007; Gill i Tuteja 2010).

LHCII sadrži oko polovice ukupnih pigmenata (Chl *a+b*) i gotovo cjelokupnu količinu Chl *b* u tilakoidnim membranama razvijenih listova te se promjene u akumulaciji LHCII odražavaju u promjeni omjera Chl *a/b* i obratno. Prema tome, omjer Chl *a/b* smatra se indikatorom količine LHCII u tilakoidnim membranama (Busheva i sur. 1991). Mladi listovi su pokazali viši omjer Chl *a/b* (Slika 18 D) nego razvijeni listovi što se slaže s prijašnjim istraživanjima (Yoo i sur. 2003; Lepeduš i sur. 2011). Niži omjer Chl *a/b* u razvijenim listovima pretpostavlja povećanu akumulaciju LHCII. Mladi listovi nisu pokazali značajne promjene omjera klorofila tijekom dana za razliku od razvijenih listova. Ranija istraživanja pokazala su da je omjer klorofila, koji reflektira i promjene u akumulaciji LHCII proteinskih kompleksa podložan dnevnim promjenama, no isto tako te promjene mogu biti izrazito male te ih je teško detektirati (Busheva i sur. 1991; Riesselmann i Piechulla 1992).

Protein D1 jedan je od ključnih proteina fotosintetskog aparata i iznimno je osjetljiv na stresne uvjete, naročito na povećani intenzitet svjetlosti. S povećanjem intenziteta svjetlosti, povećava se i fosforilacija D1 proteina nakon čega slijedi degradacija, zatim sinteza proteina *de novo* te na kraju ugradnja proteina u PSII (Kato i Sakamoto 2009; Khatoon i sur. 2009; Chen i sur. 2012; Tikkanen i Aro 2012). Ta izmjena je direktno povezana s *in vivo* fotoinhibicijom PSII (Aro i sur. 1993; Booij-James i sur. 2002; Guo i sur. 2009; Keren i Krieger-Liszkay 2011). Smatra se da je protein D1 primarno mjesto oštećenja uslijed fotoinhibicije, a promjena strukture D1 proteina mogla bi biti uključena u mehanizam oporavka (Alves i sur. 2002). Relativne količine proteina D1 u mladim listovima (Slika 19 A), kao i u razvijenim (Slika 19 B), bile su najveće u 7h, nakon čega postupno padaju. Procjena fotoinhibicije može se odrediti pomoću vrijednosti maksimalnog kvantnog prinosa fotosinteze (F_v/F_m) (Lichtenthaler i Burkart 1999). Mladi listovi pokazali su znatno jači intenzitet fotoinhibicije, no oba tipa listova su pokazala da je fotoinhibicija u potpunosti reverzibilna. Smanjenje učinkovitosti PSII i paralelno povećanje nefotokemijskog gašenja fluorescencije bila je popraćena smanjenom akumulacijom D1 proteina izmjerenom u 13h. Smanjena akumulacija D1 proteina može biti posljedica inhibirane biosinteze proteina i/ili pojačane degradacije u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti. Ovi rezultati poklapaju se s rezultatima istraživanja na vrstama *Eucalyptus sp.* L'Hér., odnosno *Myrica rubra* Seibold i Zucc. (Alves i

sur. 2002; Guo i sur. 2009). Kapacitet promjene D1 proteina ključni je fiziološki uvjet važan u stvaranju tolerancije za fotoinhibiciju. Proučavanjem oporavka od fotoinhibicije, ustanovljena je uloga D1 proteina. Pokazano je da je nužno resintetizirati D1 protein kako bi se aktivnost PSII vratila u normalu. Ponovna sinteza D1 proteina započinje već za vrijeme fotoinhibitornih uvjeta, te se fotoinhibicija događa kada stopa degradacije proteina premašuje stopu obnavljanja. Do maksimalne stope oporavka dolazi nakon prelaska s visokog na niski intenzitet svjetlosti (Aro i sur. 1993; Sundby i sur. 1993; Alves i sur. 2002). Razvijeni su listovi pokazali povećanu akumulaciju D1 proteina tijekom noći za razliku od mladih listova, čija se akumulacija znatno povećala tek u 7h. Proteini koji su oštećeni tijekom dana mogu biti zamijenjeni tek na početku svjetlosnog razdoblja sljedećeg dana (Riesselmann i Piechulla 1992; Krause i sur. 1995; Booij-James i sur. 2002), što objašnjava povećanu akumulaciju u 7h u odnosu na onu izmjerenu u 1h. Krause i suradnici (1995) smatraju da je visoka stopa promjene D1 proteina regulatorni proces koji funkcionira tako što održava razinu funkcionalnih PSII za vrijeme izlaganja visokom intenzitetu svjetlosti, a za vrijeme smanjenog intenziteta svjetlosti obnavlja aktivnost PSII do maksimalne funkcionalnosti. Booij-James i suradnici (2002) u svom radu sugeriraju da je regulacija promjene D1 proteina je pod kontrolom dnevnog unutarnjeg ritma (engl. *circadian rhythm*) te da je svjetlost primarni signal koji aktivira ciklus. Njihovi rezultati pokazuju da se najveća količina fosforiliranog proteina akumulira nekoliko sati prije maksimalnog intenziteta svjetlosti. Stopa degradacije proteina je najmanja u tami, a tijekom dana se pojačava paralelno s povećanjem intenziteta svjetlosti. Proteini koji su oštećeni moraju se zamijeniti u samom početku svjetlosnog perioda sljedećeg dana kako bi se osigurala optimalna količina funkcionalnih membranskih kompleksa tijekom dana. Do istog zaključka su već ranije došle i Riesselmann i Piechulla (1992).

Kako su se količine D1 proteina kod oba tipa listova (Slike 19 A i 19 B) smanjile u 13h, može se pretpostaviti da su i ROS utjecale na oštećenja D1 proteina. Uslijed povećanog intenziteta svjetlosti, zbog redukcije PSII na njegovoj akceptorskoj strani nastaju singletni kisik i hidroksilni radikali koji uzrokuju oštećenja D1 proteina (Guo i sur. 2009; Khatoon i sur. 2009).

Povećana količina ROS-a također utječe na degradaciju i fragmentaciju enzima ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaze/oksigenaze (Rubisco) (Mehta i sur. 1992; Ishida i sur. 1998). Rubisco ima sposobnost fiksacije ugljikovog dioksida te ima veliki utjecaj na učinkovitost PSII i relativni transport elektrona i taj je odnos dobro poznat (Cheng i sur. 2001). Ograničeni protok elektrona smanjuje transtikaloidni protonski gradijent, odnosno dolazi do smanjenja stromalnog pH što ograničava karbamilaciju Rubisco-a, a što direktno utječe na njegovu

akumulaciju (Crafts-Brandner i Salvucci 2000; Ruuska i sur. 2000). Aktivnost ovog enzima pod utjecajem je svjetlosti i mijenja se u vrlo kratkom vremenu ako dođe do promjena uvjeta u okolišu. Aktivacija proteina ovisi o prisutnosti enzima Rubisco aktivaze, no korelacija između aktivnosti enzima i njegove količine nije jednostavna (Portis 2003; Hrstka i sur. 2007). Mladi listovi (Slika 19 C) pokazali su manje količine enzima Rubisco-a u odnosu na razvijene listove (Slika 19 D). To se slaže s ranijim istraživanjima na različito starim listovima javora (*Acer platanoides* L.) (Lepeduš i sur. 2011), hrasta (*Quercus rubra* L.) (Premkumar i sur. 2001) i iglica smreke (*Picea abies* (L.) Karsten) (Lepeduš i sur. 2005) gdje su mladi listovi, odnosno vegetativni pupovi pokazali nižu akumulaciju Rubisco-a. Također, mladi listovi pokazali su promjene u akumulaciji tijekom dana, dok su razvijeni listovi pokazali konstantnu količinu Rubisco-a. Mladi listovi podložniji su fotoinhibiciji, pa je i manja količina Rubisco-a u 13h najvjerojatnije odgovor na povećani intenzitet svjetlosti i povišenu temperaturu (Ishida i sur. 1998; Jagtap i sur. 1998; Larkindale i sur. 2005). U svom radu na iglicama smreke, Hrstka i suradnici (2007) pokazali su da tijekom dana nema promjene u akumulaciji Rubisco-a. To je u suglasnosti s rezultatima akumulacije Rubisco-a dobivenim na razvijenim listovima smokve (Slika 19 D).

Stresni uvjeti kao što su visoki intenzitet svjetlosti i povišena temperatura mogu uzrokovati ograničeni elektronski transport između PSII i PSI. Iako je glavni izvor ROS-a PSI, u uvjetima kada je elektronski transport između fotosustava ograničen i PSII može biti prekomjerno pobuđen i na njegovoj akceptorskoj strani može doći do pojačanog stvaranja ROS-a. S obzirom da količina ROS u stanici ovisi o ravnoteži između produkcije aktivnog kisika i kapaciteta za njegovo uklanjanje, ključan je učinkoviti odgovor antioksidativnih enzima. Funkcionalna suradnja svih enzima je iznimno važna za učinkovito uklanjanje štetnih ROS-a u stanici (Lu i sur. 2007; Khatoon i sur. 2009; Gill i Tuteja 2010). Veza između fotosintetske aktivnosti i promjene u količini antioksidansa dobro je opisana (Leipner i sur. 1999; Tikkanen i sur. 2008; Chen i sur. 2012; Ivanov i sur. 2012; Pospisil 2012). Neravnoteža između kapaciteta za učinkovito iskorištenje energije i kapaciteta za otpuštanje te energije dovodi do stvaranja pobudnog pritiska na PSII što može dovesti do stvaranja ROS-a, naročito $^1\text{O}_2$ i $\text{O}_2^{\bullet-}$ koji pak mogu uzrokovati fotoinhibiciju i oštećenja PSII (Ivanov i sur. 2012). Dakle, kada apsorpcija svjetlosti putem klorofila premašuje kapacitet fotosintetskog aparata za učinkovito iskorištenje doći će do nastanka ROS-a. To će se dogoditi u slučaju kada je prijenos pobudne energije do reakcijskog središta ograničen i kada je transportni lanac elektrona između PSII i PSI inhibiran (Pospisil 2012). Prijenos pobudne energije sa tripletnog klorofila $^3\text{Chl}^*$ na tripletni molekularni kisik $^3\text{O}_2$ povezan je s nastankom $^1\text{O}_2$ (Krieger-Liszkay i sur. 2008; Pospisil 2009; Triantaphylides i Havaux 2009), a u njegovom uklanjanju uglavnom su

djelotvorni neenzimatski antioksidansi (Pospisil 2012). Elektronski transport na akceptorskoj strani PSII povezan je s otpuštanjem elektrona na molekularni kisik što rezultira nastajanjem $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 i HO^{\bullet} (Pospisil 2009), a u njihovom su uklanjanju djelotvorniji enzimatski antioksidansi (Pospisil 2012). Razvijeni listovi pokazali su značajno povećanje aktivnosti SOD i CAT, kao i GR u 1h u usporedbi s aktivnošću u 7h, dok aktivnost peroksidaza, APX i GPOD, nije pokazala promjenu. Mladi su listovi, s druge strane, pokazali porast aktivnosti APX i GR, kao i GPOD i CAT, dok se SOD nije promijenio. Brza aktivacija antioksidativnog sustava će smanjiti mogućnost oštećenja koja nastaju uslijed oksidativnog stresa i na taj način povećati toleranciju na određeni stres (Beis i Patakas 2012).

Iako se aktivnost SOD nije povećala kod mladih listova (Slika 21 A), povećane aktivnosti ostalih enzima ukazuju da postoji učinkovit sustav za uklanjanje H_2O_2 , koji je pak produkt aktivnosti SOD. Kako je SOD prvi enzim koji se uključuje u obranu od ROS može se pretpostaviti da je do njegove aktivacije došlo znatno ranije nego u razvijenim listovima. Naročito jer aktivnosti APX (Slika 21 C) i GPOD (Slika 21 D) razvijenih listova nisu pokazale promjenu. Ukoliko se superoksidni radikali ne uklone, u reakciji s H_2O_2 nastaju iznimno reaktivni hidroksilni radikali, odgovorni za oštećenja lipida i proteina koji se nalaze u blizini njegove produkcije (Rinalducci i sur. 2008; Gill i Tuteja 2010). Ne postoji učinkovit ili specifičan enzim koji uklanja HO^{\bullet} te je jedini način zaštite stanice da se količine njegovih prekursora drže u niskoj koncentraciji (Mano 2002). Količina karbonila, koja je indikator oksidacije proteina (Gill i Tuteja 2010), pokazala je znatno smanjenje u mladim listovima u 13h (Slika 20 B). Kako modifikacije proteina uslijed djelovanja ROS-a često uključuju fragmentacije (Davies 1987), moguće je da je došlo do degradacije, odnosno da je mehanizam degradacije oksidiranih proteina vrlo učinkovit. Juszczuk i suradnici (2008) pokazali su na listovima krastavca (*Cucumis sativus* L.), da iako kloroplasti proizvode veću količinu oksidiranih proteina nego mitohondriji, njihove proteaze su vrlo učinkovite u uklanjanju oštećenih proteina, što je najvjerojatnije slučaj i na mladim listovima smokve. Tikkanen i suradnici (2008) su na vrsti *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. određivali količinu proteinskih karbonila. U tu svrhu koristili su divlji tip i *stn7stn8* mutantu kojoj nedostaju geni za fosforilaciju proteina te su ih podvrgnuli tretmanu na visokom intenzitetu svjetlosti ($1000 \mu\text{mol}_{\text{FOTONAM}}^{-2}\text{s}^{-1}$). Mutanta je pokazala veću količinu proteinskih karbonila tijekom produljenog izlaganja visokom intenzitetu svjetlosti u odnosu na divlji tip. Do povećanja količine proteinskih karbonila u mutantama je došlo uslijed povećanog nastanka ROS-a što je bilo povezano i s njihovom manjom tolerancijom na fotoinhibiciju. Prema tome, veće količine proteinskih karbonila izmjenjenih u razvijenim listovima (Slika 20 B) mogle bi biti

povezane s povećanom osjetljivošću razvijenih listova na visoki intenzitet svjetlosti u odnosu na mlade listove.

TBARS su indikatori nastanka slobodnih radikala u stanicama i mogu se smatrati kao pouzdan indikator peroksidacije lipida koja nastaje uslijed pojačane produkcije ROS (Lu i sur. 2007; Nair i sur. 2008). Kako mladi listovi nisu pokazali povećane količine TBARS u 13h (Slika 20 A), a koje su mogle nastati zbog povećanog nastanka $\text{HO}\bullet$ može se pretpostaviti da je aktivnost SOD (Slika 21 A) ipak bila dostatna za uklanjanje nastalog $\text{O}_2\bullet^-$. Niže vrijednosti koncentracije TBARS kod mladih listova u odnosu na one izmjerene kod razvijenih listova sugeriraju da su mladi listovi bolje zaštićeni od oksidativnih oštećenja lipidnih komponenata biomembrana izazvanih okolišnim uvjetima u 13h. Slično su dobili Gür i suradnici (2010) na listovima pamuka (*Gossypium hirsutum* L.) mjerenima tijekom dana. Promjene okolišnih čimbenika tijekom dana nisu uzrokovale peroksidaciju lipida zbog aktivnog antioksidativnog odgovora koji je bio dovoljan da zaštiti biljke od oksidativnog stresa. Također, Lu i suradnici (2007) su na listovima konopljuše (*Eupatorium adenophorum* Spreng.) pokazali da lagano povišene temperature (30 i 35°C) nisu uzrokovale oštećenja lipida. Razvijeni listovi pokazali su da u aktivnosti peroksidaza (APX i GPOD) nije bilo promjene u 13h (Slike 21 C i 21 D). To ukazuje na smanjen kapacitet peroksidaznog uklanjanja H_2O_2 što se često događa u uvjetima visoke količine osvjetljenja (Foyer i Noctor 2000; Lu i sur. 2007), no povećana aktivnost CAT (Slika 21 B) to kompenzira do neke mjere. Povećane količine TBARS kod razvijenih listova (Slika 20 A) sugeriraju i na mogućnost pojačane produkciju $\text{HO}\bullet$, koja može nastati uslijed smanjenog uklanjanja H_2O_2 ali isto tako i na smanjenu funkcionalnost antioksidativnog sustava uslijed utjecaja povišene temperature i visokog intenziteta svjetlosti u okolišu (Gill i Tuteja 2010).

Ovo istraživanje fotosintetske učinkovitosti tijekom dnevnog ciklusa pokazalo je da mladi listovi imaju nešto nižu fotosintetsku učinkovitost u odnosu na razvijene no kod oba tipa listova fotosintetski aparat je funkcionalan, osim tijekom podneva kada je intenzitet svjetlosti iznosio oko $1400 \mu\text{mol}_{\text{FOTON}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, a temperatura bila oko 34°C (Slika 11). Visoki intenzitet svjetlosti i povišena temperatura tijekom podneva uzrokovali su jaču fotoinhibiciju kod mladih listova što se očituje u značajnom smanjenju fotosintetske učinkovitosti (F_v/F_m , PI_{ABS}), slabijem prijenosu elektrona i pojačanom nefotokemijskom otpuštanju suvišne energije. Razvijeni listovi pokazali su bolje iskorištenje apsorbirane energije u fotokemijskim reakcijama te brži oporavak uslijed učinkovitijeg sustava promjene D1 proteina tijekom dnevnog ritma. Budući da mladi listovi nisu pokazali oštećenja niti lipida niti proteina tijekom HL35 zaključujemo da imaju učinkovitiji antioksidativni sustav u odnosu na razvijene listove.

Aktivnost antioksidativnih enzima ukazuje na postojanje različitih strategija kod mladih i razvijenih listova u zaštiti od oksidativnog stresa. U uvjetima *in vivo* nije moguće razdvojiti udio djelovanja visokog intenziteta svjetlosti od djelovanja povišene temperature. Kako bi se objasnio utjecaj temperature odnosno svjetlosti na fotosintetsku učinkovitost i antioksidativni odgovor osmišljen je eksperiment koji uključuje kombinacije visokog i niskog intenziteta svjetlosti s povišenom i niskom temperaturom.

6.2. FOTOSINTETSKA UČINKOVITOST I ANTIOKSIDATIVNI ODGOVOR U EKSPERIMENTALNIM UVJETIMA

Da bi istražili kako će listovi u različitom razvojnom stadiju odgovoriti na različitu količinu osvjetljenja (HL i LL) u kombinaciji s povišenom (35°C), odnosno niskom temperaturom (10°C), listovi su smješteni u kontrolirane eksperimentalne uvjete. Smokva je mediteranska vrsta koja je osjetljiva na niske temperature (Flaishman i sur. 2008). Bilo koji tip stresa će potaknuti stvaranje i akumulaciju ROS u stanicama (Perl-Treves i Perl 2002; Chinnusamy i sur. 2007), a u nekontroliranim uvjetima abiotički stres je najčešće kombinacija nekoliko različitih čimbenika. Još uvijek nije u potpunosti poznato koji su sve molekularni mehanizmi uključeni prilikom prilagodbe biljaka na različite kombinacije stresa. S obzirom da su kontrolirani uvjeti ipak bolji i praktičniji za proučavanje takve problematike, često rezultati ne odgovaraju onima dobivenim na terenu (Mittler 2006).

Kada se listovi smokve, koji su prije toga bili 12h u tami i na 25°C, smjeste u stresne uvjete, razlika u temperaturi i intenzitetu svjetlosti će potaknuti brzi fiziološki odgovor. Maksimalni kvantni prinos PSII (F_v/F_m) mladih listova Zamorčice (Slika 22 A) pokazao je vrijednosti blizu one koja se smatra graničnom (0,75) za funkcionalnosti PSII (Bolhar-Nordenkampf i sur. 1989) već u predtretmanu, a slične vrijednosti su pokazali i listovi na LL10 tretmanu. Razvijeni listovi pokazali su pad ispod granične vrijednosti na oba HL tretmana (Slika 22 B). Značajno smanjenje maksimalnog kvantnog prinosa mladih i razvijenih listova na tretmanima HL35 i HL10 utjecaj je visokog intenziteta svjetlosti. Visoki intenzitet svjetlosti inaktivira donorsku stranu PSII najčešće zbog oštećenja koja nastaju na OEC kompleksu koji kod mladih listova nije u potpunosti funkcionalno povezan s PSII (Jiang i sur. 2006b) dok niska temperatura u kombinaciji s visokim intenzitetom svjetlosti izaziva kroničnu fotoinhibiciju koja uključuje smanjenje fotosintetske učinkovitosti (Wingsle i sur. 1999; Allen i Ort 2001). Krause i suradnici (1995) pokazali su da visoki intenzitet svjetlosti smanjuje kvantni prinos mladih listova uslijed fotoinhibicije. Jagtap i suradnici (1998) pokazali su da kombinacija visokog intenziteta svjetlosti i povišene temperature smanjuje F_v/F_m na većini istraživanih varijeteta roda *Sorghum* L. Vardaguer i suradnici (2003) pokazali su da je kombinacija visoke temperature i visokog intenziteta svjetlosti smanjila fotosintetsku aktivnost i funkcionalnost listova hrasta crnike (*Quercus ilex* L.). Do znatnog smanjenja aktivnosti PSII može doći zbog njegove osjetljivosti na visoke temperature te takav oštećeni PSII utječe na ograničeni elektronski transport (Wahid i sur. 2007). S druge strane, Pastenes i Horton (1996) su na listovima graha (*Phaseolus vulgaris* L.) pokazali da povišena temperatura (35°C) u

kombinaciji s niskim intenzitetom svjetlosti ($200 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ne utječe na smanjenje učinkovitosti PSII kvantnog prinosa. To se slaže s rezultatima dobivenim na mladim listovima na LL35 tretmanu, gdje je došlo do povećanja maksimalnog kvantnog prinosa u odnosu na predtretman (Slike 22 A i 22 B). Biljke koje se uzgajaju u određenim uvjetima vrlo se brzo prilagode. Stabla mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) koja rastu u umjerenim područjima imaju sposobnost prilagoditi se na niske temperature ako su kratkotrajno izložene smrzavanju tokom ranog proljeća (Pietrini i sur. 2005). Huang i suradnici (2010) pokazali su na četiri drvenaste tropske vrste (*Khaya ivorensis* A. Chev., *Pometia tomentosa* (Blume) Teijsm. & Binn, *Dalbergia odorifera* T. Chen, *Erythrophleum guineense* G. Don) da niska temperatura u kombinaciji s visokim intenzitetom svjetlosti znatno smanjuje učinkovitosti PSII dok je Sonoike (1999) na razvijenim listovima krastavca (*C. sativus* L.) pokazao da na niskom ili umjerenom intenzitetu svjetlosti niska temperatura inhibira isključivo PSI, dok učinkovitost PSII ostaje nepromijenjena. Oba tipa listova su pokazali značajno smanjenje parametra F_v/F_m (Slika 22). Mladi listovi (Slika 22 A) su pokazali znatniju osjetljivost na kombinaciju HL i niske temperature nego razvijeni listovi (Slika 22 B), dok tretman LL10 nije pokazao promjene u odnosu na predtretman.

