

# Utjecaj prihrane na listove mungo graha (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) u stresnim uvjetima

---

**Kuzmanović, Adrian**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:863439>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-05**



**ODJEL ZA  
BIOLOGIJU**  
Sveučilište Josipa Jurja  
Strossmayera u Osijeku

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Adrian Kuzmanović

**Utjecaj prihrane na listove mungo graha (*Vigna radiata* (L.) R.  
Wilczek) u stresnim uvjetima**

Završni rad

Osijek, 2019.

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

**Odjel za biologiju**

**Preddiplomski sveučilišni studij Biologija**

**Znanstveno područje: Prirodne znanosti**

**Znanstveno polje: Biologija**

**UTJECAJ PRIHRANE NA LISTOVE MUNGO GRAHA (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) U  
STRESNIM UVJETIMA**

**Adrian Kuzmanović**

**Rad je izrađen u:** Laboratoriju za staničnu i molekularnu biologiju biljaka

**Mentor:** Dr. sc. Selma Mlinarić, doc.

**Kratak sažetak završnog rada:**

Mungo grah (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) je mahunarka karakteristična za suptropska područja te može tolerirati visoke temperature. Folijarna prihrana gnojivima koje sadrže aminokiseline utječu na procese fotosinteze i pomažu u oporavku biljke nakon izlaganja stresnim uvjetima. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj folijarne prihrane komercijalnim tekućim gnojivom (Amiksol) na fotosintetsku učinkovitost klijanaca mungo graha uzgojenog na različitim intenzitetima svjetlosti te nakon izlaganja temperaturnom stresu. Rezultati su pokazali da temperaturni stres nije doveo do smanjenja fotosintetske učinkovitosti bez obzira na način uzgoja. Tretman tekućim gnojivom Amiksolom doveo je do povećanja omjera uhvaćene u odnosu na otpuštenu energiju što je utjecalo na porast indeksa fotosintetske učinkovitosti u uvjetima uzgoja pri niskom intenzitetu svjetlosti uslijed.

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** Mungo grah, fluorescencija klorofila *a*, PI<sub>ABS</sub>, pokretačke snage, Amiksol

**Rad je pohranjen:** na mrežnim stranicama Odijela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Bachelor thesis**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**

**Department of Biology**

**Undergraduate university study programme in Biology**

**Scientific Area:** Natural Sciences

**Scientific Field:** Biology

**IMPACT OF FERTILIZER ON MUNG BEAN (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) LEAVES IN STRESS  
CONDITIONS**

**Adrian Kuzmanović**

**Thesis performed at:** Laboratory of plant cell and molecular biology

**Supervisor:** Selma Mlinarić, PhD, assistant professor

**Short abstract:**

Mungo beans (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) is a legume characteristic for subtropical areas and can tolerate high temperatures. Foliar fertilizers containing amino acids can affect the photosynthetic processes and help in recovery of the plant after exposure to stress. The aim of this study was to determine the influence of foliar fertilization with commercial liquid fertilizer (Amiksol) on photosynthetic efficiency of mung bean seedlings grown on different light intensities and after exposure to temperature stress. The results showed that temperature stress did not influence the decrease of photosynthetic efficiency, regardless of the growth conditions. The seedlings grown at low light intensity showed that treatment with liquid fertilizer Amiksol increased the ratio of trapped and dissipated energy, which led to the increase of overall photosynthetic performance index.

**Original in:** Croatian

**Key words:** Mung bean, chlorophyll *a* fluorescence,  $PI_{ABS}$ , driving forces, Amiksol

**Thesis deposited:** on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Mungo grah (<i>Vigna radiata</i> (L.) R. Wilczek).....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Fotosinteza i fluorescencija klorofila <i>a</i> .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3. Djelovanje visokih temperatura i gnojidba .....</b>	<b>2</b>
<b>1.4. Cilj istraživanja.....</b>	<b>3</b>
<b>2. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Biljni materijal .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Tretman Amiksolom.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3. Tretman visokom temperaturom .....</b>	<b>5</b>
<b>2.4. Mjerenje polifaznog porasta fluorescencije klorofila <i>a</i> .....</b>	<b>6</b>
<b>3. REZULTATI.....</b>	<b>8</b>
<b>4. RASPRAVA .....</b>	<b>14</b>
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>17</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>18</b>

## 1. UVOD

Globalnim zatopljenjem, globalna prosječna temperatura zraka povećava se oko 0,2 °C po desetljeću, te ne pokazuje znakove smanjivanja, što može ugroziti mnoge poljoprivredne kulture neotporne na više temperature (Hansen i sur., 2006). Potreba za dodatnim tretmanom biljaka kako bi se one uspješno nosile sa stresnim uvjetima, poput izloženosti visokim temperaturama, dovela je do povećane potražnje za različitim preparatima koji bi umanjili negativne utjecaje, te doveli do smanjene štete.

### 1.1. Mungo grah (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek)

Mungo grah (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) je brzorastuća mahunarka (Slika 1), karakteristična za tropsko i subtropsko područje. Optimalna temperatura za potencijalni prinos mungo graha je između 28 i 30°C no može tolerirati temperature od 8°C do 40 °C (Karim i sur., 2003). Zrelo sjeme se koristi u azijskoj prehrani, posebice u Indiji, te se još, kao većina mahunarki, koristi u poljodjelstvu zbog svojstva vezanja atmosferskog dušika putem simbiotskih bakterija koje formiraju kvržice na korijenju graha. Dio dušika mogu koristiti i biljke u blizini, dok razlaganjem mungo graha, posebice korijena, u tlu, dolazi do obogaćivanja tla dušikom (Razzaque i sur., 2017).



Slika 1: Klijanci mungo graha (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek)

## 1.2. Fotosinteza i fluorescencija klorofila *a*

Fotosinteza je kemijski proces kojim se pomoću svjetlosne energije iz vode dobiva kisik, te se ugljikov dioksid reducira do šećera glukoze. Mehanizam fotosinteze je složen, a razlikujemo reakcije ovisne o svjetlosti i reakcije neovisne o svjetlosti. Tijekom reakcija ovisnih o svjetlosti, svjetlosnu energiju apsorbiraju pigmenti smješteni u kloroplastima, od kojih glavnu fotoakceptorsku ulogu preuzima klorofil *a* unutar reakcijskih središta. Apsorpcijom svjetla elektroni klorofila se pobuđuju na višu energetska razinu. Nadalje dolazi do prebacivanja elektrona na akceptore elektrona, te nastavlja daljnji tok elektrona u transportnom lancu, potreban za provođenje reakcija fotosinteze. Dio apsorbirane svjetlosne energije oslobađa se u obliku fluorescencije i topline (Stirbert i Govindjee, 2011.). Hoće li se elektron s višeg energetska stanja prebaciti na akceptor ili će se jednostavno vratiti u osnovno stanje pri čemu će osloboditi toplinu ili svjetlost, tj. fluorescirati, tri su mogućnosti koje su u međusobnoj kompeticiji (Murchie i Lawson, 2013.). Prebacivanjem elektrona na prikladan akceptor započinje tok visokoenergetskih elektrona kroz različite molekule, tijekom čega se redukcijom  $\text{NADP}^+$  u konačnici stvara NADPH, te proton motorna sila potrebna za sintezu ATP-a. Nastali NADPH i ATP se nadalje koriste u reakcijama neovisnim o svjetlosti za redukciju ugljikova dioksida do molekula 3-fosfoglicerata (Nelson i Cox, 2013).