Indeks fotosintetske učinkovitosti, PI_{ABS} najosjetljiviji je indikator fiziološkog stanja biljke, odnosno lista (Strauss i sur. 2006; van Heerden i sur. 2007; Yusuf i sur. 2010). Parametar PI_{ABS} pokazao je izrazito smanjenje na oba HL tretman kod oba tipa listova (Slike 22 C i 22 D). Kako ovaj parametar kombinira tri parametra: RC/ABS , TR_0/DI_0 te $ET_0/(TR_0-ET_0)$ (Tsimilli-Michael i sur. 2000; Strasser i sur. 2004; van Heerden i sur. 2007), promjena bilo kojeg parametra utječe na promjenu vrijednosti PI_{ABS} parametra. Razvijeni listovi opet su pokazali da je tretman kombinacije visokog intenziteta svjetlosti i povišene temperature uzrokovao najveće smanjenje fotosintetske učinkovitosti što pretpostavlja da su razvijeni listovi osjetljiviji, odnosno, podložniji fotoinhibiciji (Thach i sur. 2007). Tretman LL35 na mladim je listovima pokazao značajan porast PI_{ABS} vrijednosti (Slika 22 C) što pretpostavlja da mladi listovi posjeduju određeni kapacitet za popravak oštećenih reakcijskih središta (Thach i sur. 2007), odnosno na tom tretmanu mogu učinkovitije iskoristiti slobodnu energiju za primarnu fotokemiju (Gonçalves i sur. 2007). U usporedbi s HL tretmanima, LL10 tretman je pokazao nešto manje smanjenje PI_{ABS} kod oba tipa listova što predstavlja i manja oštećenja PSII na ovom tretmanu.

I mladi i razvijeni listovi sorte Fico della Madonna pokazali su na ovim parametrima (Tablica 10 u Prilogu) vrlo slično ponašanje.

Mladi listovi Zamorčice na tretmanu HL10 pokazali su značajno povećanje ABS/RC (Slika 23 A), dok su razvijeni listovi povećali apsorpciju (Slika 23 B) na oba HL tretmana. Ovaj parametar uzima u obzir samo aktivna reakcijska središta koja mogu reducirati Q_A , odnosno, on izražava ukupnu količinu svjetlosti koju molekule klorofila mogu apsorbirati podijeljenu s brojem aktivnih reakcijskih središta (Strasser i sur. 2004). Povećanje ovog parametra može značiti ili da je došlo do inaktivacije određene količine reakcijskih središta koja postaju neaktivna te se transformiraju u Q_B ne-reducirajuća središta (Nussbaum i sur. 2001) ili da je došlo do povećanja u funkcionalnoj veličini antena (Yusuf i sur. 2010). U prvom slučaju (inaktivacija RC), intenzitet protoka uhvaćenih fotona (TR_0/RC , Slike 23 C i 23 D) će se proporcionalno smanjivati sa smanjenjem gustoće reakcijskih središta na osnovi klorofila. Na HL tretmanima je s povećanjem apsorpcije (ABS/RC, Slike 24 A i 24 B) došlo je do istovremenog otpuštanja apsorbirane energije u obliku topline (DI_0/RC , Slike 23 G i 23 H) što pretpostavlja da je došlo do smanjenja protoka uhvaćenih fotona (Eullaffroy i sur. 2009; Yusuf i sur. 2010). Smanjenje apsorpcije pretpostavlja bolju regulaciju u prijenosu apsorbirane energije do reakcijskog središta (Force i sur. 2003), što je slučaj i kod mladih i razvijenih listovima na oba LL tretmana.

Oba tipa listova su u svim tretmanima pokazali značajno smanjenje elektronskog transporta dalje od Q_A^- (ET_0/RC , Slike 23 E i 23 F). Ovaj parametar ovisi o maksimalnoj mjeri ekscitona uhvaćenih po aktivnom reakcijskom središtu i o učinkovitosti kojom će taj eksciton omogućiti prijenos elektrona u transportnom lancu elektrona dalje od Q_A^- (Force i sur. 2003; Strasser i sur. 2004) no teško je sa sigurnošću odrediti u kojem koraku je došlo do inhibicije elektronskog transporta. Mladi listovi su na oba tretmana s visokim intenzitetom svjetlosti (HL35, HL10) pokazali najniže vrijednosti, no niska je temperatura (HL10) snažnije utjecala na učinkovitost prijenosa energije što je u ovom slučaju dovelo do dodatnog rasipanja apsorbirane energije u obliku topline. Niska temperatura smanjuje stopu reakcija, naročito fiksaciju CO_2 i fotorespiraciju te tako ograničava potrebu krajnjih akceptora za apsorbiranom energijom. Manja potreba za apsorbiranom energijom povećava potencijalna oštećenja PSII (Allen i Ort 2001). To navodi na zaključak da je ovaj tretman izazvao jaču fotoinhibiciju mladih listova. Tretman HL35 kod razvijenih listova pokazao je najsnažniji odgovor: najniže vrijednosti ET_0/RC (Slika 23 F) uz najviše vrijednosti DI_0/RC (Slika 23 H). Povišena temperatura može dovesti do toga da se stvori suvišak pobudne energije čak i u uvjetima kada je intenzitet svjetlosti nizak. Taj se suvišak energije najčešće uklanja nefotokemijskim putem (Mullineaux i Karpinski 2002) što objašnjava povišene vrijednosti otpuštanja energije koja je u suvišku. Rasipanje suvišne energije u obliku topline i fluorescencije po aktivnom reakcijskom središtu (DI_0/RC , Slike 23 G i 23 H) je onaj dio apsorbirane energije koji

reakcijska središta ne mogu uhvatiti (Force i sur. 2003; Strasser i sur. 2004). Pokazalo se da je do pojačane apsorpcije na HL tretmanima na oba tipa listova došlo zbog neaktivnih RC koja se nazivaju „tihan“ središta i suvišnu energiju rasipaju isključivo u obliku topline, odnosno nefotokemijskim putem (Strasser i sur. 2004; Gonçalves i sur. 2007; Eullaffroy i sur. 2009). Na razvijenim listovima je istovremeno na HL tretmanima došlo do povećanja koncentracije Chl *a* (Slika 24 B) i Chl *b* (Slika 24 D) te karotenoida (Slika 24 H), najvjerojatnije kao prilagodba na povećani kapacitet apsorpcije (Slika 23 B). To objašnjava pojačano rasipanje suvišne energije (DI_0/RC , Slika 23 H) na HL tretmanima. Također, u kombinaciji sa smanjenim ET_0/RC (Slika 23 F) i F_v/F_m (Slika 22 B) na istim tretmanima, može se zaključiti da je visoki intenzitet svjetlosti u obje kombinacije izazvao fotoinhibiciju. Slično su se ponašali i listovi jedne vrste roda *Monstera* Adans. izloženi povišenom intenzitetu svjetlosti (Force i sur. 2003) te frondovi vodene leće (*Lemna minor* L.) tretirani diuronom (Eullaffroy i sur. 2009).

I mladi i razvijeni listovi sorte Fico della Madonna (Tablica 11 u Prilogu) pokazali su na ovim parametrima gotovo identično ponašanje.

Mladi listovi sorte Zamorčica nisu pokazali značajne promjene koncentracije Chl *a* (Slika 24 A) niti Chl *b* (Slika 24 C), dok se koncentracija karotenoida povećala na HL35, odnosno značajno smanjila na HL10 tretmanu. Porast koncentracije karotenoida na visokom intenzitetu svjetlosti zaštitni je mehanizam listova kako bi se smanjilo oštećenje fotosintetskog aparata rasipanjem suvišne energije (Triantaphylides i Havaux 2009; Gill i Tuteja 2010), ali i direktnim uklanjanjem singletnog kisika (Sozer 2011). Smanjenje omjera Chl *a/b* mladih listova (Slika 24 E) na LL10 tretmanu ukazuje na povećanje veličina antena PSII, što je karakteristika prilagodbe na nizak intenzitet svjetlosti (Ragni i sur. 2008; Beisel 2010). Također, ovi rezultati su u suglasnosti s rezultatima dobivenim mjerenjem tijekom dnevnih promjena (Slika 18 C). Mladi listovi su pokazali smanjenje koncentracije karotenoida (Slika 24 G) na HL10 tretmanu. Pietrini i suradnici (2005) su na listovima mandarine (*Citrus reticulata* Blanco) pokazali da su mladi listovi osjetljiviji na niske temperature te da mogu usporiti metaboličke procese i odgoditi otpuštanje prekomjerne količine energije. Također su pokazali da je niska temperatura utjecala na povećanje koncentracije ukupnih karotenoida, no nije došlo do promijene količine ukupnog klorofila. Karotenoidi su uključeni u procese otpuštanja suvišne energije (Demmig-Adams i Adams 1996) te je povećanje koncentracije karotenoida vrlo često povezano s pojačanim nefotokemijskim gašenjem fluorescencije klorofila *a* (Jung 2004b; Cai i sur. 2005; Tewari i sur. 2007).

Fotosintetski pigmenti sorte Fico della Madonna pokazali su nešto drugačiji trend nego Zamorčica. Razvijeni listovi nisu pokazali promjene u koncentraciji klorofila (Tablica 12 u

Prilogu) ni omjeru Chl *a/b* (Tablica 12 u Prilogu) ni na kojem tretmanu, dok su tretmani koji uključuju povišenu temperaturu izazivali povećanje koncentracije karotenoida (Tablica 12 u Prilogu) koje je bilo popraćeno pojačanim otpuštanjem suvišne energije (Tablica 11 u Prilogu). Mullineaux i Karpinski (2002) izvijestili su da povišena temperatura može dovesti do stvaranja suvišne pobudne energije koja se najčešće uklanja nefotokemijskim putem što je u suglasnosti s dobivenim rezultatima. Povišena temperatura kod mladih listova izazvala je smanjenje koncentracije Chl *a* i Chl *b* (Tablica 12 u Prilogu) najvjerojatnije kao posljedica fotoinhibicije. Visoka temperatura potiče razgradnju fotosintetskih pigmenta kao posljedica fotoinhibicije te je često prilagodba koja može smanjiti pojačano stvaranje ROS-a uslijed stresnih uvjeta (Jagtap i sur. 1998; Jung 2004b; Guo i sur. 2006; Wahid i sur. 2007). Niska temperatura je pak izazvala porast koncentracije svih istraživanih fotosintetskih pigmenta (Tablica 12 u Prilogu). Prilagodba na niske temperature zahtijeva reorganizaciju staničnih struktura te reprogramiranje metabolizma i genske ekspresije. Povećanje koncentracije često je posljedica prilagodbe kako bi se zadržala konstantna razina fotosinteze (Chinnusamy i sur. 2007). Iz ovih rezultata možemo pretpostaviti da je ova sorta tolerantnija na niže temperature.

Protein D1 vrlo je osjetljiv na povećani intenzitet svjetlosti te je primarno mjesto oštećenja PSII uslijed fotoinhibicije (Kato i Sakamoto 2009; Khatoon i sur. 2009; Chen i sur. 2012; Tikkanen i Aro 2012). I mladi (Slika 25 A) i razvijeni listovi (Slika 25 B) sorte Zamorčica pokazali su značajno smanjenu akumulaciju proteina D1 na HL tretmanima što se slaže sa smanjenim vrijednostima F_v/F_m (Slike 22 A i 22 B) na istim tretmanima. Povećanje intenziteta svjetlosti utječe na povećanu fosforilaciju proteina (Aro i sur. 1993; Booi-James i sur. 2002; Guo i sur. 2009) pa je logično za pretpostaviti da je veći intenzitet svjetlosti uzrokovao i povećanu fosforilaciju proteina D1 koja će dovesti do njegove razgradnje. Tretmani s niskim intenzitetom svjetlosti imali su neznatan utjecaj na akumulaciju ovog proteina što ukazuje da temperatura nije ključni čimbenik koji izaziva degradaciju D1 proteina tijekom fotoinhibicije, već je to u prvom redu svjetlost. Pri niskom intenzitetu svjetlosti postoji ravnoteža između oštećenja PSII te oporavka u obliku degradacije proteina, sinteze *de novo* te konačno, njegove ponovne ugradnje u funkcionalan PSII (Aro i sur. 1993; Sundby i sur. 1993). Tretman HL35 (Slike 25 A i 25 B) je na oba tipa listova pokazao smanjenje akumulacije D1 proteina dok na tretmanu LL35 nije došlo do velike promjene u akumulaciji. Singh i Singhal (1999) su u svom eksperimentu izlagali pšenicu (*Triticum aestivum* L.) smještenu u tamu različitim povišenim temperaturama (od 35 do 60°C). Pokazali su da će tek temperature više od 50°C uzrokovati degradaciju D1 proteina. Slične rezultate su dobili i Lípová i suradnici (2010) na listovima ječma (*Hordeum vulgare* L.). Pokazali su da je pri temperaturi od 50°C

došlo do smanjenja količine D1 proteina, a na temperaturi između 45 i 47°C i pri niskom intenzitetu svjetlosti je došlo do degradacije dimera reakcijskog središta PSII. Na tretmanu HL35 (Slike 25 A i 25 B) očito je došlo do fotoinhibicije uslijed kombinacije visoke temperature i visokog intenziteta svjetlosti što je uzrokovalo neravnotežu između procesa degradacije i sinteze D1 proteina *de novo*. Slično je pokazao i tretman HL10 (Slike 25 A i 25 B). Bascunan-Godoy i suradnici (2012) pokazali su na vrsti *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. da niska temperatura ograničava kapacitet popravka D1 proteina tako što usporava *de novo* sintezu proteina. Tretmani LL35 i LL10 (Slike 25 A i 25 B) su, čini se, ipak uspjeli dovesti procese razgradnje proteina i *de novo* sinteze u ravnotežu te zbog toga nije bilo većih promjena u akumulaciji D1 proteina u odnosu na P.

Sorta Fico della Madonna pokazala je isti obrazac akumulacije D1 proteina (Slike 36 A i 36 B u Prilogu).

Enzim Rubisco je vrlo osjetljiv na oksidativni stres (Mehta i sur. 1992; Crafts-Brandner i Salvucci 2000; Larkindale i sur. 2005; Allakhverdiev i sur. 2008). Oba tipa listova sorte Zamorčica pokazali su znatno manju količinu Rubisco-a (Slike 25 C i 25 D) na oba HL tretmana u usporedbi s količinom u predtretmanu. Povećani intenzitet svjetlosti i oksidativni stres uzrokuju ubranu fragmentaciju i degradaciju Rubisco-a (Ishida i sur. 1998) što odgovara dobivenim rezultatima. U eksperimentalnim uvjetima, ravnoteža između transporta elektrona i asimilacije ugljika može biti promijenjena u suprotnom smjeru (Ruuska i sur. 2000). Niže količine Rubisco-a utjecale su na smanjeni prijenos elektrona na istim tretmanima (Slike 23 E i 23 F). Poznato je da niske temperature mogu oštetiti Rubisco (Allen i Ort 2001) te da temperature 10°C više ili niže od optimalne utječu na aktivnost Rubisco-a (Cen i Sage 2005) što objašnjava ovako nisku akumulaciju na LL10 tretmanu kod razvijenih listova. Na LL35 tretmanu nije došlo do smanjenja količine Rubisco-a. Također, protok elektrona po aktivnom reakcijskom središtu (Slike 23 E i 23 F) nije pokazao tako intenzivan pad vrijednosti kao na HL tretmanima. To je najvjerojatnije povezano sa smanjenim nastankom ROS-a što je smanjilo mogućnost fotoinhibicije (Desimone i sur. 1996).

Mladi listovi sorte Fico della Madonna (Slika 36 C u Prilogu) pokazali su sličnu akumulaciju enzima Rubisco-a kao razvijeni listovi sorte Zamorčica. Razvijeni listovi (Slika 36 D u Prilogu) pokazali su nešto drugačiji uzorak akumulacije. Tretmani HL35 te oba LL tretmana su pokazala smanjenje akumulacije, dok je HL10 tretman pokazao neznatnu promjenu u odnosu na predtretman. Desimone i sur. (1996) pokazali su da je povišeni intenzitet svjetlosti povećao količinu LSU Rubisco-a u izoliranim kloroplastima ječma tako što je došlo do promjene u strukturi Rubisco-a koji je stvorio netopive agregate povezane s membranom

iako je poznato da povišena temperatura uzrokuje degradaciju Rubisco-a. Sage (2002) je pak izvijestio da različito prilagođene vrste iz roda *Atriplex* L. pokazuju povišenu akumulaciju Rubisca ukoliko su prilagođene na niske temperature što može dovesti do pretpostavke da je ova sorta nešto otpornija na niske temperature.

Kada su biljke izložene različitim stresorima dolazi do promjene aktivnosti antioksidativnih enzima koji mogu pokazati ili porast ili pad. Zajedničko djelovanje nekoliko stresora može djelovati na zaštitni antioksidativni mehanizam tako da u konačnici oslabi obranu biljke (Mittler 2006; Lu i sur. 2007). Visoka temperatura jedan je od najčešćih stresora koji smanjuju produktivnost biljaka. Fotosintetska aktivnost je najosjetljivija na visoke temperature uglavnom jer postoje najmanje tri mjesta koja su osjetljiva na stres. To su fotosustavi, naročito PSII zajedno s OEC, procesi stvaranja ATP-a te procesi asimilacije CO₂. Opseg oštećenja koji nastaje zbog utjecaja stresa ovisi o ravnoteži između oštećenja i procesa popravka tijekom stresa. Proces popravka, točnije *de novo* sinteza proteina, najčešće je inhibirana zbog povećane količine ROS-a. Povišena temperatura potiče stvaranje singletnog kisika, superoksidnog radikala, vodikovog peroksida te hidroksilnog radikala, a najčešći je simptom peroksidacija membranskih lipida (Wahid i sur. 2007; Allakhverdiev i sur. 2008). Osim visoke temperature, visoki intenzitet svjetlosti također negativno utječe na fiziološke procese među kojima su inhibicija fotosintetske aktivnosti te stvaranje ROS. Visoki intenzitet svjetlosti vrlo je često u kombinaciji s visokom temperaturom, a odgovor na kombinaciju ta dva stresna čimbenika razlikuje se od odgovora biljke na pojedinačni stres (Mullineaux i Karpinski 2002; Hewezi i sur. 2008). S druge strane, niska temperatura također utječe na produktivnost, naročito na tropske biljke, s obzirom da one nisu tolerantne na takve uvjete. Iako je primarna meta niske temperature fotosintetski aparat, postoji vrlo bliska veza između niskih temperatura i pojačane akumulacije ROS-a (Allen i Ort 2001; Einset i sur. 2007).

Aktivnost enzima SOD-a u mladim listovima (Slika 27 A) sorte Zamorčica značajno se smanjila na svim tretmanima u odnosu na predtretman dok su razvijeni listovi (Slika 27 B) pokazali značajan porast na svim tretmanima. Istraživanje Fath i suradnici (2001) pokazalo je da hormoni, točnije giberilini utječu na smanjenje aktivnosti SOD. Nakon izlaganja određenoj količini giberelina, sjemenke ječma su pokazale smanjenu aktivnost svih istraživanih enzima. Giberilini su, između ostalog, uključeni u regulaciju prelaska juvenilne faze u odraslu (Pevalek-Kozlina 2003). Pinthus i suradnici (1996) su na listovima pšenice, a Smith i suradnici (1996) na patuljastim mutantama ječma pokazali da aplikacija giberilina pozitivno utječe na razvoj listova. Prema tome, može se pretpostaviti da mladi listovi imaju povećane količine ovog hormona koji je utjecao na aktivnost SOD-a. Logan i suradnici (1998) pokazali

su da povećani intenzitet svjetlosti također može smanjiti aktivnost SOD-a na listovima zimzelena (*Vinca major* L.) i bundeve (*Cucurbita pepo* L.). Klijanci sorte riže (*Oryza sativa* L.), IR-50 koja je osjetljivija na niske temperature, pokazali su smanjenje aktivnosti nekih enzima, uključujući i SOD. S druge strane, sorta Xiangnuo-1, koja je otporna na niske temperature, pokazala je povećanu aktivnost SOD-a (Huang i Guo 2005) što odgovara povećanoj aktivnosti kod razvijenih listova. Temperatura i visoki intenzitet svjetlosti su vrlo često čimbenici koji uzrokuju povećanu aktivnosti enzima. Prijašnja istraživanja pokazala su da do povećanja aktivnosti SOD-a dolazi u uvjetima visoke temperature (Lu i sur. 2007) i visokog intenziteta svjetlosti (Sofo i sur. 2004). Ovaj enzim se smatra prvom linijom obrane od ROS. Također se smatra najbržim enzimom, a njegova uloga je uklanjanje superoksidnog radikala te se na taj način smanjuje opasnost od nastanka mnogo reaktivnijeg hidroksilnog radikala (Arora i sur. 2002; Gill i Tuteja 2010). Niske aktivnosti SOD-a u mladim listovima mogu upućivati na to da količina $O_2^{\bullet-}$ nije bila dovoljno visoka kako bi potaknula povećanu aktivnost. Iako su razvijeni listovi na svim tretmanima pokazali povišene aktivnosti SOD-a (Slika 27 B), do oštećenja membranskih lipida je ipak došlo na HL35, HL10 i LL35 tretmanima (Slika 26 A) što ukazuje na to da je na tim tretmanima najvjerojatnije došlo do povećanja količine H_2O_2 u stanicama.

Aktivnost enzima SOD-a mjerena na mladim listovima sorte Fico della Madonna (Tablica 14 u Prilogu), pokazala je slične rezultate kao i sorta Zamorčica osim što tretman HL10 nije imao nikakav utjecaj na aktivnost ovog enzima. Razvijeni listovi su pak pokazali smanjenje aktivnosti na LL tretmanima dok se HL tretmani nisu značajno razlikovali od predtretmana. Hunag i Guo (2005) su na sorti riže IR-50, koja je osjetljivija na hladnoću, također pokazali da je došlo do smanjenja aktivnosti SOD-a što je pak bilo popraćeno povećanim aktivnostima APX-a i CAT. To se poklapa i s dobivenim rezultatima na razvijenim listovima ove sorte.

Aktivnost enzima katalaze na mladim (Slika 27 C) i razvijenim listovima (Slika 27 D) sorte Zamorčica pokazala je vrlo slično ponašanje. Aktivnost se značajno povećala na HL tretmanima, dok je LL35 tretman uzrokovao smanjenje aktivnosti. LL10 tretman je kod razvijenih listova pokazao značajan porast, dok kod mladih listova nije došlo do promjene u odnosu na predtretman. Katalaza ima vrlo visoku aktivnost i najvišu mjeru promjene u usporedbi s ostalim enzimima, no vrlo nizak afinitet za H_2O_2 (Noctor i Foyer 1998). Vrlo je osjetljiv na fotoinaktivaciju i degradaciju u uvjetima visoke količine svjetlosti. Kako bi se katalazna aktivnost održala na visokoj razini nužna je pojačana sinteza proteina koja premašuje razgradnju. Ipak, ovaj enzim je iznimno važan u uklanjanju H_2O_2 (Foyer i Noctor 2000; Gill i Tuteja 2010). Brojna istraživanja pokazala su povećanje aktivnosti katalaze u

uvjetima visokog intenziteta svjetlosti (Logan i sur. 1998; Sofo i sur. 2004) i niske temperature (Huang i Guo 2005; Lu i sur. 2007), dok visoka temperatura često utječe na smanjenje aktivnosti (Lu i sur. 2007). Kombinacija dvaju čimbenika imaju drugačiji utjecaj na odgovor biljke nego kada na nju djeluju pojedinačno. Geni koji su uključeni u regulaciju metabolizma pokazali su pojačanu ekspresiju na kombiniranom tretmanu visokog intenziteta svjetlosti ($600\mu\text{mol}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) i visoke temperature (35°C) (Hewezi i sur. 2008) što može biti razlog povećane aktivacije katalaze na HL tretmanima (Slike 27 C i 27 D) unatoč osjetljivosti na visoki intenzitet svjetlosti.

Aktivnosti enzima katalaze mjerene na mladim i razvijenim listovima sorte Fico della Madonna (Tablica 14 u Prilogu) ponašale gotovo identično u usporedbi sa sortom Zamorčica.

Peroksidaze (GPOD i APX) su, uz katalazu, vrlo važni enzimatski antioksidansi čija je glavna uloga uklanjanje H_2O_2 . Za razliku od CAT, one koriste gvajakol, odnosno askorbat kao donor elektrona te imaju veći afinitet prema H_2O_2 (Hiraga i sur. 2001; Asada 2006). Aktivnost enzima APX na mladim listovima (Slika 27 E) sorte Zamorčica pokazala je značajno smanjenje aktivnosti na tretmanima HL10 te LL35 i LL10, dok razvijeni listovi (Slika 27 F) nisu pokazali promjenu aktivnosti. Aktivnost gvajakol peroksidaze u mladim listovima (Slika 27 G) pokazala je smanjenu aktivnost na tretmanima s niskom temperaturom, dok su razvijeni listovi (Slika 27 H) pokazali značajno višu aktivnost samo na LL35 tretmanu. Smanjenje aktivnosti APX-a zabilježili su Lu i suradnici (2007) na listovima konopljuše, izloženim povišenoj temperaturi, dok su listovi iste vrste na niskoj temperaturi pokazali povećanu aktivnost. Smanjene aktivnosti su zabilježene i na klijancima riže i to na sorti koja je bila osjetljiva na nisku temperaturu (IR-50) (Huang i Guo 2005). Smanjene aktivnosti enzima APX koje je uočeno kod mladih listova na niskim temperaturama, neovisno o količini aplicirane svjetlosti, upućuje na to da su mladi listovi osjetljiviji na niske temperature. Također, smanjenje aktivnosti na LL35 tretmanu u mladim listovima može upućivati na to da APX ne može kompenzirati smanjenu aktivnost CAT (Slika 27 C) na istom tretmanu što je znatno utjecalo na kapacitet uklanjanja H_2O_2 . To se naročito može vidjeti u povećanoj količini TBARS-a (Slika 26 A) na tom tretmanu. Razvijeni listovi pak nisu pokazali značajnija odstupanja od predtretmana u aktivnosti APX (Slika 27 F). Smokva sadrži lateks u kojem je detektirana određena količina peroksidaza koje se aktiviraju kada su listovi izloženi stresu u obliku ranjavanja, niske temperature ili isušivanja (Kim i sur. 2003). Peroksidaze koje se nalaze u sastavu lateksa vjerojatno imaju veći afinitet prema H_2O_2 i kapacitet za njegovo

uklanjanje, što bi objasnilo slabu aktivnost APX (Slike 27 E i 27 F) i GPOD (Slike 27 I i 27 J) na tretmanima.

Sorta Fico della Madonna pokazala je na razvijenim listovima sličan obrazac aktivnosti enzima APX (Tablica 14 u Prilogu). Mladi listovi ove sorte pokazali su značajan pad na HL35 tretmanu i porast aktivnosti na HL35 i LL10 tretmanima u odnosu na predtretman. Istraživanja na maslini (*Olea europaea* L.) (Sofa i sur. 2004) te zimzelenu i bundevi (Logan i sur. 1998) pokazala su povećanje aktivnosti enzima APX u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti što su pokazali i mladi listovi ove sorte. Niska temperatura također je dovela do povećanja aktivnosti enzima APX kod klijanaca riže, ali samo kod sorte tolerantne na niske temperature (Xiangnuo-1) (Huang i Guo 2005). Povećanje aktivnosti APX-a zabilježili su Lu i suradnici (2007) na listovima konopljuše, izloženim niskoj temperaturi. Oba tipa listova ove sorte nisu pokazali nikakve promjene u aktivnosti GPOD-a (Tablica 14 u Prilogu) ni na kojem tretmanu. Jiang i suradnici (2005) pokazali su da se aktivnost GPOD nije promijenila na listovima soje koji su bili smješteni na visoki intenzitet svjetlosti i visoku temperaturu. Listovi konopljuše na 35°C također nisu pokazali promjene u aktivnosti ovog enzima (Lu i sur. 2007).

I mladi (Slika 27 I) i razvijeni listovi (Slika 27 J) sorte Zamorčica pokazali su na svim tretmanima povišenu aktivnost glutacione reduktaze. Niske temperature izazvale su povišenu aktivnost GR na listovima konopljuše (Lu i sur. 2007), te na tolerantnoj sorti klijanaca riže (Huang i Guo 2005). Visoki intenzitet svjetlosti također je izazvao povišenu aktivnost GR na listovima zimzelena (Logan i sur. 1998). Glutacione reduktaze katalizira posljednji korak glutacione askorbatnog ciklusa i vrlo često je ograničavajući čimbenik. Povišene aktivnosti GR povišuju omjer reduciranog i oksidiranog glutaciona (GSH:GSSG) koji je potreban za regeneraciju askorbata. Povećanje aktivnosti ovog enzima izaziva jaču redukciju ukupnog glutaciona što će pojačati otpornost prema fotoinhibiciji te dovesti do prilagodbe biljaka na stresne uvjete (Foyer i Noctor 2000; Gill i Tuteja 2010). Kada jedna komponenta antioksidativnog sustava postane ograničavajuća, neka će druga komponenta kompenzirati i pojačati aktivnost. Pojačana aktivnost GR je, prema tome, kompenzacija relativno niske aktivnosti APX. Također, najvjerojatnije će doći do povećanja količine glutaciona koji je iznimno važan ne-enzimatski antioksidans. (Foyer i sur. 1997).

Sorta Fico della Madonna pokazala je na oba tipa listova slično ponašanje aktivnosti enzima GR (Tablica 14 u Prilogu).

Mladi listovi sorte Zamorčica pokazali su povećanu količinu TBARS-a (Slika 26 A) na HL35 i LL35 tretmanima, dok su razvijeni listovi (Slika 26 B) pokazali povećanu količinu TBARS-a na tretmanima HL35, HL10 i LL35. Visoka temperatura (35°C) i visoki intenzitet svjetlosti (10000 luksa) potaknuli su veću razinu lipidne peroksidacije i na listovima vrste *Sorghum bicolor* (L.) Moench (Jagtap i Bhargava 1995) i to na onom varijetetu (CSV-5) koji je bio osjetljiviji na stresne uvjete. Ostali varijeteti nisu pokazali povećanje peroksidacije lipida kao ni povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima što upućuje na određenu adaptaciju na stresne uvjete. Listovi konopljuše izloženi visokoj (38 i 40°C) i niskoj (5 i 10°C) temperaturi također su pokazivali povišene razine peroksidacije lipida, no intenzitet je bio jači na tretmanu s povišenom temperaturom (Lu i sur. 2007). To se slaže s rezultatima dobivenim na HL35 i LL35 tretmanima za oba tipa listova (Slike 26 A i 26 B). Više vrijednosti TBARS-a na mladim listovima ukazuju da su oštećenja membrana veća na višim temperaturama. Uz to, antioksidativni sustav manje je funkcionalan na visokim temperaturama. Yan i suradnici (2013) su sadnice vrste divlje riže (*Zizania latifolia* (Griseb.) Turcz. ex Stapf) uzgajali u stakleniku i u polju, na različitim temperaturama i intenzitetima osvjetljenja. Sadnice smještene u polje, gdje je temperatura bila niža, a osvjetljenje jače, pokazale su više razine lipidne peroksidacije. To ukazuje da niska temperatura izaziva neravnotežu između opskrbe i upotrebe energije, što u konačnici dovodi do fotoinhibicije. Razvijeni listovi su na tretmanu HL10 pokazali povećanje razine TBARS-a (Slika 26 B), dok mladi listovi (Slika 26 A) ne pokazuju porast peroksidacije lipida na niskim temperaturama. Čini se da su razvijeni listovi nešto osjetljiviji na niske temperature te da nemaju tako funkcionalan antioksidativni sustav kao mladi listovi. To je u skladu s prijašnjim rezultatima da se antioksidativni sustav razvija vrlo rano u razvoju listova, što je pokazano i na različito starim listovima rajčice (*Solanum lycopersicum* L.) (Unyayar i Cekic 2005) i vrste *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Jung 2004b). Istovremeno, koncentracija proteinskih karbonila, koja je pokazatelj oksidacije proteina, pokazala je samo na tretmanu HL10 na oba tipa listova (Slike 26 C i 26 D) više vrijednosti. Buritt i suradnici (2003) uzgojili su sadnice vrste *Begonia x erythrophylla* Neumann u stakleniku na niskom intenzitetu svjetlosti ($155 \mu\text{mol}_{\text{FOTONAM}}^{-2}\text{s}^{-1}$) te ih premjestili na otvoreno polje i u sjenu. Biljke smještene na visoki intenzitet svjetlosti pokazale su povećane koncentracije proteinskih karbonila. Povećanje razine proteinskih karbonila zabilježili su i Prasad i suradnici (1996) nakon izlaganja klijanaca kukuruza (*Zea mays* L.) niskoj temperaturi (4°C). Razina se smanjila nakon četverodnevne prilagodbe, no ona je još uvijek bila znatno viša od početne vrijednosti. Niska temperatura u kombinaciji s visokim intenzitetom svjetlosti (tretman HL10) izazvala je povećanje razine proteinskih karbonila na oba tipa listova (Slike 26 C i 26 D) do čega je najvjerojatnije došlo uslijed nedovoljne razine antioksidanasa koji bi uklonili štetne ROS. Stresni uvjeti pogoduju nastanku proteinskih

karbonila. Do stvaranja proteinskih karbonila dolazi zbog povećane produkcije ROS-a, a veća količina pretpostavlja veću osjetljivost biljke na određeni stres (Pyngrope i sur. 2013).

Količina TBARS-a na mladim i razvijenim listovima sorte Fico della Madona (Tablica 13 u Prilogu) pokazala je isti obrazac ponašanja kao i na sorti Zamorčica. Mladi listovi sorte Fico della Madonna ni na kojem tretmanu nisu pokazali oštećenje proteina, slično kao i na sorti Zamorčica, dok su razvijeni listovi na HL tretmanima pokazali značajno manje količine karbonila. Manje količine karbonila su najvjerojatnije posljedica djelovanja proteaza koje su razgradile oštećene proteine (Juszczuk i sur. 2008).

U ovom radu pokazano je da utjecaj visokog intenziteta svjetlosti i povišene temperature (HL35) na oba tipa listova uzrokuje snažnu fotoinhibiciju koja se očituje u smanjenoj fotosintetskoj učinkovitosti (F_v/F_m , PI_{ABS}), smanjenom elektronskom transportu po aktivnom reakcijskom središtu (ET_0/RC) te degradaciji proteina D1 i Rubisco LSU. Također, ovaj je tretman uzrokovao povećano otpuštanje suvišne energije (DI_0/RC) uz istovremeno povećanje koncentracije karotenoida što ukazuje na pojačanu zaštitu rasipanjem suvišne energije u obliku topline. Kako bi se odredila kolika je uloga nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila *a* u održavanju učinkovitosti mladih i razvijenih listova korišteni su inhibitori nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila *a*. Korišteni inhibitori smanjuju procese nefotokemijskog gašenja tako što inhibiraju trans-tilakoidni pH gradijent (NGC) odnosno inhibiraju violaksantin deepoksidazu (DTT), a koji su nužni preduvjeti za stvaranje nefotokemijskog gašenja. S obzirom da je visoki intenzitet svjetlosti u kombinaciji s povišenom temperaturom (HL35) izazvao pojačano opuštanje suvišne energije u obliku topline (DI_0/RC) kod oba tipa listova ovaj tretman je korišten u kombinaciji s inhibitorima nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila *a*.

6.3. FOTOSINTETSKA UČINKOVITOST I ANTIOKSIDATIVNI ODGOVOR NAKON TRETMANA INHIBITORIMA NEFOTOKEMIJSKOG GAŠENJA FLUORESCENCIJE KLOROFILA *a*

Nefotokemijsko gašenje fluorescencije klorofila *a* (NPQ) je najčešća posljedica suviška svjetlosti koji dolazi do PSII. Stvaranje NPQ uključuje trans-tilakoidni protonski gradijent (ΔpH), funkcionalan ksantofilski ciklus te aktivan PsbS protein. Strukturna jedinica NPQ sadrži LHCII i PsbS proteine te nastaje nakon protonacije i vezanja za karotenoide ksantofilskog ciklusa (Horton i sur. 2005). Iz tog razloga je bilo važno ispitati utjecaj nigericina (NGC) kao dobro poznatog inhibitora trans-tilakoidnog pH gradijenta i ditiotreitola (DTT), kao nespecifičnog inhibitora violaksantin deepoksidaze na mlade i razvijene listove smokve.

Maksimalni kvantni prinos PSII, F_v/F_m , kod mladih lisnih diskova (Slika 28 A) pokazao je da među tretmanima nije bilo značajne razlike no sve izmjerene vrijednosti F_v/F_m bile su znatno niže od 0,75 što ukazuje na to da mladi lisni diskovi nemaju potpuno funkcionalan fotosintetski aparat (Bolhar-Nordenkamp i sur. 1989). Visoki intenzitet svjetlosti je vrlo vjerojatno uzrokovao inaktivaciju PSII i to na njegovoj donorskoj strani, što su pokazali i Jiang i suradnici (2006b). Oni su pokazali na listovima loze (*Vitis vinifera* L.) da OEC kompleksi nisu u potpunosti funkcionalno povezani s PSII kod mladih listova te je pod utjecajem visokog intenziteta došlo do smanjenja maksimalnog kvantnog prinosa. To je vjerojatno i slučaj kod lisnih diskova mladih listova (Slika 28 A). Razvijeni lisni diskovi (Slika 28 B) pokazali su nakon HL35 tretmana značajno niže vrijednosti parametra F_v/F_m na tretmanima NGC-om i DTT-om. Listovi soje tretirani DTT-om pokazali su niže vrijednosti F_v/F_m u odnosu na kontrolu nakon tretmana na visokom intenzitetu svjetlosti (Aro i sur. 1993; Jiang i sur. 2004), a Takahashi i suradnici (2009) su nakon tretmana nigericinom i inkubacije na visokom intenzitetu svjetlosti pokazali značajno niže vrijednosti na listovima vrste *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

PI_{ABS} (Slika 28 C) kod mladih lisnih diskova pokazao je značajno niže vrijednosti nakon HL35 na tretmanu NGC-om, dok su oba tretmana inhibitorima uzrokovala značajan pad kod lisnih diskova razvijениh listova (Slika 28 D). Više vrijednosti razvijениh lisnih diskova u odnosu na mlade ukazuju na puno bolje iskorištenje suvišne energije u fotosintetskim procesima (Gonçalves i sur. 2007), no istovremeno su oba inhibitora uzrokovala sniženje učinkovitosti PSII. Značajno smanjenje ovog parametra nakon HL35 tretmana ukazuje na to da inhibitori u

kombinaciji s visokim intenzitetom svjetlosti i povišenom temperaturom uzrokuju fotoinhibiciju razvijenih listova (Thach i sur. 2007). Ranija istraživanja pokazala su da djelovanja NGC-a (Takahashi i sur. 2009) i DTT-a (Matsubara i Chow 2004) ubrzavaju fotoinhibiciju što je u skladu s dobivenim rezultatima.

Slike 29 A i 29 B prikazuju OJIP krivulje dobivene mjerenjem mladih i razvijenih lisnih diskova nakon 30 min na HL35 tretmanu. Nativne krivulje (umetnuti grafovi) kod oba tipa listova pokazale su potpuni nestanak tipičnih J, I i P koraka što ukazuje na ograničeni protok elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A . Porast krivulje od O do J koraka predstavlja redukciju Q_A te predstavlja fotokemijsku fazu. J-I-P porast fluorescencije označava nefotokemijsku fazu te predstavlja redukciju ukupnog plastokinona (Strauss i sur. 2006). Porast između O i J koraka krivulje prikazuje fotokemijsku fazu (Govindjee 2004). Što je taj nagib strmiji, to je redukcija Q_A brža (Joly i Carpentier 2007; Toth i sur. 2007). Također su normalizirane krivulje na svim tretmanima pokazale značajnu depresiju između I i P koraka. Takva depresija ukazuje na zastoj elektronskog transporta na nivou PSI. Sličnu depresiju uočili su i Schansker i suradnici (2005b) na listovima graška (*Pisum sativum* L.) tretiranim metilviologenom te nakon izlaganja visokom intenzitetu ($3000 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Nakon HL35 tretmana NGC je uzrokovao porast F_0 , V_J , V_I i F_m vrijednosti kod mladih listova (Tablica 5). Visoki intenzitet svjetlosti u kombinaciji s povišenom temperaturom uzrokovao je odvajanje funkcionalnih molekula klorofila od reakcijskih središta PSII (F_0) (Pietrini i sur. 2005). U takvim uvjetima reoksidacija Q_A^- (V_J) je ograničena (Strasser i sur. 2004) što je dovelo do povećane akumulacije Q_A^- koji nije u mogućnost prenositi elektrone dalje u transportnom lancu elektrona što istovremeno pretpostavlja i niže razine Q_B ne-reducirajućih reakcijskih središta (V_I) (Jiang i sur. 2006a; van Heerden i sur. 2007). Također je došlo do povećanja F_m vrijednosti, odnosno do inhibicije aktivnosti OEC kompleksa. Tretman DTT-om je na mladim lisnim diskovima nakon 30 min HL35 uzrokovao samo porast F_0 i F_m vrijednosti dok smanjenje V_J i V_I parametara ukazuje da nije bilo ograničenja u prijenosu elektrona u transportnom lancu dalje od Q_A^- (Strasser i sur. 2004; Strauss i sur. 2006).