## 1.3. Djelovanje visokih temperatura i gnojidba

Biljke su iznimno podložne djelovanju abiotičkih čimbenika, ponajviše promjenama temperature. Djelovanje visokih temperatura očituje se kroz nekoliko štetnih posljedica za biljku, posebice u procesu fotosinteze: oštećenje fotosustava II, oštećenje kompleksa koji ekstrahira kisik iz vode, raspadanje tilakoidne membrane, promjene u sastavu fosfolipidnog dvosloja membrana, inaktivacija Rubisco aktivaze, povećan ciklični tok elektrona kroz fotosustav I (PSI), stvaranje reaktivnih kisikovih jedinki, zatvaranje puči, proizvodnja „*heat shock*“ proteina, promjene u genskoj ekspresiji i dr. (Mathur i Jajoo, 2014).

Amiksol je komercijalno tekuće gnojivo koje sadrži biološki aktivne L-aminokiseline biljnog podrijetla dobivene mikrobiološkom razgradnjom. Nakon folijarne primjene Amiksola, slobodne L-aminokiseline lako su dostupne biljci za sintezu proteina koji sudjeluju u obrani i obnavljanju nakon stresnih uvjeta i u uvjetima povećane potrebe za aminokiselinama, poput intenzivnog vegetativnog rasta (Web 1).

#### **1.4. Cilj istraživanja**

Mungo grah se uzgaja u područjima s visokim temperaturama, a osvjetljenje može znatno varirati tijekom sezona ali i tijekom dana. Nužno je da se fotosintetski procesi se vrlo brzo prilagode takvim uvjetima. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj folijarne prihrane komercijalnim tekućim gnojivom (Amiksol) na fotosintetsku učinkovitost klijanaca mungo graha uzgojenog na različitim intenzitetima svjetlosti te nakon izlaganja temperaturnom stresu.



## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. Biljni materijal

Sjemenke mungo graha (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) posijane su u mješavinu komercijalnog supstrata i pijeska (omjer 5:1) i uzgajan do pojave prvih listova u posudicama u uzgojnoj komori pri uvjetima osvjetljenja od  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  te temperaturi od  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  te 16/8h dnevno-noćnim ritmom. Nakon 10 dana biljke su presađene u posudice sa 100g supstrata i pijeska u istom omjeru. Presađeno je 30 biljka i to po jedna biljka po posudici te je svaka zalijana sa 50 mL vode. Presađene biljke su prebačene u klima komoru (komora s kontroliranim uvjetima) gdje su rasle do kraja eksperimenta.



Slika 2: Mungo grah (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) smješten u posudicama u klima komori

Biljke su u klima komori uzgajane dva puta. U prvom uzgoju uvjeti u klima komori su bili isti kao i u uzgojnoj komori: konstantno nisko osvjetljenje od  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura od  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  te 16/8h dnevno-noćni ritam. U drugom uzgoju intenzitet svjetlosti se mijenjao tijekom 16 sati svjetlosti od minimalno 40 do maksimalno  $650 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  oponašajući dnevni ritam (najniži intenzitet svjetlosti ujutro i navečer, a najviši intenzitet oko podneva). Nakon 20 dana sve biljke su imale u potpuno razvijen prvi pravi list te je započeo tretman Amiksolom. Biljke su bile podijeljene u dvije skupine: kontrolne i tretirane Amiksolom.

## 2.2. Tretman Amiksolom

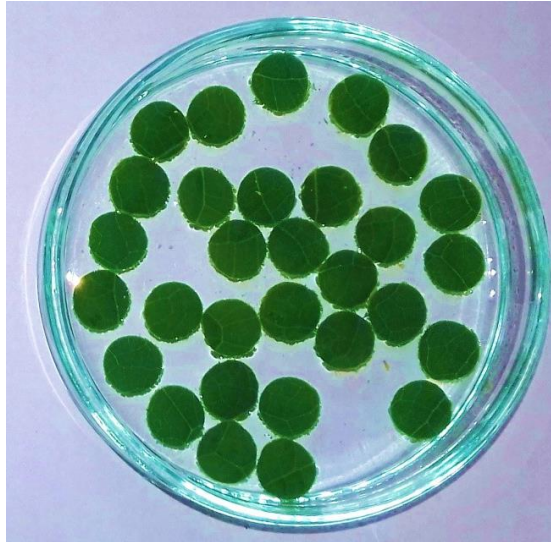
Otopina Amiksola je pripravljena prema uputama proizvođača za folijarni primjenu i to tako da se 2 mL preparata razrijedi u 20 mL vode. Tako pripremljen preparat folijarno se aplicirao pomoću raspršivača na potpuno razvijene prve prave listove mungo graha. Biljke su tretirane tri puta u razmaku od 10 dana nakon čega su podvrgnute tretmanu visokom temperaturom.



Slika 3: Potpuno razvijeni prvi pravi listovi mungo graha (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) u kontroli (lijevo) i tretirani Amiksolom (desno).

## 2.3. Tretman visokom temperaturom

Za tretman visokom temperaturom, biljke su prilagođene na uvjete tame 1h. Od potpuno razvijениh listova pomoću bušača za čepove izrezani su lisni diskovi promjera 7 mm. Lisni diskovi su uronjeni u termostatiranu vodenu kupelj (Sutjeska) na različite temperature: 25, 30, 35 i 40°C. Nakon toga su lisni diskovi izvađeni i pažljivo posušeni papirnatim ubrusom te ostavljeni da se aklimatiziraju na sobnoj temperaturi 2 min prije mjerenja fluorescencije klorofila *a*. Čitav postupak se odvija u mraku, odnosno pri zelenoj svjetlosti u tamnoj komori (Chen i sur., 2016).



Slika 4: Lisni diskovi potpuno razvijenih listova mungo graha (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) korišteni za tretman visokom temperaturom

#### **2.4. Mjerenje polifaznog porasta fluorescencije klorofila *a***

Fotosintetska učinkovitost mjerena je metodom mjerenja polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* koristeći M-PEA fluorimetar (Hansatech, UK). Mjereno je po 10 lisnih diskova svake skupine (kontrola i tretirane Amiksolom) na svakoj temperaturi. Mjerenje podrazumijeva induciranje fluorescencije pomoću pulsa crvene saturacijske svjetlosti visokog intenziteta (maksimum 650nm, 3000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) tijekom 1 s počevši od 20  $\mu\text{s}$ . Izmjerene vrijednosti koriste se za izračun parametara JIP-testa (Tablica 1) koji opisuju učinkovitost fotosintetskog aparata (Strasser i sur., 2000).

Tablica 1: Podatci i parametri OJIP-testa (Strasser i sur. 2000)

Parametar	Opis i jednadžba
$F_0$	intenzitet fluorescencije nakon 50 $\mu$ s (O stupanj)
$F_{300}$	intenzitet fluorescencije nakon 300 $\mu$ s
$F_J$	intenzitet fluorescencije nakon 2ms (J stupanj)
$F_I$	intenzitet fluorescencije nakon 30ms (I stupanj)
$F_m$	maksimalni intenzitet fluorescencije (P stupanj)
$V_t$	Relativna varijabilna fluorescencija u vremenu $t$ ; $(F_t - F_0)/(F_m - F_0)$
$\gamma_{RC}$	Vjerojatnost da molekula klorofila funkcionira kao reakcijsko središte; $Chl_{RC}/Chl_{total} = RC/(ABS+RC)$
$\Phi_{P0}$	Maksimalni kvantni prinos primarne fotokemije; $TR_0/ABS = [1 - (F_0/F_m)]$
$\psi_{E0}$	Učinkovitost/vjerojatnost elektronskog transporta (ET); učinkovitost/vjerojatnost prijenosa elektrona dalje od $Q_A^-$ ; $ET_0/TR_0 = (1 - V_J)$
$PI_{ABS}$	indeks fotosintetske učinkovitosti; $[\gamma_{RC}/(1 - \gamma_{RC})] \times [\Phi_{P0}/(1 - \Phi_{P0})] \times [\psi_{E0}/(1 - \psi_{E0})]$
$DF_{ABS}$	indikator pokretačkih snaga u PSII; $\log(PI_{ABS})$
$\log \gamma_{RC}/(1 - \gamma_{RC})$	doprinos uslijed gustoće reakcijskih središta po količini klorofila i/ili veličine antena PSII
$\log \Phi_{P0}/(1 - \Phi_{P0})$	doprinos svjetlosnih reakcija primarnoj fotokemiji
$\log \psi_{E0}/(1 - \psi_{E0})$	doprinos reakcija neovisnih o svjetlosti, od $Q_A^-$ do plastocijana (PC)

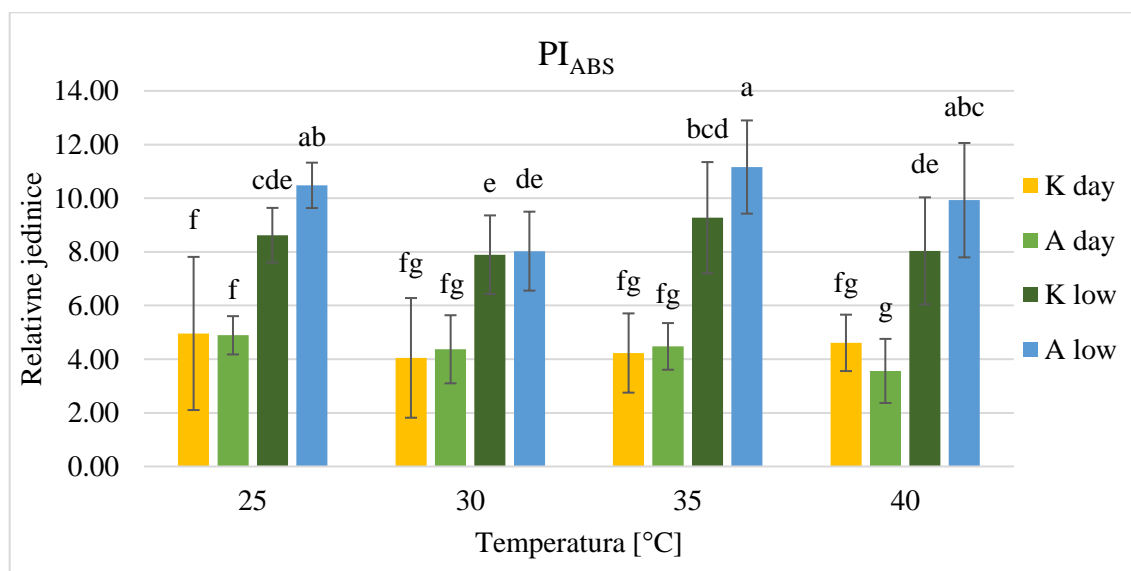
## 2.5 Statistička obrada podataka

Dobiveni rezultati mjerenja fluorescencije klorofila *a* obrađeni su računalnim programom StatSoft Inc. STATISTICA version 12. Razlike između vrijednosti pojedinog parametra izmjenjenog na listovima klijanaca mungo graha uzgojenih na konstantno niskom i promjenjivom intenzitetu svjetlosti nakon tretmana povišenim temperaturama u kontroli i tretiranih Amiksolom, uspoređene su analizom varijance (ANOVA) nakon čega je primijenjen LSD (engl. *Least Significant Difference*) *post hoc* test. Značajnost je utvrđena na razini  $p < 0,05$ .

### 3. REZULTATI

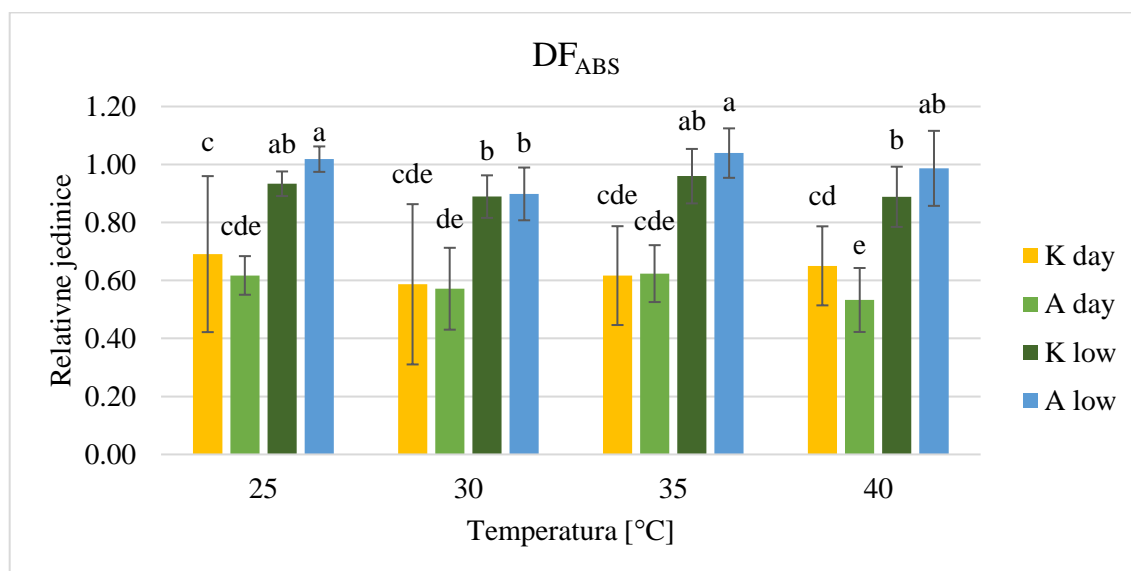
Nakon provedenih mjerenja izračunati su parametri koji opisuju fotosintetsku učinkovitost mungo graha (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) uzgajanog na konstantno niskom (low) i promjenjivom (day) intenzitetu svjetlosti u kontroli (K) i tretiranog Amiksolom (A) nakon tretmana povišenom temperaturom. Proučavani parametri bili su indeks fotosintetske učinkovitosti temeljen na apsorpciji ( $PI_{ABS}$ ) i pokretačka snaga na temelju apsorpcije ( $DF_{ABS}$ ), komponente koje čine indeks fotosintetske učinkovitosti:  $\gamma_{RC}/(1-\gamma_{RC})$ ,  $\varphi_{P0}/(1-\varphi_{P0})$  i  $\Psi_{E0}/(1-\Psi_{E0})$ , te parcijalne pokretačke snage  $\log \gamma_{RC}/(1-\gamma_{RC})$ ,  $\log \varphi_{P0}/(1-\varphi_{P0})$  i  $\log \Psi_{E0}/(1-\Psi_{E0})$ .