Lisni diskovi razvijenih listova nakon 30 min HL35 tretmana na oba tretmana inhibitorima pokazali su porast V_J , V_I i F_m vrijednosti (Tablica 5), odnosno, došlo je do smanjenja funkcionalnosti OEC kompleksa (Lazar 1999) te do ograničenja u prijenosu elektrona zbog ograničene reoksidacije Q_A^- te akumulacije Q_B ne-reducirajućih reakcijskih središta uslijed visokog intenziteta svjetlosti i povišene temperature (Pietrini i sur. 2005; van Heerden i sur. 2007).

Lisni diskovi i mladih i razvijenih listova su na tretmanu DTT-om pokazali povećanje prometnog broja (N), normalizirane komplementarne površine iznad OJIP krivulje (S_m), te vremena koje je potrebno da se postigne maksimalan intenzitet fluorescencije, t_{max} (Tablica 5). To ukazuje da je na tretman DTT-om uzrokovao redukciju i reoksidaciju odnosno manju akumulaciju Q_A^- i povećani protoka elektrona na Q_B što povećava mogućnost ponovnog otvaranja reakcijskih središta (Strasser i sur. 2000; Strasser i sur. 2004). S druge strane, tretman NGC-om je na razvijenim listovima (Tablica 5) pokazao potpuno suprotni učinak, a mladi lisni diskovi nisu pokazali nikakve promjene nakon istog tretmana. Visoki je intenzitet svjetlosti kod razvijenih diskova doveo do fotoinhibicije te je uz dodatak NGC-a uzrokovao inhibiciju ΔpH što za posljedicu ima inhibirani protok elektrona (Takahashi i sur. 2009).

Učinkovitost fotosintetskog aparata na lisnim diskovima mladih i razvijenih listova dobivena je mjerenjem fluorescencije klorofila *a* metodom saturacijskog pulsa. Efektivni prinos fluorescencije ($\Delta F/F_m'$) (Slika 30 A), relativni elektronski transport (relETR) (Slika 30 B) te nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ) (Slika 30 C) mjereno je na $800 \mu\text{mol}_{\text{FOTONAM}}^{-2}\text{s}^{-1}$. Maksimalni prinos fluorescencije (F_v/F_m , Slike 28 A i 28 B) oba tipa listova je na svim tretmanima iznosio manje od 0,75, što ukazuje da fotosintetski aparat oba tipa lisnih diskova na tim uvjetima (HL35) nije bio funkcionalan (Bolhar-Nordenkampf i sur. 1989), no na razvijenim listovima, one su bile u prosjeku dva 45% više. I mladi i razvijeni lisni diskovi su pokazali značajan pad $\Delta F/F_m'$ na svim tretmanima mjereni na visokom intenzitetu svjetlosti. Mladi listovi pokazali su najjači pad na tretmanu DTT-om i to za čak 90%, dok je NGC tretman izazvao slabiji pad nego kontrola. Listovi soje tretirani DTT-om pokazali su niže vrijednosti u odnosu na kontrolu nakon tretmana na visokom intenzitetu svjetlosti (Aro i sur. 1993; Jiang i sur. 2004). Pigmenti ksantofilskog ciklusa ključni su u procesima rasipanja suvišne energije u obliku topline, odnosno u nastanku NPQ-a. Kako DTT inhibira ksantofilski ciklus, doći će do smanjenja NPQ-a, a istovremeno će se suvišna energija nakupljati u razini PSII, što će pak izazvati njegovu fotoinhibiciju (Johnson i sur. 2009). U slučaju mladih lisnih diskova došlo je do smanjenja NPQ-a na tretmanu DTT-om (Slika 30 C) uz istovremeno smanjenje efektivnog prinosa PSII (Slika 30 A) i relativnog elektronskog transporta (relETR, Slika 30 B). Tretman nigericinom pokazao je jaču inhibiciju NPQ-a, no nije došlo do pada $\Delta F/F_m'$ niti pada relETR. Pad NPQ-a popraćen je i smanjenom količinom ukupnih karotenoida (Slika 31 G) izmjerenom kod mladih listova. Nigericin inhibira trans-tilakoidni protonski gradijent, što ima negativan utjecaj na aktivaciju VDE. Na taj način smanjuje se količina zeaksantina, a time i mjera nefotokemijskog gašenja fluorescencije (Ruban i sur. 2012).

Na razvijenim listovima, tretman DTT-om izazvao je smanjenje efektivnog prinosa fluorescencije od 46%, dok je tretman NGC-om izazvao smanjenje za 57% (Slika 30 A) u odnosu na kontrolu. Tretman nigericinom uzrokovao je značajan pad $\Delta F/F_m'$ i na listovima vrste *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh nakon inkubacije na visokom intenzitetu svjetlosti (Takahashi i sur. 2009). Nigericin je najvjerojatnije pojačao utjecaj fotoinhibicije na razvijenim listovima zbog bržeg oštećenja PSII nego na ostalim tretmanima, a koje je nastalo uslijed inhibiranog trans-tilakoidnog ΔpH . To je uzrokovalo i smanjenje relativnog elektronskog transporta (Slika 30 B), no nije došlo do smanjenja NPQ-a (Slika 30 C). Čini se da je veća količina ukupnih karotenoida (Slika 31 H) kod razvijenih listova bila dovoljna da i nakon tretmana održi dovoljno visoku razinu NPQ-a. Tretman DTT-om znatno je smanjio intenzitet nefotokemijskog gašenja fluorescencije koji je popraćen i laganim, no značajnim smanjenjem reETR. Niyogi i suradnici (1998) su na *npq1* mutantama vrste *A. thaliana* (L.) Heynh., kojima nedostaje VDE, pokazali da su znatno osjetljivije na fotoinhibiciju od divljeg tipa, te da je u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti došlo do značajnog sniženja NPQ-a i reETR vrijednosti. Dio NPQ je bio reverzibilan te je on uvelike ovisio o ksantofilskom ciklusu, dok je drugi, manji dio bio ovisan o pH. U skladu s time, ali i brojnim istraživanjima koja potvrđuju postojanje tri komponente NPQ (Jiang i sur. 2004; Krause i Jahns 2004; Ruban i sur. 2012), može se zaključiti da je nefotokemijsko gašenje fluorescencije klorofila *a* je u mladim listovima ovisno o protonskom gradijentu, dok je kod razvijenih listova ovisno o pigmentima ksantofilskog ciklusa.

Fotosintetski pigmenti izmjereni na lisnim diskovima mladih listova nakon 30min HL35 tretmana, pokazali su da je samo NGC uzrokovao značajno smanjenje koncentracije Chl *a* (Slika 31 A) i Chl *b* (Slika 31 C), odnosno značajan porast omjera Chl *a/b* (Slika 31 E). Otprilike polovica ukupnog klorofila te gotovo ukupna koncentracija Chl *b* razvijenih tilakoidnih membrana je sadržano u LHCII kompleksima. Iz tog razloga promjene u akumulaciji LHCII kompleksa moraju se odraziti u promjeni omjera Chl *a/b* i obratno te se on smatra indikatorom količine LHCII u membranama (Busheva i sur. 1991). Povećani omjer Chl *a/b* ukazuje na smanjene antene PSII, što je najvjerojatnije posljedica fotoinhibitornih procesa do kojih je došlo zbog visokog intenziteta svjetlosti (Jagtap i sur. 1998; Golan i sur. 2006). S druge strane, konstantne koncentracije fotosintetskih pigmenata dobivene su i na brojnim istraživanjima, uglavnom između divljeg tipa i *npq1* mutante vrste *A. thaliana* (L.) Heynh (Niyogi i sur. 1998; Peterson i Havir 2000; Yin i sur. 2010) što je u skladu s dobivenim koncentracijama svih istraživanih fotosintetskih pigmenata na lisnim diskovima razvijenih listova (Slike 31 B, 31 D i 31 H).

D1 protein u lisnim diskovima mladih listova (Slika 32 A) pokazao je na oba tretmana smanjenu akumulaciju dok se u lisnim diskovima razvijenim listovima ona nije promijenila. Ranija istraživanja su također pokazala da DTT i nigericin utječu na ekspresiju *psbA* mRNA tako da inhibiraju biosintezu proteina. Visoka koncentracija protona u tilakoidnom lumenu povećava razinu biosinteze proteina, a kako nigericin, a posredno i DTT, inhibiraju trans-tilakoidni gradijent, biosinteza će biti blokirana (Muhlbauer i Eichacker 1998; Zhang i sur. 2000). Tikkanen i suradnici (2008) koristili su *npq4* mutantu kojoj nedostaje PsbS protein. Te mutante imaju smanjeni kapacitet u održavanju ravnoteže u apsorpciji i iskorištavanju svjetlosne energije na visokom intenzitetu svjetlosti. U odnosu na divlji tip, došlo je do smanjenja u akumulaciji D1 proteina što je u skladu s dobivenim akumulacijama D1 proteina mladih lisnih diskova. Takahashi i suradnici (2009) koristili su *npq1* mutantu vrste *A. thaliana* (L.) Heynh kojoj je promijenjen gen za VDE te pokazuju značajno smanjenje NPQ-a, naročito qE komponente. Pokazali su da učinkovito nefotokemijsko gašenje fluorescencije osigurava učinkovitu sintezu proteina koji su uključeni u popravak PSII. Neučinkovitost NPQ ubrzava fotoinhibiciju, naročito uslijed visokog intenziteta svjetlosti te dovodi do povećane produkcije ROS-a što pak dovodi do inhibirane sinteze D1 proteina. Listovi paprike (*Capsicum annuum* L.) tretirani kombinacijom inhibitora sinteze proteina i DTT-a također su pokazali maksimalnu fotoinaktivaciju PSII (Matsubara i Chow 2004). Značajno smanjenje NPQ vrijednosti mladih lisnih diskova (Slika 31 C) se slaže s slabijom akumulacijom D1 proteina na tretmanima NGC-om i DTT-om. Inhibitori su utjecali na smanjenje NPQ-a, a u kombinaciji s visokim intenzitetom svjetlosti došlo je do povećanog nakupljanja ROS-a što je najvjerojatnije inhibiralo popravak D1 proteina. Kod razvijenih listova smokve mjerenih tijekom 24h uočena je odgođena degradacija oštećenog D1 proteina, dok je ona kod mladih listova bila nešto brža (Slika 19 A), što može objasniti nepromijenjene količine ovog proteina na razvijenim listovima iako je tretman DTT-om pokazao značajno smanjenje parametra NPQ (Slika 31 C).

Nigericin, a posredno i DTT, smanjuju trans-tilakoidni protonski gradijent što ograničava elektronski transport (Matsubara i Chow 2004). Smanjenje pH u stromi ograničava karbamilaciju Rubisco-a što direktno utječe na njegovu akumulaciju (Crafts-Brandner i Salvucci 2000; Ruuska i sur. 2000). To je u potpunosti sukladno s dobivenim rezultatima akumulacije Rubisco-a (Slika 32 B). Mladi listovi su na tretmanu NGC-om pokazali najmanju akumulaciju ovog proteina, a na tretmanu DTT-om nešto višu, no oba tretmana su pokazala znatno niže vrijednosti u odnosu na kontrolu. Povećani intenzitet svjetlosti i oksidativni stres uzrokuju ubranu fragmentaciju i degradaciju Rubisco-a (Ishida i sur. 1998) što odgovara dobivenim rezultatima. Razvijeni su pak listovi pokazali najmanju akumulaciju na tretmanu DTT-om, dok se ona na NGC tretmanu nije puno razlikovala od kontrolne. Relativno male

promjene u akumulaciji D1 (Slika 32 A) i Rubisco-a (Slika 32 B) kod lisnih diskova razvijenih listova najvjerojatnije su posljedica veće prilagodljivosti razvijenih listova na uvjete povišenog intenziteta svjetlosti.

Inhibitori fotosinteze se često koriste i kao umjetni akceptori elektrona (metilviologen) te na taj način induciraju stvaranje ROS-a. Drugi se pak koriste kao inhibitori biosinteze u različitim metaboličkim putovima (Arora i sur. 2002; Mano 2002). DTT inhibira VDE koja je dio ksantofilskog ciklusa. Niski pH i askorbat nužni su za djelovanje VDE. Visoki intenzitet svjetlosti smanjit će količinu askorbata te će na taj način i askorbat postati limitirajući čimbenik koji smanjuje aktivnost VDE, ali i aktivnost APX (Neubauer 1993; Takahashi i sur. 2002; Fernandez-Marin i sur. 2009). Sami karotenoidi imaju zaštitnu ulogu u gašenju tripletnog klorofila ($^3\text{Chl}^*$) i singletnog kisika ($^1\text{O}_2$) te kao inhibitori peroksidacije membranskih lipida. Askorbat i glutation su obilni topivi antioksidansi koji se mogu naći u kloroplastima, a također i enzimi SOD i CAT koji neutraliziraju ROS (Niyogi i sur. 1998; Triantaphylides i Havaux 2009). Glutation-askorbatni ciklus regenerira elektrone koji su nužni za redukciju askorbata. Na taj način se reducirani glutation (GSH) vraća u oksidirani oblik (GSSG) za što je zaslužan enzim GR, a poznato je da aktivnost metil-viologena inhibira aktivnost GR (Ivanova Katerova i Miteva 2010). Tretman NGC-om na mladim listovima uzrokovao je pad aktivnosti svih istraživanih enzima (Slike 34 A, 34 C, 34 E, 34 G i 34 I), dok je DTT tretman smanjio aktivnost svih enzima osim CAT, koja je pokazala značajan porast u odnosu na kontrolu. NGC je značajno smanjio količinu TBARS (Slika 33 A) i karbonila (Slika 33 C), dok je DTT tretman utjecao na smanjenje proteinskih karbonila, no količina TBARS se nije značajno promijenila. Većina inhibitora fotosinteze, pa tako i DTT i NGC u kombinaciji s visokim osvjetljenjem, često smanjuju aktivnosti antioksidativnih enzima zbog inhibicije do koje dolazi uslijed snažnog utjecaja stresa (Jung 2004a). Smanjenje nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila *a*, do kojeg je došlo djelovanjem nigericina i DTT-a, dovodi do povećanog stvaranja ROS-a, prvenstveno H_2O_2 i $^1\text{O}_2$, koji antioksidativni enzimi ne mogu učinkovito ukloniti (Takahashi i sur. 2009). Do povećanja aktivnosti CAT (Slika 34 C) na DTT tretmanu najvjerojatnije je došlo zbog povećane akumulacije H_2O_2 koji je nastao djelovanjem samog herbicida. Niske aktivnosti ostalih enzima ukazuju na povećanu osjetljivost mladih listova na utjecaj inhibitora, naročito nigericina.

Razvijeni listovi na tretmanu NGC-om pokazali su pad aktivnosti enzima SOD (Slika 34 B), CAT (Slika 34 D) i APX (Slika 34 F), dok su GPOD (Slika 34 J) i GR (Slika 34 H) pokazali značajan porast. DTT je značajno povećao aktivnost SOD, smanjio aktivnosti CAT, APX i GPOD, dok se aktivnost GR nije promijenila. Tretman DTT-om utjecao je na smanjenje

koncentracije TBARS (Slika 33 B), dok su oba tretmana utjecala na smanjenje količine karbonila (Slika 33 D). Zhang i suradnici (2007) pokazali su na soji pod utjecajem suše da povećanje antioksidativne aktivnosti povećava peroksidaciju lipida. Prema tome, niže aktivnosti većine antioksidativnih enzima izmjerenih u oba tipa listova, ali na različitim tretmanima, mogu se povezati sa smanjenjem peroksidacije lipida. Askorbat je nužan za regeneraciju glutation-askorbatnog ciklusa. DTT tretman u kombinaciji s visokim intenzitetom svjetlosti pokazao je na listovima soje i loze značajno smanjenu aktivnost APX što je rezultiralo povećanim nakupljanjem H_2O_2 (Pastenes i sur. 2001; Perez i Maureira 2003). Neubauer (1993) je također pokazao inhibitorno djelovanje DTT-a na aktivnost APX-a u izoliranim kloroplastima salate (*Lactuca sativa* L.) i špinata (*Spinacea oleracea* L.) a istovremeno DTT nije utjecao na aktivnost SOD. DTT inhibira VDE te istovremeno pojačava protonaciju tilakoidnog lumena te stimulira nastanak H_2O_2 . Na taj način utječe na procese otpuštanja suvišne energije u obliku topline. Djelovanje NGC, koji inhibira trans-tilakoidni protonski gradijent, također na taj način smanjuje količinu askorbata. tretman NGC-om je u razvijenim diskovima pak djelomično aktivirao antioksidativni sustav (GPOD (Slika 34 J) i GR (Slika 34 H)), dok je tretman DTT-om puno jače utjecao na njih. Oba tipa listova pokazala su niže razine proteinskih karbonila na oba tretmana (NGC i DTT) u odnosu na kontrolu (Slika 33 D). Poznato je da kloroplasti posjeduju vrlo učinkovite proteaze koje uklanjaju oštećene proteine. Karbonilirani proteini podložni su proteolitičkom djelovanju jer karbonilna skupina djeluje kao specifični signal. Također, proteolitički kapacitet za oštećene proteine povećava se s intenzitetom oksidativnog stresa (Juszczuk i sur. 2008; Rinalducci i sur. 2008). S obzirom na dobivene rezultate, uklanjanje oštećenih proteina vrlo je učinkovito u oba tipa listova smokve.

Ovo istraživanje fotosintetske učinkovitosti i antioksidativnog odgovora mladih i razvijenih listova smokve pokazuje da mladi i razvijeni listovi imaju različite strategije u obrani od svjetlosnog stresa. Pojačano otpuštanje suvišne energije u obliku topline i aktivniji antioksidativni sustav, povećana osjetljivost na kombinaciju svjetlosnog stresa s niskom temperaturom te utjecaj NGC-a glavne su prednosti mladih listova. Razvijeni listovi su sposobniji veći dio energije iskoristiti u fotokemijskim procesima i iako su podložniji oštećenjima proteina i peroksidaciji lipida, mnogo su učinkovitiji u oporavku nakon fotoinhibicije uslijed učinkovitijeg sustava promjene D1 proteina. Također, pokazali su pojačanu osjetljivost na kombinaciju visokog intenziteta svjetlosti s povišenom temperaturom te na utjecaj DTT-a.

7. ZAKLJUČAK

Na osnovi istraživanja dnevnih promjena fotosintetske učinkovitosti i antioksidativnog odgovora mladih i razvijenih listova smokve može se zaključiti sljedeće:

- Oba tipa listova imaju funkcionalan fotosintetski aparat ($F_v/F_m > 0.75$), no on je kod mladih listova manje učinkovit u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti i povišene temperature (13h). Razlog sabije učinkovitosti fotosintetskog aparata u mladim listovima nije primarna fotokemija PSII, već njihova slabija sposobnost elektronskog transporta.
- Slabija sposobnost elektronskog transporta u mladim listovima bila je uzrokovana smanjenim protokom elektrona u samom PSII (s Q_A^- na Q_B) što se očitovalo u promijeni oblika OJIP krivulje u J koraku (povišene vrijednosti V_J).
- Slabija sposobnost elektronskog transporta u mladim listovima uzrokovati će i smanjeni trans-tilakoidni transport protona što onda uzrokuje slabiju akumulaciju proteina Rubisco LSU tijekom dnevnog ritma (13h) u odnosu na razvijene listove.
- Mladi listovi su osjetljiviji na visoki intenzitet svjetlosti i povišenu temperaturu u odnosu na razvijene listove, što je dovelo do djelomične inaktivacije reakcijskih središta i smanjenje efikasnosti PSII, te su veći dio apsorbirane energije otpustili nefotokemijskim putem (povišene vrijednosti parametara NPQ i $D1_0/RC$).
- Pri visokim intenzitetima svjetlosti, razvijeni listovi efikasnije upotrebljavaju apsorbiranu energiju u fotokemijskim reakcijama u usporedbi s mladim listovima. Smanjenje fotosintetske učinkovitosti razvijenih listova (parametar PI_{ABS}) pri visokim intenzitetima svjetlosti posljedica je više razine Q_B ne-reducirajućih reakcijskih središta (niže vrijednosti parametra V_i) što je u skladu s jačom degradacijom proteina D1 u odnosu na mlade listove. Osim toga, razvijeni listovi pokazali su jaču sposobnost akumulacije proteina D1 tijekom noći u odnosu na mlade listove iz čega se može zaključiti da posjeduju i učinkovitiji sustav promijene proteina D1 što im omogućuje i brži oporavak od fotoinhibicije uzrokovane visokim intenzitetom svjetlosti tijekom dnevnog ritma (13h).
- Mladi listovi posjeduju učinkovitiji enzimatski antioksidativni sustav s obzirom da u 13h nisu pokazali oksidacijska oštećenja niti lipida niti proteina, za razliku od razvijenih listova koji su tijekom podneva (13h) pokazali porast razine lipidne peroksidacije (parametar TBARS).
- Povećane aktivnosti enzima APX, GPOD, CAT i GR u mladim listovima u usporedbi s povećanim aktivnostima SOD, CAT i GR u razvijenim listovima ukazuju na postojanje različitih strategija ovih razvojnih stadija listova u zaštiti od oksidativnog stresa tijekom dnevnog ritma.