Indeks fotosintetske učinkovitosti,  $PI_{ABS}$ , (Slika 5) je pokazao značajno više vrijednosti kod biljaka koje su uzgajane na konstantno niskom intenzitetu svjetlosti. Kod biljaka uzgajanih na niskom intenzitetu svjetlosti, tretman Amiksolom je pokazao pozitivan učinak na indeks fotosintetske učinkovitosti nakon tretmana na 25, 35 i 40°C u odnosu na kontrolu. Kod biljaka uzgojenih na promjenjivom intenzitetu svjetlosti nije bilo značajnog utjecaja tretmana Amiksolom na  $PI_{ABS}$  ni na jednoj apliciranoj temperaturi u odnosu na kontrolu. Povišene temperature nisu utjecale na smanjenje ovog parametra bez obzira na tip uzgoja.



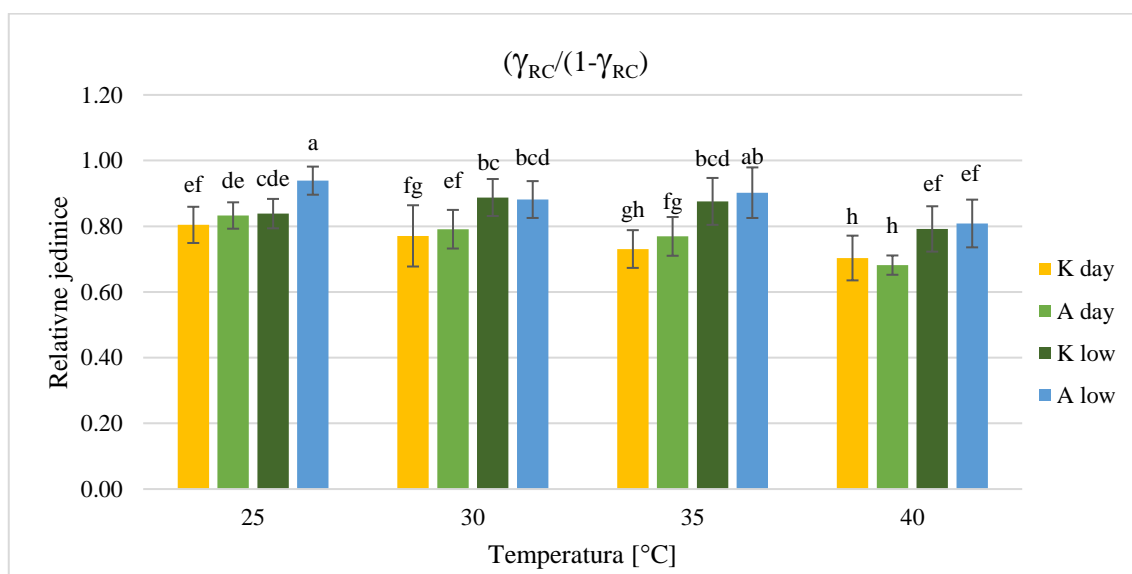
Slika 5: Prosječne vrijednosti i standardne devijacije indeksa fotosintetske učinkovitosti ( $PI_{ABS}$ ) izmjerene na listovima mungo graha (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) u kontroli (K) i tretirane Amiksolom (A) uzgojene na konstantno niskom (low) i promjenjivom intenzitetu svjetlosti (day) nakon tretmana povišenim temperaturama. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA),  $p < 0,05$ .

Indikator pokretačkih snaga na temelju apsorpcije,  $DF_{ABS}$  (Slika 6) je logaritam indeksa fotosintetske učinkovitosti te pokazuje sličan trend kao i  $PI_{ABS}$ . Značajno više vrijednosti primijećene su kod biljaka koje su uzgajane na konstantno niskom intenzitetu svjetlosti. Tretman Amiksolom je nije pokazao pozitivan učinak na pokretačke snage nakon tretmana povišenim temperaturama u odnosu na njihove kontrole. Kod biljaka uzgojenih na promjenjivom intenzitetu svjetlosti nije bilo značajnog utjecaja na  $DF_{ABS}$  nakon tretmana na 25, 30 i 35°C u odnosu na kontrolu, dok je nakon tretmana na 40°C došlo do značajnog smanjenja pokretačke snage  $DF_{ABS}$  na biljkama tretiranim Amiksolom u odnosu na kontrolu. Osim Amiskolom tretiranih biljaka uzgojenih na promjenjivom intenzitetu svjetlosti na 40°C, tretman povišenim temperaturama nije značajno utjecao na smanjenje pokretačkih snaga  $DF_{ABS}$  bez obzira na tretman i tip uzgoja.



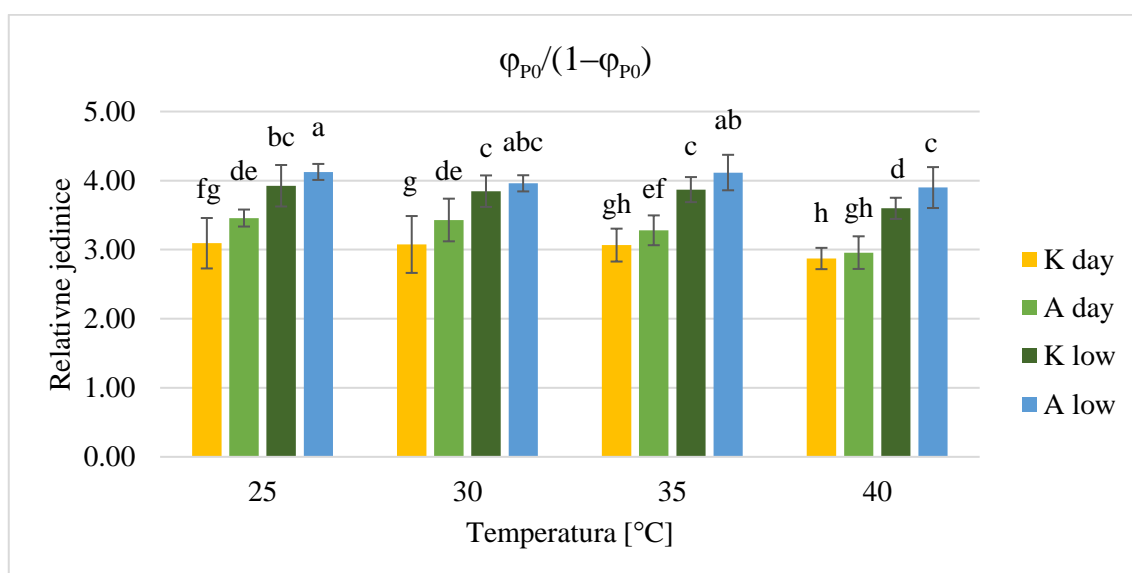
Slika 6: Prosječne vrijednosti i standardne devijacije indikatora pokretačkih snaga ( $DF_{ABS}$ ) izmjerene na listovima mungo graha (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) u kontroli (K) i tretirane Amiksolom (A) uzgojene na konstantno niskom (low) i promjenjivom intenzitetu svjetlosti (day) nakon tretmana povišenim temperaturama. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA),  $p < 0,05$ .

Parametar  $\gamma_{RC}/(1-\gamma_{RC})$  (Slika 7) opisuje gustoću reakcijskih središta fotosustava II u sloju klorofila, koja mogu reducirati  $Q_A$ . Kod biljaka uzgojenih na promjenjivom intenzitetu svjetlosti došlo je do značajnog smanjenja vrijednosti ovog parametra tek na 40°C, no tretman Amiksolom nije pokazao pozitivan učinak na ove biljke, odnosno, nije uočeno značajno povećanje ovog parametra ni na kojoj temperaturi u odnosu na kontrolu. Biljke uzgojene na konstantno niskom intenzitetu svjetlosti pokazale su nešto više vrijednosti u odnosu na biljke uzgojene na promjenjivom intenzitetu svjetlosti, naročito na temperaturama od 30, 35 i 40°C gdje je ta razlika statistički značajna. Tretman Amiksolom značajno je utjecao na porast vrijednosti ovog parametra samo na 25°C u odnosu na kontrolu.



Slika 7: Prosječne vrijednosti i standardne devijacije parametra  $\gamma_{RC}/(1-\gamma_{RC})$  izmjerene na listovima mungo graha (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) u kontroli (K) i tretirane Amiksolom (A) uzgojene na konstantno niskom (low) i promjenjivom intenzitetu svjetlosti (day) nakon tretmana povišenim temperaturama. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA),  $p < 0,05$ .

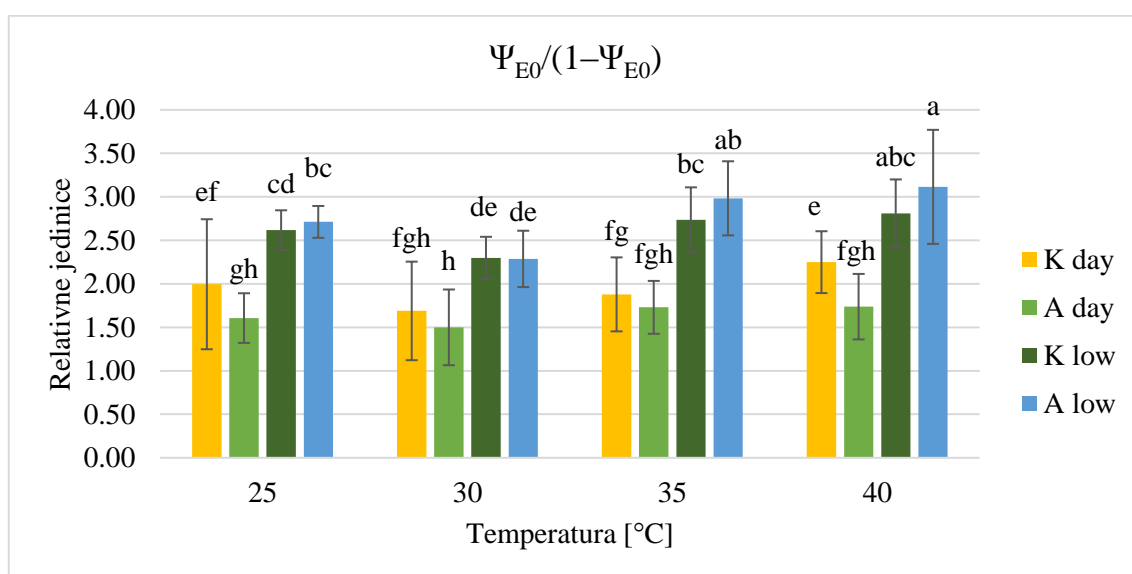
Parametar  $\phi_{P0}/(1-\phi_{P0})$  (Slika 8) opisuje omjer između uhvaćene i otpuštene energije reakcijskom središtu fotosustava II. Kod biljaka uzgojenih na promjenjivom intenzitetu svjetlosti došlo je do značajnog smanjenja vrijednosti ovog parametra na 40°C, a tretman Amiksolom utjecao je na značajan porast ovog parametra na 25, 30 i 35°C u odnosu na kontrolu. Biljke uzgojene na konstantno niskom intenzitetu svjetlosti pokazale su značajno više vrijednosti u odnosu na biljke uzgojene na promjenjivom intenzitetu svjetlosti. Kod biljaka uzgojenih na konstantno niskom intenzitetu svjetlosti došlo je do značajnog smanjenja vrijednosti ovog parametra na 40°C. Tretman Amiksolom pokazao je pozitivan utjecaj na biljke na ovom uzgoju, odnosno, došlo je do značajnog porasta ovog parametra na 25, 35 i 40°C u odnosu na kontrolu.



Slika 8: Prosječne vrijednosti i standardne devijacije parametra  $\phi_{P0}/(1-\phi_{P0})$  izmjerene na listovima mungo graha (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) u kontroli (K) i tretirane Amiksolom (A) uzgojene na konstantno niskom (low) i promjenjivom intenzitetu svjetlosti (day) nakon tretmana povišenim temperaturama. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA),  $p < 0,05$ .