Istraživanja fotosintetske učinkovitosti i antioksidativnog odgovora mladih i razvijenih listova smokve u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti i povišene temperature (HL35), visokog intenziteta svjetlosti i niske temperature (HL10), niskog intenziteta svjetlosti i povišene temperature (LL35) i niskog intenziteta svjetlosti i niske temperature (LL10) daju sljedeće zaključke:

- Snažnija inhibicija maksimalnog prinosa kvanta PSII (F_v/F_m) i indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) na tretmanima HL35 i HL10 u odnosu na tretmane LL35 i LL10 i početno stanje (P) ukazuje da je u kombinaciji svjetlosti i temperature, visoki intenzitet svjetlosti ključni čimbenik koji utječe na fotosintetsku funkcionalnost i mladih i razvijenih listova.
- Mladi listovi izloženi jakom intenzitetu svjetlosti (HL tretman) pokazali su jaču inhibiciju fotosintetske učinkovitosti pri kombinaciji visokog intenziteta svjetlosti i niske temperature (HL10), što ukazuje na njihovu pojačanu osjetljivost prema niskim temperaturama, dok su razvijeni listovi osjetljiviji na kombinaciju visokog intenziteta svjetlosti i visoke temperature (HL35).
- Izraženije smanjenje elektronskog transporta po aktivnom reakcijskom središtu (ET_0/RC) u oba tipa listova posljedica je jače degradacije proteina D1 na tretmanima s visokim intenzitetom svjetlosti (HL35 i HL10), neovisno o temperaturi, u odnosu na tretmane LL i početno stanje (P).
- Oba tipa listova pokazala su najjače nefotokemijsko otpuštane suviška pobudne energije (DI_0/RC) na tretmanima koji su prouzročili najjaču fotoinhibiciju (HL35 za razvijene listove i HL10 za mlade listove) što ukazuje na postojanje Q_A ne-reducirajućih (tzv. tihih) reakcijskih središta.
- Razine lipidne peroksidacije (TBARS) u mladim listovima pokazale su najviše vrijednosti na tretmanima s povišenom temperaturom neovisno o intenzitetu svjetlosti (HL35 i LL 35), dok su razvijeni listovi imali povišene vrijednosti parametra TBARS na tretmanima HL35, HL10 i LL35 iz čega se može zaključiti da povišena temperatura uzrokuje oksidacijska oštećenja lipida u oba tipa listova, neovisno o intenzitetu svjetlosti.
- Proteinski karbonili (Karb) u oba tipa listova bili su povišeni samo na tretmanu HL10 u odnosu na početno stanje, što ukazuje na njihovu podjednaku osjetljivost prema ovom tretmanu, odnosno na podjednaku neučinkovitost antioksidativnog sustava u zaštiti proteina pri niskim temperaturama i visokom intenzitetu svjetlosti.
- Nepromijenjene aktivnosti peroksidaza (APX i GPOD) uz povećanje aktivnosti SOD, CAT i GR kod razvijenih listova te smanjenje aktivnosti SOD i peroksidaza uz istovremeno povećanje aktivnosti CAT i GR u mladim listovima ukazuju na nepravilan

obrazac ponašanja i potvrđuju prisutnost različitih strategija zaštite mladih i razvijenih listova od kombinacija svjetlosnog i temperaturnog stresa.

Istraživanje utjecaja inhibitora nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila *a* na fotosintetsku učinkovitost i antioksidativni odgovor mladih i razvijenih listova smokve omogućava sljedeće zaključke:

- Oba tipa lisnih diskova pokazali su smanjenu funkcionalnost fotosintetskog aparata (F_v/F_m , PI_{ABS}) zbog djelovanja inhibitora nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila *a* (DTT, NGC), pri čemu su mladi listovi pokazali pojačanu osjetljivost na nigericin, dok su razvijeni listovi bili osjetljiviji na utjecaj DTT-a.
- Fotoinhibitorno djelovanje NGC u oba tipa listova uzrokovalo je porast varijabilne fluorescencije u J i I koracima (V_J , V_I) što je dovelo do smanjenja reoksidacije Q_A^- i smanjenog transporta elektrona na Q_B te, posljedično, dovelo do fotoinhibicije.
- Utjecaj DTT-a pokazao je različiti utjecaj na mlade i razvijene listove u J i I koracima (V_J , V_I). Dok je u razvijenim listovima zabilježen porast oba parametra u tretmanu s DTT-om, kod mladih listova su se vrijednosti ovih parametara snizile u odnosu na kontrolu. Iz toga se može zaključiti da tretman s DTT-om nije uzrokovao ograničenja u prijenosu elektrona s Q_A^- na Q_B u mladim listovima.
- Iako parametri oksidacijskog stresa (TBARS i Karb) nisu pokazali porast niti u mladim niti u razvijenim listovima, inhibicija NPQ-a u oba tipa listova pod utjecajem NGC-a i DTT-a u mladim listovima dovela je do degradacije ključnih fotosintetskih proteina (D1 i Rubisco LSU), pri čemu je degradacija LSU bila znatno jače izražena. U razvijenim listovima nisu se pokazale promijene u akumulaciji proteina D1, dok je LSU pokazao smanjenu akumulaciju u odnosu na kontrolu, ali u znatno manjem opsegu nego kod mladih listova. Iz ovog se može zaključiti da se pojačana osjetljivost mladih listova na fotoinhibiciju uslijed uvjeta jakog intenziteta svjetlosti i povišene temperature (HL35) bazira ne samo na smanjenju učinkovitosti PSII, već i na smanjenoj efikasnosti ukupnih fotosintetskih procesa.
- Utjecaj fotoinhibitornih uvjeta (HL35) u kombinaciji s inhibitorima nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila *a* uzrokovala je smanjenje aktivnosti većine antioksidativnih enzima u oba tipa listova u odnosu na kontrolu. Kao ni u prethodnim eksperimentima, niti ovdje nije utvrđen logičan obrazac ponašanja ovih promjena. Budući da parametri oksidacijskog stresa (TBARS i Karb) nisu pokazali porast ni u mladim ni u razvijenim listovima u odnosu na kontrolu, može se zaključiti da je razina antioksidativnih enzima bila dovoljna za učinkovitu zaštitu lipida i proteina u opisanim stresnim uvjetima.

Temeljem prethodno navedenih zaključaka može se izdvojiti da mladi i razvijeni listovi imaju različite strategije u obrani od svjetlosnog stresa, te da su pojačano otpuštanje suvišne energije u obliku topline i aktivniji antioksidativni sustav, povećana osjetljivost na kombinaciju svjetlosnog stresa s niskom temperaturom kao i na utjecaj nigericina glavne karakteristike mladih listova. Razvijeni listovi su sposobniji veći dio energije iskoristiti u fotokemijskim procesima i iako su podložniji oštećenjima proteina i peroksidaciji lipida, mnogo su učinkovitiji u oporavku nakon fotoinhibicije uslijed učinkovitijeg sustava promjene D1 proteina. Također, razvijeni listovi su pokazali pojačanu osjetljivost na kombinaciju visokog intenziteta svjetlosti s povišenom temperaturom i utjecaj ditiotreitola.

8. LITERATURA

- Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology 105: 121-126.
- Alberte RS, McClure PR, Thornber JP. 1976. Photosynthesis in trees: organization of chlorophyll and photosynthetic unit size in isolated gymnosperm chloroplasts. Plant Physiology 58(3): 341-344.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. Molecular biology of the cell. New York, USA: Garland Science.
- Allakhverdiev SI, Kreslavski VD, Klimov VV, Los DA, Carpentier R, Mohanty P. 2008. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. Photosynthesis Research 98(1-3): 541-550.
- Allen DJ, Ort DR. 2001. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. Trends in Plant Science 6(1): 36-42.
- Alves PL, Magalhaes ACN, Barja PR. 2002. The phenomenon of photoinhibition of photosynthesis and its importance in reforestation. The Botanical Review 68(2): 193-208.
- Amuntus A, Drory O, Nelson N. 2008. A glimpse into the atomic structure of plant photosystem I. Str. 65-81 u: Fromme P. (ur) Photosynthetic protein complexes. Weinheim, Germany: Wiley - Blackwell Verlag GmbH&Co.
- Aro EM, McCaffery S, Anderson JM. 1993. Photoinhibition and D1 protein degradation in peas acclimated to different growth irradiances. Plant Physiology 103(3): 835-843.
- Arora A, Sairam RK, Srivastava GC. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. Current Science 82(10): 1227-1238.
- Asada K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiology 141(2): 391-396.
- Bačić T. 2003. Morfologija i anatomija bilja. Osijek, Hrvatska: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.
- Badelj Mavsar D, Bohanec B, Bučar Miklavčič M, Butinar B, Javornik B, Jakše J, Podgornik M, Prgomet Ž, Skrt A, Tomažič I, Vrhovnik I, Valenčič V. 2008. The common fig (*Ficus carica* L.) in Istria: morphological, molecular and some chemical characteristics. Koper, Univerza na Primorskem, Znanstveno raziskovalno središče, Založba Annales.
- Bascunan-Godoy L, Sanhueza C, Cuba M, Zuniga GE, Corcuera LJ, Bravo LA. 2012. Cold-acclimation limits low temperature induced photoinhibition by promoting a higher photochemical quantum yield and a more effective PSII restoration in darkness in the Antarctic rather than the Andean ecotype of *Colobanthus quitensis* Kunt Bartl (*Caryophyllaceae*). BioMed Central Plant Biology 12: 114-128.

- Beis A, Patakas A. 2012. Relative contribution of photoprotection and anti-oxidative mechanisms to differential drought adaptation ability in grapevines. *Environmental and Experimental Botany* 78: 173-183.
- Beisel KG. 2010. Dynamic adjustment of photosynthetic pigment composition in leaves, Doktorski rad, Heinrich-Heine Universität, Dusseldorf.
- Berg JM, Tymoczko JT, Stryer L. 2002. *Biochemistry*. New York, USA: Freeman, WH.
- Berger S, Weichert H, Porzel A, Wasternack C, Kuhn H, Feussner I. 2001. Enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation in leaf development. *Biochimica et biophysica acta* 1533(3): 266-276.
- Bhattacharjee S. 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science* 89(7): 1113-1121.
- Bilger W, Björkman O, Thayer SS. 1989. Light-induced spectral absorbance changes in relation to photosynthesis and the epoxidation state of xanthophyll cycle components in cotton leaves. *Plant Physiology* 91(2): 542-551.
- Björkman O, Demming B. 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170(4): 489-504.
- Bolhar-Nordenkamp HR, Long SP, Baker NR, Öquist G, Schreiber U, Lechner EG. 1989. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: A review of current Instrumentation. *Functional Ecology* 3(4): 497-514.
- Booij-James IS, Swegle WM, Edelman M, Mattoo AK. 2002. Phosphorylation of the D1 photosystem II reaction center protein is controlled by an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiology* 130: 2069-2075.
- Böttcher B, Graber P. 2008. The Structure of the H⁺-ATP synthase from Chloroplasts. Str. 201-216 u: Fromme P. (ur) *Photosynthetic protein complexes*. Weinheim, Germany: Wiley - Blackwell Verlag GmbH&Co.
- Bradford MM. 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2): 248-254.
- Bulychev AA, Cherkashin AA, Rubin AB. 2010. Dependence of chlorophyll P700 redox transients during the induction period on the transmembrane distribution of protons in chloroplasts of pea leaves. *Russian Journal of Plant Physiology* 57(1): 20-27.
- Burritt DJ, Mackenzie S. 2003. Antioxidant metabolism during acclimation of *Begonia x erythrophylla* to high light levels. *Annals of Botany* 91(7): 783-794.

- Busheva M, Garab G, Liker E, Tóth Z, Szèll M, Nagy F. 1991. Diurnal fluctuations in the content and functional properties of the light harvesting chlorophyll *a/b* complex in thylakoid membranes. *Plant Physiology* 95: 997-1003.
- Cai Z-Q, Slot M, Fan Z-X. 2005. Leaf development and photosynthetic properties of three tropical tree species with delayed greening. *Photosynthetica* 43(1): 91-98.
- Cardona T, Sedoud A, Cox N, Rutherford AW. 2012. Charge separation in photosystem II: a comparative and evolutionary overview. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817(1): 26-43.
- Cen YP, Sage RF. 2005. The regulation of Rubisco activity in response to variation in temperature and atmospheric CO₂ partial pressure in sweet potato. *Plant Physiology* 139(2): 979-990.
- Cheeseman JM. 2007. Hydrogen peroxide and plant stress: A challenging relationship. *Plant Stress* 1(1): 4-15.
- Chen L, Jia H, Tian Q, Du L, Gao Y, Miao X, Liu Y. 2012. Protecting effect of phosphorylation on oxidative damage of D1 protein by down-regulating the production of superoxide anion in photosystem II membranes under high light. *Photosynthesis Research* 112(2): 141-148.
- Cheng L, Fuchigami LH, Breen PJ. 2001. The relationship between photosystem II efficiency and quantum yield for CO₂ assimilation is not affected by nitrogen content in apple leaves. *Journal of Experimental Botany* 52(362): 1865-1872.
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK. 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science* 12(10): 444-451.
- Christen D, Schonmann S, Jermini M, Strasser, RJ, Defago G. 2007. Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by in situ chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 60: 504-514.
- Clegg RM. 2004. Nuts and bolts of excitation energy migration and energy transfer. Str. 83-105 u: Papageorgiou GC, Govindjee. (ur) Chlorophyll *a* fluorescence. A signature of photosynthesis. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Contran N, Paoletti E, Manning WJ, Tagliaferro F. 2009. Ozone sensitivity and ethylendiurea protection in ash trees assessed by JIP chlorophyll *a* fluorescence transient analysis. *Photosynthetica* 47(1): 68-78.
- Crafts-Brandner SJ, Salvucci ME. 2000. Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 97(24): 13430-13435.

- Cramer WA, Baniulus D, Yamashita E, Zhang H, Zatsman AI, Hendrich MP. 2008. Cytochrome *b₆f* complex, colon structure, spectroscopy, and function of heme *c_n*: n-side electron and proton transfer reactions. Str. 155-179 u: Fromme P. (ur) Photosynthetic protein complexes. Weinheim, Germany: Wiley - Blackwell Verlag GmbH&Co.
- Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cellular and Molecular Life Sciences 57(5): 779-795.
- Davies KJ. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. The Journal of Biological Chemistry 262(20): 9895-9901.
- Demmig B, Winter K, Kruger A, Czygan FC. 1987. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves: a possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. Plant Physiology 84(2): 218-224.
- Demmig-Adams B, Adams WW, Ebbert V, Logan BA. 1999. Ecophysiology of the xanthophyll cycle. Str. 245-269 u: Frank HA, Young AJ, Britton G, Cogdell RJ. (ur) The photochemistry of carotenoids. New York, USA: Kluwer Academic Publishers.
- Demmig-Adams B, Adams WW. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. Trends in Plant Science 1(1): 21-26.
- Desimone M, Henke A, Wagner E. 1996. Oxidative stress induces partial degradation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in isolated chloroplasts of barley. Plant Physiology 111(3): 789-796.
- Dolphin D, Avramovic O, Poulson R. 1989. Glutathione: Chemical, biochemical and metabolic aspect. New York, USA: John Wiley & Sons Inc.
- Einset J, Winge P, Bones A. 2007. ROS signaling pathways in chilling stress. Plant Signal and Behavior 2(5): 365-367.
- Eullaffroy P, Frankart C, Aziz A, Couderchet M, Blaise C. 2009. Energy fluxes and driving forces for photosynthesis in *Lemna minor* exposed to herbicides. Aquatic Botany 90(2): 172-178.
- Fath A, Bethke PC, Jones RL. 2001. Enzymes that scavenge reactive oxygen species are down-regulated prior to gibberellic acid-induced programmed cell death in barley aleurone. Plant Physiology 126(1): 156-166.
- Fernandez-Marin B, Balaguer L, Esteban R, Becerril JM, Garcia-Plazaola JI. 2009. Dark induction of the photoprotective xanthophyll cycle in response to dehydration. Journal of Plant Physiology 166(16): 1734-1744.

- Flaishman MA, Rodov V, Stover E. 2008. The fig: Botany, horticulture, and breeding. Str. 113-196 u: Janick J. (ur) Horticultural Reviews, vol. 34. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Force L, Critchley C, van Rensen JJ. 2003. New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. *Photosynthesis Research* 78(1): 17-33.
- Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM. 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* 100(2): 241–254.
- Foyer CH, Noctor G. 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist* 146(3): 359-388.
- Fromme P, Grotjohann I. 2008. Overview of Photosynthesis. Str. 1-18 u: Fromme P. (ur) Photosynthetic Protein Complexes. Weinheim, Germany: Wiley - Blackwell Verlag GmbH&Co.
- García-Plazaola JI, Artetxe U, Becerril JM. 1999. Diurnal changes in antioxidant and carotenoid composition in the Mediterranean sclerophyll tree *Quercus ilex* L. during winter. *Plant Science* 143(2): 125-133.
- Giannopolitis CN, Ries SK. 1977. Superoxide dismutases. 1. Occurrence in higher-plants. *Plant Physiology* 59(2): 309-314.
- Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(12): 909-930.
- Golan T, Muller-Moule P, Niyogi KK. 2006. Photoprotection mutants of *Arabidopsis thaliana* acclimate to high light by increasing photosynthesis and specific antioxidants. *Plant Cell Environment* 29(5): 879-887.
- Gonçalves JFC, Santos Jr. UM, Nina Jr. AR, Chevreuil LR. 2007. Energetic flux and performance index in copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) and mahogany (*Swietenia macrophylla* King) seedlings grown under two irradiance environments. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19(3): 171-184.
- Govindjee. 2004. Chlorophyll *a* fluorescence: A bit of basic and history. Str.1-42 u: Papageorgiou GC, Govindjee. (ur) Chlorophyll *a* fluorescence: A signature of photosynthesis. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Guo W-D, Guo Y-P, Liu J-R, Mattson N. 2009. Midday depression of photosynthesis is related with carboxylation efficiency decrease and D1 degradation in bayberry (*Myrica rubra*) plants. *Scientia Horticulturae* 123(2): 188-196.
- Guo Y-P, Zhou H-F, Zhang L-C. 2006. Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against photooxidation during high temperature stress in two citrus species. *Scientia Horticulturae* 108(3): 260-267.

- Gür A, Demirel U, Ozden M, Kajhraman A, Copur O. 2010. Diurnal gradual heat stress affects antioxidant enzymes, proline accumulation and some physiological components in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology* 9(7): 1008-1015.
- He WZ, Malkin R. 1998. Photosystems I and II. Str. 29-43 u: Raghavendra AS. (ur) *Photosynthesis: A treatise*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Hewezi T, Leger M, Gentzbittel L. 2008. A comprehensive analysis of the combined effects of high light and high temperature stresses on gene expression in sunflower. *Annals of Botany* 102(1): 127-140.
- Hideg E, Kalai T, Hideg K, Vass I. 2000. Do oxidative stress conditions impairing photosynthesis in the light manifest as photoinhibition? *Philosophical Transactions of Royal Society of London Series B Biological Sciences* 355(1402): 1511-1516.
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H. 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology* 42(5): 462-468.
- Hodges DM, Andrews CJ, Johnson DA, Hamilton RI. 1997. Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *Journal of Experimental Botany* 48(310): 1105-1113.
- Hooper JK. 1998. Chloroplast structure and development. Str. 3-17 u: Raghavendra AS. (ur) *Photosynthesis: A comprehensive treatise*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Horton P, Ruban AV. 1992. Regulation of Photosystem II. *Photosynthesis Research* 34: 375-385.
- Horton P, Wentworth M, Ruban A. 2005. Control of the light harvesting function of chloroplast membranes: the LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching. *FEBS Letters* 579(20): 4201-4206.
- Horvat D, Ivezić M. 2005. *Biometrika u poljoprivredi*. Osijek, Hrvatska: Poljoprivredni fakultet.
- Hrstka M, Urban O, Petriu E, Babak L. 2007. Diurnal regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity and its content in Norway spruce needles. *Photosynthetica* 45(3): 334-339.
- Huang M, Guo Z. 2005. Responses of antioxidative system to chilling stress in two rice cultivars differing in sensitivity. *Biologia Plantarum* 49(1): 81-84.
- Huang W, Zhang SB, Cao KF. 2010. The different effects of chilling stress under moderate light intensity on photosystem II compared with photosystem I and subsequent recovery in tropical tree species. *Photosynthesis Research* 103(3): 175-182.
- Huner NP, Öquist G, Sarhan F. 1998. Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science* 3(6): 224-230.

- IPGRI, CIHEAM. 2003. Descriptors for Fig. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute.
- Ishida H, Shimizu S, Makino A, Mae T. 1998. Light-dependent fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in chloroplasts isolated from wheat leaves. *Planta* 204(3): 305-309.
- Iturbe-Ormaetxe I, Escuredo PR, Arrese-Igor C, Becana M. 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiology* 116(1): 173-181.
- Ivanov AG, Rosso D, Savitch LV, Stachula P, Rosembert M, Öquist G, Hurry V, Huner NP. 2012. Implications of alternative electron sinks in increased resistance of PSII and PSI photochemistry to high light stress in cold-acclimated *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis Research* 113(1-3): 191-206.
- Ivanova Katerova Z, Miteva LP-E. 2010. Glutathione and herbicide resistance in plants. Str. 191-208 u: Anjum NA, Umar S, Chan M-T. (ur) Ascorbate-glutathione pathway and stress tolerance in plants. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Jagtap V, Bhargava S. 1995. Variation in the antioxidant metabolism of drought tolerant and drought susceptible varieties of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. exposed to high light, low water and high temperature stress. *Journal of Plant Physiology* 145: 195-197.
- Jagtap V, Bhargava S, Streb P, Feierabend J. 1998. Comparative effect of water, heat and light stresses on photosynthetic reactions in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Journal of Experimental Botany* 49(327): 1715-1721.
- Janmohammadi, M. (2012). Metabolomic analysis of low temperature responses in plants. *Current Opinion in Agriculture* 1(1): 1-6.
- Janska A, Maršik P, Zelenkova S, Ovesna J. 2011. Cold stress and acclimation – what is important for metabolic adjustment? *Plant Biology* 12: 395-405.
- Ji B, Jiao D. 2000. Relationships between D1 protein, xanthophyll cycle and photodamage-resistant capacity in rice (*Oryza sativa* L.). *Chinese Science Bulletin* 45(17): 1569-1575.
- Jiang C-D, Gao H-Y, Zou Q, Jiang G-M. 2004. Inhibition of photosynthesis by shift in the balance of excitation energy distribution between photosystems in dithiothreitol treated soybean leaves. *Photosynthetica* 42(3): 409-415.
- Jiang C-D, Jiang G-M, Wang X, Li L-H, Biswas DK, Li Y-G. 2006a. Increased photosynthetic activities and thermostability of photosystem II with leaf development of elm seedlings (*Ulmus pumila*) probed by the fast fluorescence rise OJIP *Environmental and Experimental Botany* 58(1-3): 261-268.

- Jiang C-D, Li P-M, H.-Y. G, Zou Q, Jiang G-M, Li L-H. 2005. Enhanced photoprotection at the early stages of leaf expansion in field-grown soybean plants. *Plant Science* 168(4): 911-919.
- Jiang C-D, Shi L, Gao H-Y, Schansker G, Toth SZ, Strasser RJ. 2006b. Development of photosystems 2 and 1 during leaf growth in grapevine seedlings probed by chlorophyll *a* fluorescence transient and 820 nm transmission *in vivo*. *Photosynthetica* 44(3): 454-463.
- Johnson MP, Perez-Bueno ML, Zia A, Horton P, Ruban AV. 2009. The zeaxanthin-independent and zeaxanthin-dependent qE components of nonphotochemical quenching involve common conformational changes within the photosystem II antenna in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 149(2): 1061-1075.
- Joly D, Carpentier R. 2007. The oxidation/reduction kinetics of the plastoquinone pool controls the appearance of the I-peak in the O-J-I-P chlorophyll fluorescence rise: effects of various electron acceptors. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 88(1): 43-50.
- Jung S. 2004a. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. *Plant Science* 166: 459-466.
- Jung S. 2004b. Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. *Plant Physiology and Biochemistry* 42(3): 225-231.
- Juszczuk IM, Tybura A, Rychter AM. 2008. Protein oxidation in the leaves and roots of cucumber plants (*Cucumis sativus* L.), mutant MSC16 and wild type. *Journal of Plant Physiology* 165(4): 355-365.
- Kalituho L, Beran KC, Jahns P. 2007. The transiently generated nonphotochemical quenching of excitation energy in *Arabidopsis* leaves is modulated by zeaxanthin. *Plant Physiology* 143(4): 1861-1870.
- Katanić Z, Atić L, Ferhatović D, Cesar V, Lepeduš H. 2012. PSII photochemistry in vegetative buds and needles of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) probed by OJIP chlorophyll *a* fluorescence measurement. *Acta Biologica Hungarica* 63(2): 218-230.
- Kato Y, Sakamoto W. 2009. Protein quality control in chloroplasts: a current model of D1 protein degradation in the photosystem II repair cycle. *Journal of Biochemistry* 146(4): 463-469.
- Ke B. 2001. The stable primary electron acceptor Q_A and the secondary electron acceptor Q_B . Str. 289-304 u: Govindjee. (ur) Photosynthesis. Photobiochemistry and photobiophysics. New York, USA: Kluwer Academic Publishers.

- Keren N, Krieger-Liszkay A. 2011. Photoinhibition: molecular mechanisms and physiological significance. *Physiologia Plantarum* 142(1): 1-5.
- Keren N, Liberton M, Pakrasi HB. 2005. Photochemical competence of assembled photosystem II core complex in cyanobacterial plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry* 280(8): 6548-6553.
- Khatoun M, Inagawa K, Pospisil P, Yamashita A, Yoshioka M, Lundin B, Horie J, Morita N, Jajoo A, Yamamoto Y. 2009. Quality control of photosystem II: Thylakoid unstacking is necessary to avoid further damage to the D1 protein and to facilitate D1 degradation under light stress in spinach thylakoids. *Journal of Biological Chemistry* 284(37): 25343-25352.
- Kim JS, Kim YO, Ryu HJ, Kwak YS, Lee JY, Kang H. 2003. Isolation of stress-related genes of rubber particles and latex in fig tree (*Ficus carica*) and their expressions by abiotic stress or plant hormone treatments. *Plant and Cell Physiology* 44(4): 412-414.
- Kramer DM, Avenson TJ, Kanazawa A, Cruz JA, Ivanov B, Edwards GE. 2004. The relationship between photosynthetic electron transfer and its regulation. Str. 251-278 u: Papageorgiou GC, Govindjee. (ur) Chlorophyll a fluorescence. A signature of photosynthesis. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Krause GH, Jahns P. 2004. Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: Characterization and function. Str. 463-495 u: Papageorgiou GC, Govindjee. (ur.) Chlorophyll a fluorescence: A signature of photosynthesis. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Krause GH, Virgo A, Winter K. 1995. High susceptibility to photoinhibition of young leaves of tropical forest trees. *Planta* 197: 583-591.
- Krause GH, Weis E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42(4): 313-349.
- Krieger-Liszkay A, Fufezan C, Trebst A. 2008. Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research* 98(1-3): 551-564.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of Bacteriophage-T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lansky EP, Paavilainen HM. 2011. *Figs: The genus Ficus*. Boca Ranton, USA: Taylor & Francis Group.
- Larkindale J, Mishkund M, Vierling E. 2005. Plant responses to high temperature. Str. 100-144 u: Jenks MA, Hasegawa PM. (ur) Plant abiotic stress. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Lazar D. 1999. Chlorophyll a fluorescence induction. *Biochimica et Biophysica Acta* 1412(1): 1-28.

- Lebkuecher JG, Haldeman KA, Harris CE, Holz SL, Joudah SA, Minton DA. 1999. Development of photosystem-II activity during irradiance of etiolated *Helianthus* (*Asteraceae*) seedlings. *American Journal of Botany* 86(8): 1087-1092.
- Leipner J, Fracheboud Y, Stamp P. 1999. Effect of growing season on the photosynthetic apparatus and leaf antioxidative defenses in two maize genotypes of different chilling tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 42(2): 129-139.
- Leipner J. 1998. Chilling-induced photooxidative stress and adaptation of defence systems in maize (*Zea mays* L.) leaves. Doktorski rad, Swiss Federal Institute of Technology, Zürich.
- Lepeduš H, Schlenz M, Müller L, Krupinska K. 2005. Function and molecular organisation of photosystem II in vegetative buds and mature needles of Norway spruce during the dormancy. *Biologia* 60(1): 89-92.
- Lepeduš H, Gaća V, Viljevac M, Kovač S, Fulgosi H, Šimić D, Jurković V, Cesar V. 2011. Changes in photosynthetic performance and antioxidative strategies during maturation of Norway maple (*Acer platanoides* L.) leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 368-376.
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 233: 346-357.
- Lichtenthaler HK, Burkart S. 1999. Photosynthesis and high light stress. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 25(3-4): 3-16.
- Lichtenthaler HK, Buschmann C, Knapp M. 2004. Measurement of chlorophyll fluorescence kinetics (Kautsky effect) and the chlorophyll fluorescence decrease ratio (RFd-values) with the PAM-Fluorometer u: Filek M, Biesaga-Koscielniak J, Marcinska I. (ur) Analytical methods in plant stress biology. Krakow, Poland: The Franciszek Gorski Institute of Plant Physiology of the Polish Academy of Sciences.
- Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Lípová L, Krchnak P, Komenda J, Ilik P. 2010. Heat-induced disassembly and degradation of chlorophyll-containing protein complexes *in vivo*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797(1): 63-70.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J. 2003. *Molecular Cell Biology*. New York, USA: W. H. Freeman.
- Logan BA, Demming-Adams B, Adams III WW, Grace S. 1998. Antioxidants and xanthophyll cycle-dependent energy dissipation in *Cucurbita pepo* L. and *Vinca major* L. acclimated to four growth PPFs in the field. *Journal of Experimental Botany* 49(328): 1869-1879.

- Lu P, Sang W-G, Ma K-P. 2007. Activity of stress-related antioxidative enzymes in the invasive plant crofton weed (*Eupatorium adenophorum*). *Journal of Integrative Plant Biology* 49(11): 1555-1564.
- Maegdefrau K, Ehrendorfer F. 1984. Udžbenik botanike za visoke škole. Sistematika, evolucija i geobotanika. Zagreb, Hrvatska: Školska knjiga.
- Mano J. 2002. Early events in environmental stress in plants. Induction mechanisms of oxidative stress. Str. 217-245 u: Inze D, van Montagu M. (ur) *Oxidative stress in plants*. London, UK: Taylor & Francis.
- Matsubara S, Chow WS. 2004. Populations of photoinactivated photosystem II reaction centers characterized by chlorophyll *a* fluorescence lifetime *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 101(52): 18234-18239.
- Maxwell K, Johnson GN. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51(345): 659-668.
- Mehta RA, Fawcett TW, Porath D, Mattoo AK. 1992. Oxidative stress causes rapid membrane translocation and *in vivo* degradation of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase. *Journal of Biological Chemistry* 267(4): 2810-2816.
- Meloni DA, Oliva MA, Martinez CA, Cambraia J. 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 49: 69-76.
- Metzler DE. 2001. *Biochemistry. The chemical reaction of living cells*. London, UK: Academic Press.
- Mika A, Luthje S. 2003. Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiology* 132(3): 1489-1498.
- Mittler R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* 11(1): 15-19.
- Mühlbauer SK, Eichacker LA. 1998. Light-dependent formation of the photosynthetic proton gradient regulates translation elongation in chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry* 273(33): 20935-20940.
- Müller P, Li XP, Niyogi KK. 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology* 125(4): 1558-1566.
- Mullineaux P, Karpinski S. 2002. Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. *Current Opinion in Plant Biology* 5(1): 43-48.
- Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y, Allakhverdiev S. 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1767(6): 414-421.

- Nair AS, Abraham TK, Jaya DS. 2008. Studies on the changes in lipid peroxidation and antioxidants in drought stress induced cowpea (*Vigna unguiculata* L.) varieties. *Journal of Environmental Biology* 29(5): 689-691.
- Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867-880.
- Neubauer C. 1993. Multiple effects of dithiothreitol on nonphotochemical fluorescence quenching in intact chloroplasts (Influence on violaxanthin de-epoxidase and ascorbate peroxidase activity). *Plant Physiology* 103(2): 575-583.
- Niyogi KK, Grossman AR, Bjorkman O. 1998. *Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* 10(7): 1121-1134.
- Noctor G, Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279.
- Nussbaum S, Geissmann M, Eggenberg P, Strasser RJ, Fuhrer J. 2001. Ozone sensitivity in herbaceous species as assessed by direct and modulated chlorophyll fluorescence techniques. *Journal of Plant Physiology* 158: 757-766.
- Öquist G, Chow WS. 1992. On the relationship between the quantum yield of photosystem II electron transport, as determined by chlorophyll fluorescence and quantum yield of CO₂-dependent O₂ evolution. *Photosynthesis Research* 33: 51-62.
- Osyczka A, Moser CC, Dutton PL. 2005. Fixing the Q cycle. *Trends in Biochemical Sciences* 30(4): 176-182.
- Papageorgiou GC. 2004. Fluorescence of photosynthetic pigments *in vitro* and *in vivo*. Str. 43-63 u: Papageorgiou GC, Govindjee. (ur) Chlorophyll *a* fluorescence: A signature of photosynthesis. Vol. 19. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Pastenes C, Aracelly C, Riquelme A, C. B. 2001. Effect of dithiothreitol (DTT) and diethyliditiocarbamate (DDC) on watered and water stressed bean leaves. *Proceedings of the 12th International Congress on Photosynthesis* 3
- Pastenes C, Horton P. 1996. Effect of high temperature on photosynthesis in beans (I. Oxygen evolution and chlorophyll fluorescence). *Plant Physiology* 112(3): 1245-1251.
- Pearcy RW. 1998. Acclimation to sun and shade. Str. 250-263 u: Raghavendra AS. (ur) *Photosynthesis: A comprehensive treatise*. Cambridge, UK: Cambridge University Press
- Perez-Torres E, Bascunan L, Sierra A, Bravo LA, Coruela LJ. 2006. Robustness of activity of Calvin cycle enzymes after high light and low temperature conditions in Antarctic vascular plants. *Polar Biology* 29: 909-916.

- Perez FJ, Maureira V. 2003. Inactivation *in vivo* of basic peroxidase and increased content of H₂O₂ in grapevine leaves post treatment with DTT and paraquat. *Journal of Plant Physiology* 160(6): 645-650.
- Perl-Treves R, Perl A. 2002. Oxidative stress: An Introduction. Str. 1-33 u: Inze D, Van Montagu M. (ur) *Oxidative Stress in Plants*. London: Taylor and Francis.
- Peterson RB, Havir EA. 2000. A nonphotochemical-quenching-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* possessing normal pigment composition and xanthophyll-cycle activity. *Planta* 210(2): 205-214.
- Pevalek-Kozlina B. 2003. *Fiziologija bilja*. Zagreb, Hrvatska: Profil multimedia d.d.
- Pietrini F, Chaudhuri D, Thapliyal AP, Massacci A. 2005. Analysis of chlorophyll fluorescence transients in mandarin leaves during a photo-oxidative cold shock and recovery. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 106: 189-198.
- Porcar-Castell A. 2008. Studying the diurnal and seasonal acclimation of photosystem II using chlorophyll a fluorescence. *Doktorski rad, University of Helsinki, Helsinki*.
- Portis AR. 2003. Rubisco activase - Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynthesis Research* 75(1): 11-27.
- Pospisil P. 2009. Production of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787(10): 1151-1160.
- Pospisil P. 2012. Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817(1): 218-231.
- Prasad TK. 1996. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activity. *The Plant Journal* 10(6): 1017-1026.
- Premkumar A, Mercado JA, Quesada MA. 2001. Effects of *in vitro* tissue culture conditions and acclimatization on the contents of Rubisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments, and C/N ratio. *Journal of Plant Physiology* 158: 835-840.
- Prgomet Ž, Boháč M. 2003. *Smokva*. Rovinj, Hrvatska: Skink d.o.o.
- Pyngrope S, Bhoomika K, Dubey RS. 2013. Oxidative stress, protein carbonylation, proteolysis and antioxidative defense system as a model for depicting water deficit tolerance in Indica rice seedlings. *Plant Growth Regulation*. DOI 10.1007/s10725-012-9758-3.
- Ragni M, Airs R, Leonardos N, Geider RJ. 2008. Photoinhibition of PSII in *Emiliania huxleyi* (*Haptophyta*) under high light stress: The roles of photoacclimation, photoprotection, and photorepair. *Journal of Phycology* 44: 670-683.

- Riesselmann S, Piechulla B. 1992. Diurnal and circadian light-harvesting complex and quinone B-binding protein synthesis in leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Physiology* 100: 1840-1845.
- Rinalducci S, Murgiano L, Zolla L. 2008. Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *Journal of Experimental Botany* 59(14): 3781-3801.
- Rohacek K. 2002. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica* 40(1): 13-29.
- Ruban AV, Johnson MP, Duffy CD. 2012. The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817(1): 167-181.
- Ruuska SA, Andrews TJ, Badger MR, Price GD, von Caemmerer S. 2000. The role of chloroplast electron transport and metabolites in modulating Rubisco activity in tobacco. Insights from transgenic plants with reduced amounts of cytochrome *b/f* complex or glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Plant Physiology* 122(2): 491-504.
- Sage RF. 2002. Variation in the k_{cat} of Rubisco in C_3 and C_4 plants and some implications for photosynthetic performance at high and low temperature. *Journal of Experimental Botany* 53(369): 609-620.
- Schansker G, Strasser RJ. 2005a. Quantification of non- Q_B -reducing centers in leaves using a far-red pre-illumination. *Photosynthesis Research* 84(1-3): 145-151.
- Schansker G, Toth SZ, Strasser RJ. 2005b. Metilviologen and dibromothymoguinone treatment of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl *a* fluorescence rise OJIP. *Biochimica et Biophysica Acta* 1706(3): 250-261.
- Schreiber U, Bilger W, Neubauer C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator of rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. Berlin, Germany: Springer Verlag.
- Schreiber U. 2004. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: An overview. Str. 279-319 u: Papageorgiou GC, Govindjee. (ur.) Chlorophyll *a* fluorescence: A signature of photosynthesis. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Sekmen AH, Turkan I, Takio S. 2007. Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant *Plantago maritima* and salt-sensitive *Plantago media*. *Physiologia Plantarum* 131(3): 399-411.
- Shavit N, Thore A, Keister DL, San Pietro A. 1968. Inhibition by nigericin of the light-induced pH change in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 59(3): 917-922.

- Shen J-R, Henmi T, Kaymiya N. 2008. Structure and function of photosystem II. Str. 83-106 u: Fromme P. (ur) Photosynthetic protein complexes. Weinheim, Germany: Wiley - Blackwell Verlag GmbH&Co.
- Shirke PA, Pathre UV. 2003. Diurnal and seasonal changes in photosynthesis and photosystem 2 photochemical efficiency in *Prosopis juliflora* leaves subjected to natural environmental stress. *Photosynthetica* 41(1): 83-89.
- Siegel BZ, Galston W. 1967. The peroxidase of *Pisum sativum*. *Plant Physiology* 42: 221-226.
- Singh AK, Singhal GS. 1999. Specific degradation of D1 protein during exposure of thylakoid membranes to high temperature in the dark. *Photosynthetica* 36(3): 433-440.
- Sofa A, Dichio B, Xiloyannis C, Masia A. 2004. Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. *Plant Science* 166(2): 293-302.
- Sonoike K. 1999. The different roles of chilling temperatures in the photoinhibition of photosystem I and photosystem II. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 48(2-3): 136-141.
- Sözer O. 2011. Carotenoids assist in assembly and functions of photosynthetic complexes in Cyanobacteria. Doktorski rad, University of Szeged, Szeged.
- Strand A, Hurry V, Henkes S, Huner N, Gustafsson P, Gardestrom P, Stitt M. 1999. Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. *Plant Physiology* 119: 1387-1397.
- Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M. 2000. The fluorescent transient as a tool to characterise and screen photosynthetic samples. Str. 445-483 u: Yunus M, Pathre U, Mohanty P. (ur) Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation. London, UK: Taylor and Francis.
- Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Srivastava A. 2004. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. Str. 321-362 u: Papageorgiou GC, Govinjee. (ur) Chlorophyll a fluorescence: A signature of photosynthesis, vol. 19. Dordrecht: Springer.
- Strauss AJ, Kruger GHJ, Strasser RJ, van Heerden PDR. 2006. Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P. *Environmental and Experimental Botany* 56(2): 147-157.
- Sundby C, McCaffery S, Anderson JM. 1993. Turnover of the photosystem II D1 protein in higher plants under photoinhibitory and nonphotoinhibitory irradiance. *Journal of Biological Chemistry* 268(34): 25476-25482.

- Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R, Miller G. 2012. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell and Environment* 35(2): 259-270.
- Suzuki N, Mittler R. 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum* 126: 45-51.
- Takahashi S, Badger MR. 2011. Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends in Plant Science* 16(1): 53-60.
- Takahashi S, Milward SE, Fan DY, Chow WS, Badger MR. 2009. How does cyclic electron flow alleviate photoinhibition in *Arabidopsis*? *Plant Physiology* 149(3): 1560-1567.
- Takahashi S, Murata N. 2008. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in Plant Science* 13(4): 178-182.
- Takahashi S, Tamashiro A, Sakihama Y, Yamamoto Y, Kawamitsu Y, Yamasaki H. 2002. High-susceptibility of photosynthesis to photoinhibition in the tropical plant *Ficus microcarpa* L. f. cv. Golden Leaves. *BioMed Central Plant Biology* 2: 2.
- Tayefi-Nasrabad H, Dehghan G, Daeihassani B, Movafegi A, Samadi A. 2011. Some biochemical properties of guaiacol peroxidases as modified by salt stress in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cultivars. *African Journal of Biotechnology* 10(5): 751-763.
- Tewari RK, Kumar P, Sharma N. 2007. Oxidative stress and antioxidant responses in young leaves of mulberry plants grown under nitrogen, phosphorus or potassium deficiency. *Journal of Integrative Plant Biology* 49(3): 313-322.
- Thach LB, Shapcott A, Schmidt S, Critchley C. 2007. The OJIP fast fluorescence rise characterizes *Graptophyllum* species and their stress responses. *Photosynthesis Research* 94: 423-436.
- Tikkanen M, Aro EM. 2012. Thylakoid protein phosphorylation in dynamic regulation of photosystem II in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817(1): 232-238.
- Tikkanen M, Nurmi M, Kangasjarvi S, Aro EM. 2008. Core protein phosphorylation facilitates the repair of photodamaged photosystem II at high light. *Biochimica et Biophysica Acta* 1777(11): 1432-1437.
- Tomek P, Ilík P, Lazár D, Štroch M, Nauš J. 2003. On the determination of Q_B-non-reducing photosystem II centers from chlorophyll *a* fluorescence induction. *Plant Science* 164(4): 665-670.
- Toth SZ, Schansker G, Garab G, Strasser RJ. 2007. Photosynthetic electron transport activity in heat-treated barley leaves: the role of internal alternative electron donors to photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1767(4): 295-305.