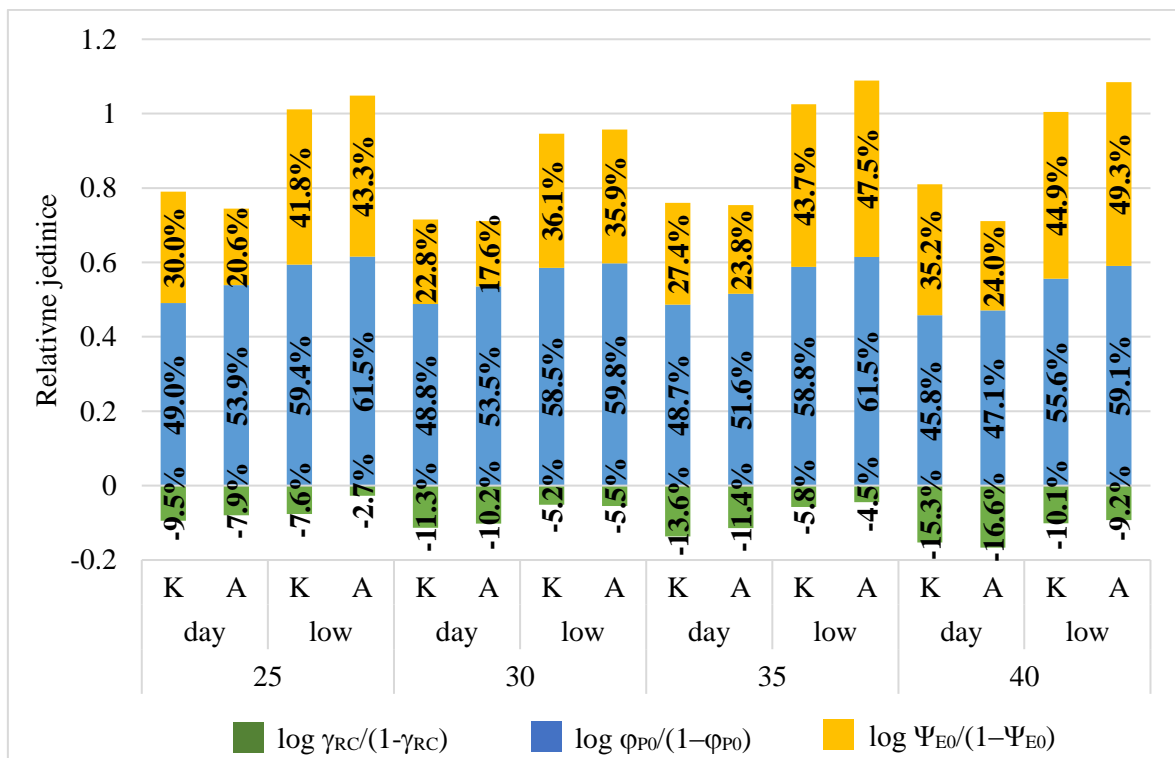
Parametar  $\Psi_{E0}/(1-\Psi_{E0})$  (Slika 9) opisuje transport elektrona dalje od primarnog akceptora  $Q_A^-$ . Ovaj parametar je pokazao značajno više vrijednosti kod biljaka koje su uzgajane na konstantno niskom intenzitetu svjetlosti u odnosu na one uzgojene na promjenjivom režimu osvjetljenja. Tretman Amiskolom nije pokazao značajan pozitivan utjecaj nakon temperaturnog tretmana bez obzira na apliciranu temperaturu ili način uzgoja u odnosu na njihove kontrole. Izuzetak su biljke uzgojene na konstantno niskom intenzitetu svjetlosti gdje je tretman Amiksolom utjecao na značajan porast vrijednosti nakon tretmana na 35°C u odnosu na kontrolu.



Slika 9: Prosječne vrijednosti i standardne devijacije parametra  $\Psi_{E0}/(1-\Psi_{E0})$  izmjerene na listovima mungo graha (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) u kontroli (K) i tretirane Amiksolom (A) uzgojene na konstantno niskom (low) i promjenjivom intenzitetu svjetlosti (day) nakon tretmana povišenim temperaturama. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema LSD testu (ANOVA),

$p < 0,05$ .

Parcijalne pokretačke snage  $\log \gamma_{RC}/(1-\gamma_{RC})$ ,  $\log \phi_{P0}/(1-\phi_{P0})$  i  $\log \Psi_{E0}/(1-\Psi_{E0})$  prikazane su na Slici 10. Zbroj svih parcijalnih pokretačkih snaga daje ukupnu pokretačku snagu  $DF_{ABS}$  (Slika 6). Može se primijetiti da je kod svih biljaka, bez obzira na način uzgoja i tretman vrijednost parcijalne pokretačke snage  $\log \gamma_{RC}/(1-\gamma_{RC})$  negativna, dok su ostale dvije parcijalne pokretačke snage,  $\log \phi_{P0}/(1-\phi_{P0})$  i  $\log \Psi_{E0}/(1-\Psi_{E0})$  pokazale pozitivne vrijednosti. Do značajno viših vrijednosti koje su primijećene su kod biljaka uzgajanih na konstantno niskom intenzitetu svjetlosti došlo je uslijed povećanja sva tri parametra parcijalnih pokretačkih snaga. Promjene parcijalnih pokretačkih snaga uslijed tretmana Amiksolom nisu značajno doprinijele povećanju ukupne pokretačke snage nakon tretmana povišenim temperaturama u odnosu na njihove kontrole. Kod biljaka uzgojenih na promjenjivom intenzitetu svjetlosti nije bilo većih razlika parcijalnih pokretačkih snaga pa tako ni značajnog utjecaja na ukupnu  $DF_{ABS}$  nakon tretmana na 25, 30 i 35°C u odnosu na kontrolu. Nakon tretmana na 40°C došlo do značajnog smanjenja pokretačke snage  $DF_{ABS}$  na biljkama tretiranim Amiksolom u odnosu na kontrolu uslijed smanjenja  $\log \Psi_{E0}/(1-\Psi_{E0})$ .



Slika 10: Postoci (%) udjela parcijalnih pokretačkih snaga koji doprinose ukupnoj pokretačkoj snazi  $DF_{ABS}$  izmjereni na listovima mungo graha (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) u kontroli (K) i tretirane Amiksolom (A) uzgojene na konstantno niskom (low) i promjenjivom intenzitetu svjetlosti (day) nakon tretmana povišenim temperaturama.

## 4. RASPRAVA

U ovom istraživanju proučavan je utjecaj folijarne prihrane komercijalnim preparatom Amiksolom na fotosintetsku učinkovitost u uvjetima temperaturnog stresa biljaka uzgajanih na različitim svjetlosnim režimima. Istraživanje je provedeno na mungo grahu (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). Mungo grah je vrsta koja se uzgaja u tropskim i suptropskim područjima, a optimalna temperatura pri kojoj se očekuje potencijalni prinos je između 28 i 30°C. Ova vrsta raste u ljetnim mjesecima kada temperatura može narasti i preko 40°C, a intenzitet svjetlosti se može vrlo brzo mijenjati tijekom dana (Karim i sur., 2003). Klijanci mungo graha su uzgajani na dva tipa osvjetljenja: konstantnom niskom i promjenjivom intenzitetu svjetla. Tretman Amiksolom je proveden tri puta nakon čega je apliciran tretman povišenim temperaturama. Fotosintetska učinkovitost procijenjena je nakon mjerenja polifaznog porasta fluorescencije klorofila *a*. Fluorescencija klorofila *a* koristi se kao veoma precizan i osjetljiv pokazatelj tijeka fotosintetskih reakcija. Porast fluorescencije odvija se kroz nekoliko koraka (Stirbet i Govindjee, 2011). Korak O („*origin*“) odgovara početnoj, odnosno najmanjoj vrijednosti fluorescencije ( $F_0$ ). Korak J je intenzitet fluorescencije pri 2 ms ( $F_J$ ), a korak I je intenzitet fluorescencije pri 30 ms ( $F_I$ ). Korak P („*peak*“) označava  $F_P$  ili  $F_M$ , tj. točku kada je fluorescencija maksimalna (Stirbet i Govindjee, 2012). Vrijednosti fluorescencije u ovim karakterističnim točkama koriste za izračun parametara kojima se može procijeniti fotosintetska učinkovitost.