- Toth SZ. 2006. Analysis and application of the fast Chl *a* fluorescence (OJIP) transient complemented with simultaneous 820 nm transmission measurements. Doktorski rad, Université de Genève, Genève.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(9): 4350-4354.
- Triantaphylides C, Havaux M. 2009. Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science* 14(4): 219-228.
- Tsimilli-Michael M, Eggenberg P, Biro B, Köves-Pechy KI, Vörös I, Strasser RJ. 2000. Synergistic and antagonistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers on the photosynthetic activity of alfalfa, probed by the polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient O-J-I-P. *Applied Soil Ecology* 15: 169-182.
- Tyystjarvi E. 2008. Photoinhibition of photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster. *Coordination Chemistry Reviews* 252: 361-376.
- Unyayar S, Cekic FO. 2005. Changes in antioxidative enzymes of young and mature leaves of tomato seedlings under drought stress. *Turkish Journal of Biology* 29: 211-216.
- van Heerden PDR, Swanepoel JW, Kruger GHJ. 2007. Modulation of photosynthesis by drought in two desert scrub species exhibiting C3-mode CO₂ assimilation. *Environmental and Experimental Botany* 61: 124-136.
- Veberic R, Colaric M, Stampar F. 2008. Phenolic acids and flavonoids of fig fruit (*Ficus carica* L.) in the northern Mediterranean region. *Food Chemistry* 106: 153-157.
- Venema JH, Eekhof M, Van Hasselt PR. 2000. Analysis of low-temperature tolerance of a tomato (*Lycopersicon esculentum*) cybrid with chloroplasts from a more chilling-tolerant *L. hirsutum* accession. *Annals of Botany* 85: 799-807.
- Verdaguer D, Aranda X, Jofre A, El Omari B, Molinas M, Fleck I. 2003. Expression of low molecular weight heat-shock proteins and total antioxidant activity in the Mediterranean tree *Quercus ilex* L. in relation to seasonal and diurnal changes in physiological parameters. *Plant, Cell and Environment* 26: 1407-1417.
- Verma S, Dubey RS. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164(4): 645-655.
- Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad MR. 2007. Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany* 61: 199-223.

- Whitmarsh J. 1998. Electron transport and energy transduction. Str. 87-110 u: Raghavendra AS. (ur) Photosynthesis: A comprehensive treatise. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Wingsle G, Karpinski S, Hallgren JE. 1999. Low temperature, high light stress and antioxidant defence mechanisms in higher plants. *Phyton* 39(4): 253-268.
- Winter K, Lesch M. 1992. Diurnal changes in chlorophyll a fluorescence and carotenoid composition in *Opuntia ficus-indica*, a Cam plant, and in 3 C₃ species in Portugal during summer. *Oecologia* 91(4): 505-510.
- Xu D-Q, Shen Y-K. 1996. Midday depression of photosynthesis. Str. 451-460 u: Pessaraki M. (ur) Handbook of photosynthesis. New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- Yabuta Y, Maruta T, Yoshimura K, Ishikawa T, Shigeoka S. 2004. Two distinct redox signaling pathways for cytosolic APX induction under photooxidative stress. *Plant Cell and Physiology* 45(11): 1586-1594.
- Yamane K, Mitsuya S, Kawasaki M, Taniguchi M, Miyake H. 2009. Antioxidant capacity and damages caused by salinity stress in apical and basal regions of rice leaf. *Plant Production Science* 12(3): 319-326.
- Yan N, Xu X-F, Wang Z-D, Huang J-Z, Guo D-P. 2013. Interactive effects of temperature and light intensity on photosynthesis and antioxidant enzyme activity in *Zizania latifolia* Turcz. plants. *Photosynthetica* 51(1): 137-138.
- Yin L, Lundin B, Bertrand M, Nurmi M, Solymosi K, Kangasjarvi S, Aro EM, Schoefs B, Spetea C. 2010. Role of thylakoid ATP/ADP carrier in photoinhibition and photoprotection of photosystem II in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 153(2): 666-677.
- Yoo SD, Greer DH, Laing WA, McManus MT. 2003. Changes in photosynthetic efficiency and carotenoid composition in leaves of white clover at different developmental stages. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 887-893.
- Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S. 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology* 123(1): 223-234.
- Yusuf MA, Kumar D, Rajwanshi R, Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Govindjee, Sarin NB. 2010. Overexpression of gamma-tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797(8): 1428-1438.
- Zhang L, Paakkarinen V, van Wijk KJ, Aro EM. 2000. Biogenesis of the chloroplast-encoded D1 protein: regulation of translation elongation, insertion, and assembly into photosystem II. *Plant Cell* 12(9): 1769-1782.

Zhang M, Duan L, Tian X, He Z, Li J, Wang B, Li Z. 2007. Uniconazole-induced tolerance of soybean to water deficit stress in relation to changes in photosynthesis, hormones and antioxidant system. *Journal of Plant Physiology* 164(6): 709-717.

<http://ilpiaceredi.blogspot.com/2011/03/ficus-carica-fico>, 1.3.2011.

<http://www.bio.ic.ac.uk/research/nield/downloads.html>, 17.9.2010.

9. SAŽETAK

Suvišak svjetlosti može biti štetan za biljke jer uzrokujući svjetlosni stres oštećuje fotosintetski aparat i smanjuje fotosintetsku učinkovitost. Za smokvu (*Ficus carica* L.) je karakteristično nicanje i razvoj mladih listova tijekom čitavog ljeta. Budući da se mladi listovi razvijaju na vrhovima grana gdje su direktno izloženi visokom intenzitetu svjetlosti i povišenoj temperaturi, naročito tijekom sredine ljeta, što uzrokuje stres, za njih je nužno da optimiziraju fotokemijske i biokemijske procese kako bi smanjili mogućnost oštećenja.

Kako bi se utvrdila fotosintetska učinkovitost i razina antioksidativnog odgovora na mladim i razvijenim listovima smokve, istraživanje je obuhvaćalo u tri dijela: dnevne promjene u funkcioniranju fotosustava II i antioksidativnog odgovora tijekom dnevnog ciklusa, eksperiment u kontroliranim uvjetima s četiri različita tretmana koji uključuju dva različita intenziteta svjetlosti u kombinaciji s povišenom i sniženom temperaturom, te tretman inhibitorima (DTT i NGC) nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila *a*. U sva tri dijela istraživanja određivana je fotosintetska učinkovitost i antioksidativni odgovor oba tipa listova. Fotosintetska učinkovitost određena je metodom polifaznog porasta fluorescencije klorofila *a* (OJIP test) te metodom saturacijskog pulsa. Također, određena je koncentracija fotosintetskih pigmenata te akumulacija proteina D1 i velike podjedinice (LSU) enzima Rubisco-*a*. Za određivanje antioksidativnog statusa određivane su aktivnosti enzima superoksid dismutaze, katalaze, askorbat peroksidaze, gvajakol peroksidaze i glutation reduktaze te razina peroksidacije lipida i oštećenja proteina.

Tijekom istraživanja dnevnih promjena funkcioniranja mladih i razvijenih listova uočeno je smanjenje fotosintetske učinkovitosti uslijed fotoinhibitornog djelovanja visokog intenziteta svjetlosti i povišene temperature tijekom podneva na oba tipa listova. To se očitovalo u smanjenju vrijednosti maksimalnog kvantnog prinosa fluorescencije (F_v/F_m) i indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}). Obje vrijednosti su bile znatno niže na mladim listovima u odnosu na razvijene listove. Istovremeno je došlo do smanjenja akumulacije D1 proteina u oba tipa listova. Niže vrijednosti lipidne peroksidacije kao i činjenica da nije došlo do promjene u koncentraciji proteinskih karbonila, ukazuju na postojanje učinkovitijeg antioksidativnog sustava u mladim u odnosu na razvijene listove. Povećane aktivnosti enzima CAT, APX-*a*, GPOD-*a* i GR u mladim listovima u usporedbi s povećanim aktivnostima enzima SOD-*a*, CAT i GR u razvijenim listovima ukazuju na postojanje različitih strategija u obrani od stresa tijekom dnevnih promjena.

U eksperimentu kombinacije različitih intenziteta svjetlosti i temperature pokazan je njihov različit utjecaj na fotosintetsku učinkovitost i antioksidativni odgovor mladih i razvijenih listova. Kombinacija visokog intenziteta osvjetljenja i niske temperature (HL10) mnogo je jače

utjecala na mlade listove dok su razvijeni listovi bili podložniji utjecaju kombinacije visokog intenziteta svjetlosti i povišene temperature (HL35) što je pokazano smanjenjem fotosintetske učinkovitosti (F_v/F_m i PI_{ABS}). Iste kombinacije stresa su izazvale očigledno smanjenje akumulacije D1 proteina i enzima Rubisco. Antioksidativni sustav pokazao se funkcionalniji kod mladih listova, naročito na niskim temperaturama. Na to upućuju više razine lipidne peroksidacije i oštećenja proteina u obliku proteinskih karbonila izmjerenih u razvijenim listovima.

Utjecaj inhibitora nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila *a* u kombinaciji s utjecajem stresa HL35 pokazao je veću osjetljivost mladih listova na nigericin i razvijenih listova na ditiotreitol što je bilo popraćeno značajnim smanjenjem fotosintetske učinkovitosti te smanjenjem aktivnosti antioksidativnih enzima. Nigericin je na razvijenim listovima uzrokovao pojačano smanjenje fotosintetske učinkovitosti (F_v/F_m), jače smanjenje relativnog elektronskog transporta (relETR) i povećanu koncentraciju karotenoida što je zadržalo nepromijenjenu razinu nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila *a* (NPQ). Na mladim listovima nigericin je izazvao intenzivniji pad NPQ-a dok se relETR nije promijenio. Utjecaj ditiotreitola na razvijenim listovima očitovao se je u smanjenju F_v/F_m parametra uz smanjenje relETR i značajan pad NPQ-a.

Istraživanje je pokazalo da mladi i razvijeni listovi imaju različite strategije u obrani od svjetlosnog stresa, te da su pojačano otpuštanje suvišne energije u obliku topline i aktivniji antioksidativni sustav, povećana osjetljivost na kombinaciju svjetlosnog stresa s niskom temperaturom kao i na utjecaj nigericina glavne karakteristike mladih listova. Razvijeni listovi su sposobniji veći dio energije iskoristiti u fotokemijskim procesima i iako su podložniji oštećenjima proteina i peroksidaciji lipida, mnogo su učinkovitiji u oporavku nakon fotoinhibicije uslijed učinkovitijeg sustava promjene D1 proteina. Također, razvijeni listovi su pokazali pojačanu osjetljivost na kombinaciju visokog intenziteta svjetlosti s povišenom temperaturom i utjecaj ditiotreitola.

10. SUMMARY

Excess light energy can be very harmful for plants and therefore as a light stress it is damaging photosynthetic apparatus and decreasing photosynthetic efficiency. The characteristic of common fig (*Ficus carica* L.) is to spring and develop young leaves during whole summer. Since young leaves develop on the surface of canopy, they are directly exposed to high light intensity and high temperature causing stress, especially in the middle of summer. In that case, it is necessary for young leaves to optimize photochemical and biochemical processes and in that way minimize potential damage.

Photosynthetic efficiency and antioxidative response level in young and mature leaves were investigated. This study included three parts: diurnal changes in functioning of PSII and antioxidant response during daily cycle, the experiment under controlled conditions with four different treatments involving two intensities of light combined with high and low temperature, as well as treatment with inhibitors of nonphotochemical quenching (DTT and NGC). In all three of the studies the photosynthetic efficiency and the antioxidative response in both types of leaves were measured. Photosynthetic efficiency was determined by chlorophyll a fluorescence rise (OJIP test) and saturation pulse method. Also, the concentration of photosynthetic pigments and accumulation of D1 protein and Rubisco large subunit (LSU) were determined. To establish the antioxidant status in young and mature leaves, enzyme activities (superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase and glutathione reductase) as well as the level of lipid peroxidation and protein damage were determined.

Diurnal changes of young and mature leaves functioning revealed lower photosynthetic efficiency due to photoinhibitory effects caused by high light intensity and high temperature during midday on both types of leaves. This was reflected in reduction of maximum quantum yield of PSII (F_v/F_m) and performance index (PI_{ABS}) both more pronounced in young leaves in comparison to mature leaves. These values were substantially lower in young leaves when compared to mature ones. At the same time, reduction in D1 protein accumulation occurred in both types of leaves. Lower levels of lipid peroxidation and no change in the concentration of protein carbonyls, indicated the existence of more efficient antioxidant system in young leaves in comparison to mature ones. Increased activities of CAT, APX, GPOD and GR in young leaves compared to activities of SOD, CAT and GR in mature ones indicate the existence of different defense strategies against stress during the daily cycle.

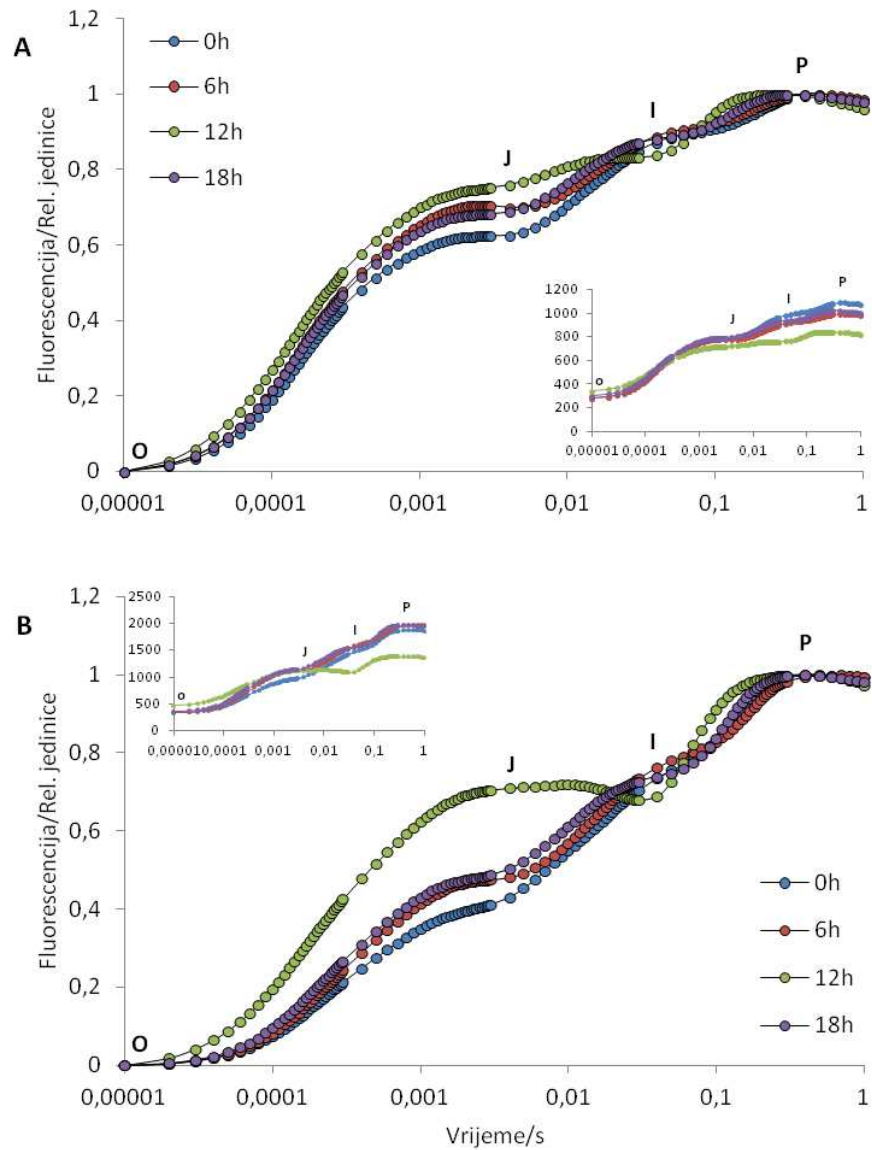
The experiment with combinations of different light intensities and temperature showed diverse influence on photosynthetic efficiency in young and mature leaves. Combination of high light intensity and low temperature (HL10) had much stronger influence on young

leaves. Mature leaves were more susceptible to combination of high light intensity and high temperature (HL35). In both cases, this was reflected as the reduction of photosynthetic efficiency (F_v/F_m and PI_{ABS}). The same stress combinations caused obvious reduction in accumulation of D1 protein and Rubisco enzyme. Antioxidant system proved to be more functional in young leaves, especially at low temperatures what was indicated in higher level of lipid peroxidation and protein damage in the form of protein carbonyls measured in mature leaves.

The impact of nonphotochemical quenching (NPQ) inhibitors combined with the influence of stress (HL35) showed greater susceptibility of young leaves to nigericin while mature ones were more sensitive to dithiothreitol. This was accompanied with stronger reduction in photosynthetic efficiency and reduction of antioxidant enzymes. Nigericin caused increased reduction of photosynthetic efficiency (F_v/F_m) and stronger decrease in relative electron transport (relETR) in mature leaves. At the same time, increased concentrations of carotenoids caused unchanged level of NPQ. Nigericin in young leaves caused intense decrease in NPQ, while relETR showed no change. Influence of dithiothreitol on mature leaves was evident in F_v/F_m decrease what was accompanied with decrease in relETR and NPQ.

In this investigation was shown that young and mature leaves have different defense strategies during light stress. The enhanced dissipation of excess energy in the form of heat and active antioxidant system, increased susceptibility to combination of high light and low temperature stress as well as increased susceptibility to nigericin as main characteristics of young leaves. Mature leaves were much capable to use greater part of absorbed energy in the photochemical processes. They were more susceptible to protein damage and lipid peroxidation and more efficient in recovery after photoinhibition due to efficient D1 protein turnover. Also, they showed enhanced susceptibility to the combination of high light and high temperature condition as well as influence of dithiothreitol.

11. PRILOZI



Slika 35. Normalizirani OJIP porast fluorescencije klorofila a izmjeren tijekom dnevnog ciklusa na mladim (**A**) i razvijenim (**B**) listovima smokve sorte Fico della Madonna. Umetnuti grafovi prikazuju native OJIP krivulje. Promjene intenziteta fluorescencije prikazana je na logaritamskoj vremenskoj skali.

Tablica 6. Srednje vrijednosti i standardne devijacije OJIP parametara (F_0 , F_m , V_J , V_I , t_{\max} , S_m , N) izmjerenih tijekom dnevnog ciklusa na i mladim (M) i razvijenim (R) listovima smokve sorte Fico della Madona. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c, d) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu, $p < 0,05$. Vrijednosti OJIP parametara prikazane su u relativnim jedinicama.

Parametar		0h	6h	12h	18h
F_0	M	260,208 ±12,085 c	266,468 ±24,112 c	350,563 ±37,638 a	294,520 ±30,491 b
	R	305,335 ±28,410 b	309,578 ±15,086 b	462,363 ±72,467 a	319,601 ±12,110 b
F_m	M	1102,257 ±142,627 a	998,870 ±99,498 b	848,350 ±115,985 c	1023,803 ±80,629 ab
	R	1866,714 ±83,764 a	1964,124 ±113,451 a	1381,485 ±156,853 b	1954,757 ±127,050 b
V_J	M	0,623 ±0,049 c	0,707 ±0,017 b	0,738 ±0,031 a	0,683 ±0,020 b
	R	0,408 ±0,041 c	0,486 ±0,039 b	0,687 ±0,042 a	0,490 ±0,036 b
V_I	M	0,850 ±0,026 ab	0,868 ±0,009 a	0,832 ±0,043 b	0,872 ±0,018 a
	R	0,712 ±0,021 ab	0,739 ±0,019 a	0,678 ±0,120 b	0,734 ±0,029 a
t_{\max}	M	240,972 ±27,400 a	217,109 ±60,235 a	138,578 ±38,688 b	159,211 ±36,684 b
	R	273,164 ±118,676 b	383,013 ±52,647 a	264,256 ±129,518 b	262,153 ±48,757 b
S_m	M	24,279 ±3,520 a	20,752 ±1,655 b	16,623 ±3,339 c	18,002 ±1,301 c
	R	38,552 ±6,504 ab	44,505 ±9,858 a	28,457 ±14,417 c	34,787 ±2,820 bc
N	M	69,386 ±11,641 a	57,154 ±4,413 b	46,985 ±8,897 c	50,092 ±3,660 c
	R	86,602 ±14,582 ab	96,729 ±20,238 a	70,608 ±36,609 b	81,114 ±5,009 ab

Tablica 7. Srednje vrijednosti i standardne devijacije maksimalnog kvantnog prinosa fluorescencije (F_v/F_m), kvantnog prinosa elektronskog transporta (ET_0/ABS), učinkovitosti kojom „uhvaćeni“ eksciton omogućava prijenos elektrona u transportnom lancu dalje od Q_A (ET_0/TR_0) te gustoće aktivnih reakcijskih središta (RC/CS_0) izmjerenih tijekom dnevnog ciklusa na i mladim (M) i razvijenim (R) listovima smokve sorte Fico della Madonna. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c, d) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $p < 0,05$. Vrijednosti parametara prikazane su u relativnim jedinicama.

Parametar		0h	6h	12h	18h
F_v/F_m	M	0,761 ±0,023 a	0,731 ±0,032 b	0,584 ±0,037 c	0,711 ±0,030 b
	R	0,836 ±0,014 a	0,842 ±0,009 a	0,664 ±0,047 b	0,836 ±0,012 a
ET_0/TR_0	M	0,377 ±0,049 a	0,293 ±0,017 b	0,262 ±0,031 c	0,317 ±0,020 b
	R	0,592 ±0,041 a	0,514 ±0,039 b	0,313 ±0,042 c	0,510 ±0,036 b
ET_0/ABS	M	0,286 ±0,032 a	0,215 ±0,017 b	0,154 ±0,025 c	0,226 ±0,016 b
	R	0,495 ±0,028 a	0,433 ±0,030 b	0,207 ±0,029 c	0,427 ±0,035 b
RC/CS_0	M	69,807 ±7,112 a	70,599 ±5,259 a	72,517 ±11,060 a	75,142 ±6,512 a
	R	113,405 ±7,099 b	119,637 ±5,253 ab	123,425 ±20,483 a	114,408 ±4,157 ab

Tablica 8. Srednje vrijednosti i standardne devijacije specifičnih protoka energije po reakcijskom središtu: apsorpcije (ABS/RC), protoka uhvaćenih fotona (TR_0/RC), elektronskog transporta (ET_0/RC) i otpuštanja suvišne energije (DI_0/RC) izmjerene tijekom dnevnog ciklusa ma mladim (M) i razvijenim (R) listovima smokve sorte Fico della Madonna. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $p < 0,05$. Vrijednosti parametara prikazane su u relativnim jedinicama.

Parametar		0h	6h	12h	18h
ABS/RC	M	3,750 ±0,255 b	3,777 ±0,236 b	4,866 ±0,310 a	3,922 ±0,253 b
	R	2,690 ±0,136 bc	2,590 ±0,127 c	3,781 ±0,447 a	2,797 ±0,141 b
TR_0/RC	M	2,850 ±0,119 a	2,756 ±0,074 b	2,833 ±0,108 ab	2,784 ±0,082 ab
	R	2,249 ±0,100 bc	2,181 ±0,103 c	2,497 ±0,205 a	2,338 ±0,122 b
ET_0/RC	M	1,077 ±0,163 a	0,808 ±0,043 bc	0,744 ±0,102 c	0,884 ±0,069 b
	R	1,334 ±0,133 a	1,121 ±0,102 b	0,787 ±0,165 c	1,195 ±0,127 b
DI_0/RC	M	0,900 ±0,149 c	1,021 ±0,181 bc	2,032 ±0,292 a	1,138 ±0,191 b
	R	0,441 ±0,054 b	0,409 ±0,036 b	1,284 ±0,320 a	0,459 ±0,042 b

Tablica 9. Srednje vrijednosti i standardne devijacije indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}), omjera koncentracije klorofila reakcijskih središta i antena (RC/ABS), omjera protoka uhvaćenih fotona i otpuštanja suvišne energije (TR_0/DI_0) te transporta elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A ($ET_0/(TR_0-ET_0)$) izmjerene tijekom dnevnog ciklusa na mladim (M) i razvijenim (R) listovima smokve sorte Fico della Madonna. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c, d; A, B, C) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $p < 0,05$. Vrijednosti parametara prikazane su u relativnim jedinicama.

Parametar		0h	6h	12h	18h
PI_{ABS}	M	0,521 ±0,085 a	0,310 ±0,076 b	0,107 ±0,034 c	0,300 ±0,064 b
	R	2,790 ±0,263 a	2,205 ±0,332 b	0,248 ±0,066 d	1,945 ±0,378 c
RC/ABS	M	0,268 ±0,017 a	0,266 ±0,016 a	0,206 ±0,013 b	0,256 ±0,016 a
	R	0,373 ±0,019 ab	0,387 ±0,019 a	0,268 ±0,031 c	0,358 ±0,017 b
TR_0/DI_0	M	3,223 ±0,379 a	2,771 ±0,459 b	1,420 ±0,218 c	2,501 ±0,358 b
	R	5,153 ±0,522 a	5,352 ±0,374 a	2,026 ±0,390 b	5,123 ±0,441 a
$ET_0/(TR_0-ET_0)$	M	0,615 ±0,128 a	0,416 ±0,035 bc	0,358 ±0,058 c	0,466 ±0,043 a
	R	1,477 ±0,267 a	1,072 ±0,200 b	0,461 ±0,092 c	1,052 ±0,142 b

Tablica 10. Srednje vrijednosti i standardne devijacije maksimalnog kvantnog prinosa fluorescencije (F_v/F_m) i indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) izmjeren na tretmanima u kontroliranim uvjetima na mladim (M) i razvijenim (R) listovima smokve sorte Fico della Madonna. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c, d) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $p < 0,05$. Vrijednosti parametara prikazane su u relativnim jedinicama.

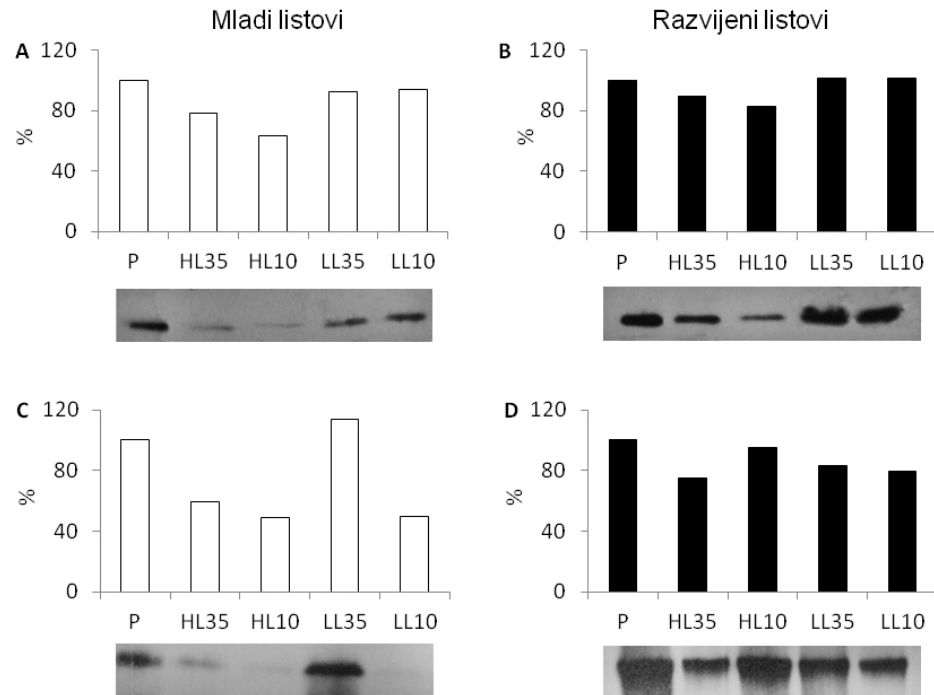
Parametar		P	HL35	HL10	LL35	LL10
F_v/F_m	M	0,728 ±0,009 b	0,676 ±0,025 d	0,617 ±0,030 e	0,749 ±0,011 a	0,708 ±0,016 c
	R	0,795 ±0,009 a	0,608 ±0,070 c	0,566 ±0,027 d	0,766 ±0,020 b	0,767 ±0,012 b
PI_{ABS}	M	1,036 ±0,190 b	0,562 ±0,121 d	0,352 ±0,088 e	1,289 ±0,307 a	0,767 ±0,099 c
	R	2,901 ±0,275 a	0,164 ±0,045 e	0,332 ±0,094 d	0,807 ±0,181 c	1,654 ±0,221 b

Tablica 11. Srednje vrijednosti i standardne devijacije specifičnih protoka energije po reakcijskom središtu: apsorpcije (ABS/RC), protoka uhvaćenih fotona (TR_0/RC), elektronskog transporta (ET_0/RC) i otpuštanja (DI_0/RC) izmjerene izmjerene tretmanima u kontroliranim uvjetima na mladim (M) i razvijenim (R) listovima smokve sorte Fico della Madonna. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c, d, e) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $p < 0,05$. Vrijednosti parametara prikazane su u relativnim jedinicama.

Parametar		P	HL35	HL10	LL35	LL10
ABS/RC	M	3,870 ±0,126 a	3,631 ±0,223 b	3,916 ±0,211 a	3,368 ±0,215 c	3,598 ±0,253 b
	R	2,984 ±0,123 b	3,477 ±0,289 a	3,545 ±0,253 a	2,819 ±0,141 c	3,007 ±0,076 b
TR_0/RC	M	2,817 ±0,069 a	2,451 ±0,113 c	2,413 ±0,089 c	2,525 ±0,175 b	2,543 ±0,134 b
	R	2,372 ±0,091 a	2,100 ±0,176 d	2,001 ±0,115 e	2,160 ±0,111 c	2,308 ±0,051 b
ET_0/RC	M	1,675 ±0,096 a	1,197 ±0,154 d	1,090 ±0,145 e	1,467 ±0,097 b	1,350 ±0,178 c
	R	1,635 ±0,088 a	0,547 ±0,101 e	0,932 ±0,132 c	0,872 ±0,110 d	1,381 ±0,059 b
DI_0/RC	M	1,053 ±0,065 c	1,181 ±0,152 b	1,503 ±0,186 a	0,843 ±0,057 d	1,054 ±0,127 c
	R	0,612 ±0,042 d	1,378 ±0,349 b	1,543 ±0,185 a	0,659 ±0,072 cd	0,700 ±0,048 c

Tablica 12. Transformirane (Log_{10}) srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracija klorofila *a* (Chl *a*/mg g⁻¹ Sv.T), klorofila *b* (Chl *b*/mg g⁻¹ Sv.T), karotenoida (Car/mg g⁻¹ Sv.T) te omjera klorofila *a* i *b* (Chl *a/b*) izmjerene na tretmanima u kontroliranim uvjetima na mladim (M) i razvijenim (R) listovima smokve sorte Fico della Madonna. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $p < 0,05$.

Parametar		P	HL35	HL10	LL35	LL10
Chl <i>a</i>	M	1,905 ±0,037 b	1,820 ±0,028 c	1,996 ±0,038 a	1,685 ±0,046 d	1,970 ±0,014 a
	R	2,266 ±0,023 a	2,311 ±0,050 a	2,280 ±0,051 a	2,308 ±0,033 a	2,290 ±0,030 a
Chl <i>b</i>	M	1,523 ±0,030 b	1,473 ±0,066 c	1,618 ±0,038 a	1,361 ±0,019 d	1,572 ±0,038 ab
	R	1,906 ±0,017 a	1,947 ±0,057 a	1,912 ±0,061 a	1,944 ±0,033 a	1,934 ±0,025 a
Car	M	1,339 ±0,056 b	1,321 ±0,069 b	1,489 ±0,032 a	1,203 ±0,022 c	1,444 ±0,025 a
	R	1,731 ±0,022 b	1,781 ±0,035 a	1,748 ±0,031 ab	1,778 ±0,048 a	1,750 ±0,018 ab
Chl <i>a/b</i>	M	2,382 ±0,017 ab	2,347 ±0,048 bc	2,378 ±0,032 ab	2,324 ±0,044 c	2,399 ±0,042 a
	R	2,360 ±0,028 a	2,364 ±0,012 a	2,368 ±0,026 a	2,363 ±0,034 a	2,356 ±0,033 a



Slika 36. Promjene u akumulaciji proteina D1 (A, B) i Rubisco LSU (C, D) na tretmanima u kontroliranim uvjetima na mladim (□; A, C) i razvijenim (■; B, D) listovima smokve sorte Fico della Madonna. Vrijednosti su prikazane kao postotak promjene od početne količine izmjerene nakon stabilizacije (100%).

Tablica 13. Transformirane (Log_{10}) srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracija produkata lipidne peroksidacije (TBARS/nmol g^{-1} Sv.T) i proteinskih karbonila (Karb/nmol mg^{-1} prot) izmjerene na tretmanima u kontroliranim uvjetima na mladim (M) i razvijenim (R) listovima smokve sorte Fico della Madonna. Rezultati označeni istim slovom (a, b) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $p < 0,05$.

Parametar		P	HL35	HL10	LL35	LL10
TBARS	M	2,844 $\pm 0,025$ b	3,043 $\pm 0,063$ a	2,833 $\pm 0,050$ b	3,041 $\pm 0,068$ a	2,859 $\pm 0,043$ b
	R	3,226 $\pm 0,022$ c	3,304 $\pm 0,022$ b	3,321 $\pm 0,029$ ab	3,359 $\pm 0,063$ a	3,318 $\pm 0,018$ ab
Karbonili	M	1,825 $\pm 0,071$ abc	1,752 $\pm 0,111$ c	1,807 $\pm 0,067$ bc	1,890 $\pm 0,081$ ab	1,920 $\pm 0,091$ a
	R	2,020 $\pm 0,068$ a	1,886 $\pm 0,091$ b	1,915 $\pm 0,075$ b	2,060 $\pm 0,038$ a	2,015 $\pm 0,056$ a

Tablica 14. Transformirane (Log_{10}) srednje vrijednosti i standardne devijacije aktivnosti enzima antioksidativnog sustava, superoksid dismutaze (SOD/ U g^{-1} Sv.T), katalaze (CAT/ $\Delta\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ Sv.T, askorbat peroksidaze (APX/ $\Delta\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ Sv.T), glutation reduktaze (GR/ $\Delta\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ Sv.T) i gvajakol peroksidaze (GPOD/ $\Delta\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ Sv.T) izmjerene na tretmanima u kontroliranim uvjetima na mladim (M) i razvijenim (R) listovima smokve sorte Fico della Madonna. Rezultati označeni istim slovom (a, b, c, d, e) ne pokazuju značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA), $p < 0,05$.

Parametar		P	HL35	HL10	LL35	LL10
SOD	M	3,916 $\pm 0,056$ a	3,700 $\pm 0,057$ c	4,006 $\pm 0,143$ a	3,822 $\pm 0,028$ b	3,655 $\pm 0,043$ c
	R	3,772 $\pm 0,043$ a	3,784 $\pm 0,044$ a	3,752 $\pm 0,080$ a	3,682 $\pm 0,057$ b	3,561 $\pm 0,019$ a
CAT	M	3,485 $\pm 0,040$ c	3,649 $\pm 0,015$ a	3,618 $\pm 0,053$ ab	3,262 $\pm 0,043$ d	3,596 $\pm 0,011$ b
	R	3,611 $\pm 0,178$ b	3,866 $\pm 0,063$ a	3,905 $\pm 0,054$ a	3,718 $\pm 0,056$ a	3,944 $\pm 0,019$ a
APX	M	2,577 $\pm 0,064$ b	2,679 $\pm 0,036$ a	2,567 $\pm 0,055$ b	2,452 $\pm 0,032$ c	2,677 $\pm 0,059$ a
	R	2,422 $\pm 0,111$ b	2,423 $\pm 0,110$ b	2,439 $\pm 0,110$ ab	2,578 $\pm 0,128$ a	2,473 $\pm 0,138$ ab
GR	M	2,635 $\pm 0,033$ c	2,768 $\pm 0,028$ b	2,868 $\pm 0,062$ a	2,657 $\pm 0,042$ c	2,944 $\pm 0,118$ a
	R	2,932 $\pm 0,062$ b	3,053 $\pm 0,046$ a	3,066 $\pm 0,064$ a	3,088 $\pm 0,088$ a	2,975 $\pm 0,033$ a
GPOD	M	3,390 $\pm 0,363$ a	3,255 $\pm 0,361$ a	3,409 $\pm 0,349$ a	3,575 $\pm 0,326$ a	3,265 $\pm 0,366$ a
	R	3,230 $\pm 0,356$ a	3,206 $\pm 0,336$ a	3,265 $\pm 0,330$ a	3,344 $\pm 0,331$ a	3,331 $\pm 0,332$ a

12. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 8. travnja 1980. godine u Bjelovaru. Svoje školovanje započela sam u Osnovnoj školi Kalnik te ga nastavila u Osnovnoj školi Sveti Petar Orehovec. Nakon završenog općeg smjera Gimnazije Ivana Zakmardija Dijankovečkoga u Križevcima, 1998. godine upisala sam Biološki odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, smjer ekologija. Dodatno sam 2003. godine upisala razliku pedagoških predmeta. Diplomirala sam 16. svibnja 2005. godine i time stekla zvanje diplomiranog inženjera biologije – ekologije i profesora biologije.

Od siječnja 2006. godine do svibnja 2007. godine bila sam zaposlena u Veterinarskoj stanici u Čakovcu, a od lipnja 2007. godine zaposlena sam kao asistent na Odjelu za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Sudjelujem u izvođenju praktičnog dijela nastave u sklopu kolegija: Biologija stanice, Fizikalni temelji instrumentalnih metoda u biologiji, Biljna mikrotehnika i metode mikroskopije, Ultrastruktura staničnih organela, Molekularni mehanizmi oksidativnog stresa, Kultura biljnih stanica i tkiva te Razvojne biologije biljaka. Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti (modul: Biologija biljaka) upisala sam 2008. godine.

Kao istraživač obavljam znanstvena istraživanja u okviru projekata "Utjecaj oksidativnog stresa na organizaciju i funkciju biljnih stanica i tkiva" (073-0731674-1673) prof.dr.sc. Hrvoja Lepeduša i "Stanična i tkivna diferencijacija tijekom razvoja biljnih organa" (073-0731674-0841) prof.dr.sc. Vere Cesar.

Sudjelovala sam na šest međunarodnih skupova, a u koautorstvu sam objavila dva znanstvena rada.

Član sam Hrvatskog društva za biljnu biologiju.

Znanstveni rad objavljen u CC časopisu:

Brcko A, Pěnčík, Magnus V, Prebeg T, **Mlinarić S**, Antunović J, Lepeduš H, Cesar V, Strnad M, Rolčík J, Salopek-Sondi B. 2012. Endogenous auxin profile in the christmas rose (*Helleborus niger* L.) flower and fruit: free and amide conjugated IAA. *Journal of Plant Growth Regulation* 31(1): 63-78

Znanstveni rad objavljen u drugim časopisima:

Lepeduš H, Begović L, **Mlinarić S**, Šimić D, Štolfa I, Parađiković N, Užarević Z, Jurković V, Cesar V. 2011. Physiology and biochemistry of leaves bleaching in prematurely aging maple (*Acer saccharinum* L.) trees: II. Functional and molecular adjustment of PSII. *Acta Botanica Croatica* 70(2): 63-78.

Sažeci u zbornicima skupova:

Lepeduš H, Čupić T, Popović S, **Mlinarić S**, Jurković V, Antunović J, Cesar V. 2012. Chlorophylls content and photochemistry of thylakoid membrane in two pea cultivars with different leaf colouration. *Book of Abstracts of the FEBS 3+ Meeting From molecules to life and back*, Dumić J, Kovarik Z, Varljen J (ur.). Zagreb: Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 120-121.

Antunović J, **Mlinarić S**, Lepeduš H, Lalić A, Kovačević J, Cesar V. 2010. Biokemijski odgovori klijanaca ječma na stres izazvan sušom. *Treći hrvatski botanički kongres, Knjiga sažetaka*, Jasprica N, Pandža M, Milović M (ur.). Zagreb: Školska knjiga d.o.o., 35-35.

Mlinarić S, Antunović J, Cesar V, Lepeduš H. 2010. Chloroplast proteins and PSII photochemistry in young and mature leaves of common fig. *The secret life of biomolecules, HDBMB 2010, Book of abstracts*, Kovarik Z, Varljen J (ur.). Opatija: Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 81-81.

Begović L, **Mlinarić S**, Antunović J, Katanić Z, Lepeduš H, Cesar V. 2009. Physiological responses of duckweed (*Lemna minor* L.) to short-term cobalt exposure. *10. hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Zbornik sažetaka*, Besendorfer V, Kopjar N, Vidaković-Cifrek Ž, Tkalec M, Bauer N, Lukša Ž (ur.). Zagreb: Hrvatsko biološko društvo 1885, 93-94.

Begović L, **Mlinarić S**, Štolfa I, Parađiković N, Šimić D, Cesar V, Lepeduš H. 2008. Functional and molecular adjustment of PSII in bleached leaves of silver maple. Book of abstracts of the HDBMB 2008, Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, Strelec I, Glavaš-Obrovac Lj (ur.). Osijek: Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 66-67.

Mlinarić S, Antunović J, Štolfa I, Cesar V, Lepeduš H. 2008. Diurnal changes of Rubisco LSU accumulation and photosynthetic efficiency during maturation of common fig leaves. Book of abstracts of the HDBMB 2008, Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, Strelec I, Glavaš-Obrovac Lj (ur.). Osijek: Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 111-112.