Indeksi fotosintetske učinkovitosti, PI (eng. „*Performance indices*“) su danas značajni parametri koji se koriste u biologiji biljaka kao veoma dobar pokazatelj fotosintetskih reakcija prilikom stresnih uvjeta, a sadrže podatke koji ukazuju na uspješnost fotosustava II i specifičnih reakcija prijenosa elektrona u tilakoidnoj membrani tijekom O-J-I-P faza (Stirbert i sur., 2018). Pouzdan je pokazatelj vitalnosti biljaka te vrlo osjetljiv indikator fiziološkog stanja biljke (Stirbet i sur., 2018; Christen i sur., 2007). U ovom radu posebno je proučavan indeks fotosintetske učinkovitosti,  $PI_{ABS}$ . Parametar  $PI_{ABS}$  je definiran kao indeks fotosintetske učinkovitosti temeljen na apsorpciji, tj. moguće je procijeniti koliki je potencijal konzervacije energije fotona apsorbirane fotosustavom II (PSII) do trenutka redukcije akceptora elektrona unutar sustava, odnosno, dalje od promarnog akceptora  $Q_A^-$  (Yusuf i sur., 2010). Gledajući generalno, temperaturni stres nije pokazao znatan negativni utjecaj na fotosintetsku učinkovitost klijanaca mungo graha (Slika 5) već je znatniji utjecaj imao na način uzgoja, odnosno intenzitet svjetlosti što je bilo i za očekivati budući da je mungo grah poznat po tome da može tolerirati visoke temperature (Karim i sur., 2003). Rezultati su

pokazali značajno više vrijednosti  $PI_{ABS}$  parametra kod biljaka koje su uzgajane na kontinuirano niskom intenzitetu svjetlosti. Nadalje, do pozitivnog djelovanja Amiksola došlo je nakon tretmana na 25, 35 i 40°C u odnosu na kontrolne biljke. U uvjetima uzgoja mungo graha na niskom intenzitetu svjetlosti, folijarna prihrana imala je pozitivan utjecaj na povišenim temperaturama (35 i 40°C), odnosno, biljke su pokazale bolju vitalnost i fotosintetsku učinkovitost u odnosu na biljke koje nisu prihranjivane tekućim gnojivom. S druge strane, kod biljaka koje su rasle na promjenjivom intenzitetu svjetlosti, tretman Amiksolom nije imao nikakvog utjecaja. Uz to, klijanci mungo graha su pokazali značajno manju fotosintetsku učinkovitost u odnosu na biljke koje su rasle u ne-fotoinibitornim uvjetima. To je vidljivo i iz pokretačkih snaga  $DF_{ABS}$  (eng. „*driving forces*“ – DF; Slika 6), odnosno elektro-potencijala redoks reakcija primarne fotosinteze (Krüger i sur., 2014) koje su pokazale značajno bolje reakcije u ne-fotoinibitornim uvjetima.

$PI_{ABS}$  je multi-parametrijski izraz koji uključuje tri komponente, odnosno opisuje tri procesa koji pridonose ukupnoj fotosintetskoj učinkovitosti:  $\gamma_{RC}/(1-\gamma_{RC})$ ,  $\phi_{P0}/(1-\phi_{P0})$  i  $\Psi_{E0}/(1-\Psi_{E0})$ . Izraz  $\gamma_{RC}/(1-\gamma_{RC})$  (Slika 7) se navodi još i kao RC/ABS te predstavlja gustoću reakcijskih središta po sloju klorofila reakcijskih središta i antena PSII. Gustoća reakcijskih središta recipročna je veličini antena PSII. Izraz  $\phi_{P0}/(1-\phi_{P0})$  (Slika 8) ili  $TR_0/DI_0$  opisuje omjer protoka uhvaćene i rasipane energije koja doprinosi primarnim reakcijama fotokemije. Izraz  $\Psi_{E0}/(1-\Psi_{E0})$  (Slika 9) ili  $ET_0/(TR_0-ET_0)$  opisuje elektronski transport dalje od primarnog akceptora  $QA^-$  (Strasser i sur., 2004; Yussuf i sur., 2010; Krüger i sur., 2014). Uzgoj na promjenjivom intenzitetu svjetlosti je utjecao na značajno niže vrijednosti sva tri parametra u odnosu na uzgoj na konstantno niskom intenzitetu svjetlosti. Uz to, tretman Amiksolom nije pokazao nikakve pozitivne utjecaje na poboljšanje ovih reakcija. S druge strane, tretman tekućim gnojivom je na 25°C utjecao tako da je došlo do povećanja gustoće aktivnih reakcijskih središta te do veće količine uhvaćene energije u odnosu na dio koji se otpustio, odnosno, poboljšanja prinosa primarne fotokemije (Krüger i sur., 2014). Na 30°C tretman Amiksolom je pozitivno utjecao na poboljšanje primarne fotokemije, odnosno, došlo je do porasta parametra  $\phi_{P0}/(1-\phi_{P0})$  (Slika 8). Ipak, taj značajni porast nije u konačnici nije bio dovoljan da bi utjecao na ukupni porast indeksa fotosintetske učinkovitosti (Slika 5) na ovoj temperaturi. Tretman Amiksolom na 35°C je pokazao pozitivan utjecaj sva tri parametra, odnosno, došlo do povećanja gustoće aktivnih reakcijskih središta što je dovelo do povećanje količine uhvaćene energije u odnosu na dio koji se otpustio, a ta se uhvaćena energija uspješno iskoristila u primarnim fotokemijskim reakcijama te prenijela dalje u

transportni lanac elektrona dalje od primarnog akceptora. Slično tome, tretman Amiksolom na 40°C je pokazao povećanje omjera uhvaćene i otpuštene energije i uspješni elektronski transport, no nije došlo do povećanja gustoće reakcijskih središta. Moguće je da je u ovom slučaju tekuće gnojivo dovelo do poboljšanja učinkovitosti kompleksa koji katalizira oksidaciju vode i doprinosi stabilnosti sustava (Kalaji i sur., 2011).

Suma parcijalnih pokretačkih snaga  $\log \gamma_{RC}/(1-\gamma_{RC})$ ,  $\log \phi_{P0}/(1-\phi_{P0})$  i  $\log \Psi_{E0}/(1-\Psi_{E0})$  (Slika 10) daje ukupnu pokretačku snagu  $DF_{ABS}$  (Slika 6) fotosinteze promatranog sustava. pokretačka snaga definirana je kao logaritam odgovarajućeg parametara učinkovitosti, tako da je  $DF_{ABS} = \log(\Pi_{ABS})$  te opisuje pokretačku snagu na temelju apsorpcije (Stirbert i Govindjee, 2011). Svaka komponenta ili parcijalna pokretačka snaga koja čini ukupnu  $DF_{ABS}$  omogućava nam da procijenimo različite strukturne parametre koje doprinose ukupnoj fotosintetskoj učinkovitosti:  $\log \gamma_{RC}/(1-\gamma_{RC})$  je mjera gustoće reakcijskih središta i recipročna je veličini antena PSII,  $\log \phi_{P0}/(1-\phi_{P0})$  je doprinos svjetlosnih reakcija za primarnu fotokemiju ukupnoj fotosintetskoj učinkovitosti, a  $\log \Psi_{E0}/(1-\Psi_{E0})$  je doprinos reakcija neovisnih o svjetlosti od  $Q_A^-$  do plastocijana (PC) (Krüger i sur., 2014). Klijanci mungo graha pokazali su negativne vrijednosti  $\log \gamma_{RC}/(1-\gamma_{RC})$  dok su  $\log \phi_{P0}/(1-\phi_{P0})$  i  $\log \Psi_{E0}/(1-\Psi_{E0})$  pokazali pozitivne vrijednosti bez obzira na tretman i način uzgoja. Klijanci uzgojeni na konstantno niskom intenzitetu su pokazali značajno više vrijednosti  $DF_{ABS}$  što je rezultat viših vrijednosti  $\log \phi_{P0}/(1-\phi_{P0})$  i  $\log \Psi_{E0}/(1-\Psi_{E0})$ , odnosno manje negativnih vrijednosti  $\log \gamma_{RC}/(1-\gamma_{RC})$ . Iako tretman Amiksolom nije pokazao značajan porast ukupne  $DF_{ABS}$ , postoje razlike u omjerima parcijalnih pokretačkih snaga. Kod biljaka uzgojenih na promjenjivom intenzitetu svjetlosti Amiksol je generalno utjecao na porast  $\log \phi_{P0}/(1-\phi_{P0})$ , a  $\log \Psi_{E0}/(1-\Psi_{E0})$  se smanjio. Prema tome, Amiksol je pozitivno utjecao na reakcije ovisne o svjetlosti koje su onda najviše doprinije porastu primarne fotokemije, no prijenos elektrona dalje od primarnog akceptora je bio smanjen. Na tretmanu pri 40°C, tretman Amiksolom utjecao je na značajan pad vrijednosti  $DF_{ABS}$  do kojeg je došlo uslijed smanjenja vrijednosti  $\log \Psi_{E0}/(1-\Psi_{E0})$ . Tretman Amiksolom na klijancima uzgojenim na konstantno niskom intenzitetu svjetlosti uzrokovao je povećanje vrijednosti svih parcijalnih pokretačkih snaga, no najveći porast je bio vidljiv na vrijednostima  $\log \Psi_{E0}/(1-\Psi_{E0})$  nakon izlaganja temperaturi od 25°C, odnosno u ne-fotoinhibitornim uvjetima. Folijarnom primjenom, L-aminokiseline u sastavu tekućeg gnojiva postaju dostupne biljci, što je omogućava sintezu proteina potrebnih za fotosintezu, primjerice za transportni lanac elektrona, te proteine poput Rubisco aktivaze, koji podliježu inaktivaciji pod utjecajem temperaturnog stresa (Stirbert i sur.,

2018). U našem istraživanju, tretman Amiksolom je pokazao pozitivan utjecaj na transportni lanac elektrona samo u slučaju klijanaca uzgojenih na niskom intenzitetu svjetlosti, no nije pokazao razlike s obzirom na temperaturni stres. Također, aminokiseline služe kao izvor energije i ugljika za biljku ukoliko dođe do nedostatka ugljikohidrata usred stresa, te kao izvor dušika, koji je u organskom obliku biljnim stanicama dostupniji nego u anorganskom obliku (Sh Sadak i sur., 2015). Nadalje, Teixeira i sur. (2018) pretpostavljaju kako aminokiseline mogu utjecati na glutamatne receptore u biljnim stanicama, koji, osim glutatomom mogu biti aktivirani nekolicinom aminokiselina. Glutamatni receptori sudjeluju u mnogim biljnim fiziološkim i morfološkim promjenama uključujući promjene u korijenskom sustavu, signaliziranju tijekom stresnih uvjeta, metabolizmu ugljikohidrata i dušika, otvaranju i zatvaranju puči i fotosintezi. Utjecaj folijarne prihrane tekućim gnojivima u čijem su sastavu bile aminokiseline pokazale su kod pšenice (*Triticum aestivum* L.) i sjetvene rotkve (*Raphanus sativus* L.) veliki utjecaj na povećanje koncentracije klorofila *a*, ukupnu količinu klorofila i karotenoida te na aktivnost antioksidativnih enzima (Basha i El-Aila, 2015; Bahari i sur., 2013).

## 5. ZAKLJUČAK

Temeljem istraživanja fotosintetske učinkovitosti na klijanacima mungo graha uzgojenih na različitim intenzitetima svjetlosti, nakon folijarne primjene komercijalnog tekućeg gnojiva Amiksola te izlaganja temperaturnom stresu, može se zaključiti sljedeće:

1. Temperaturni stres nije doveo do smanjenja indeksa fotosintetske učinkovitosti ( $PI_{ABS}$ ) bez obzira na način uzgoja.
2. Tretman tekućim gnojivom Amiksolom doveo je do porasta  $PI_{ABS}$  u uvjetima uzgoja pri niskom intenzitetu svjetlosti.
3. Do povećanja fotosintetske učinkovitosti nakon tretmana Amiksolom na niskom intenzitetu svjetlosti je došlo je zbog pozitivnog utjecaja tekućeg gnojiva na primarnu fotokemiju [ $\phi_{P0}/(1-\phi_{P0})$ ], odnosno do povećanja omjera uhvaćene u odnosu na otpuštenu energiju.

## 6. LITERATURA

- Bahari, A., Pirdashti, H., Yaghoubi, M. (2013) The effects of amino acid fertilizers spraying on photosynthetic pigments and antioxidant enzymes of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salinity stress. International Journal of agronomy and plant production 4: 787-793.
- Basha, D. M., El-Aila, H. I. (2015) Response of foliar spraying with amino acids and integrated use of nitrogen fertilizer on radish (*Raphanus sativus* L.). Plant international journal of ChemTech research 8: 135-140.
- Chen, S., Yang, J., Zhang, M., Strasser, R. J., Qiang, S. (2016) Classification and characteristics of heat tolerance in *Ageratina adenophora* populations using fast chlorophyll *a* fluorescence rise OJIP. Environmental and experimental botany 12: 126-140.
- Christen, D., Schönmann, S., Jermini, M., Strasser, R. J., Défago, 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.
- Kalaji, H. M., Bosa, K., Kościelniak, J., Żuk-Gołaszewska, K. (2011) Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO<sub>2</sub> assimilation of two Syrian barley landraces. Environmental and experimental botany 73: 64-72.
- Karim, A., Fukamachi, H., Hidaka, T. (2003) Photosynthetic performance of *Vigna radiata* L. leaves developed at different temperature and irradiance levels. Plant science 164: 451-458.
- Krüger, G. H. J., De Villiers, M. F., Strauss, A. J., De Beer, M., Van Heerden, P. D. R., Maldonado, R., Strasser, R. J. (2014) Inhibition of photosystem II activities in soybean (*Glycine max*) genotypes differing in chilling sensitivity. South African journal of botany 95: 85-96.
- Mathur, S., Jajoo, A. (2014) Photosynthesis: Limitations in response to high temperature stress. Journal of photochemistry and photobiology B: Biology 137: 116-126.
- Murchie, E.H., Lawson, T. (2013) Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. Journal of experimental botany 64: 3983–3998.

Nelson, D. L., Cox, M. M. (2013) *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed., New York, W. H. Freeman and Company.

Razzaque, M. A., Haque, M. M., Karim, M. A. (2017) Effect of nitrogen on growth and yield on mungbean in low nutrient soil. *Bangladesh journal of agricultural research* 42: 77-85.

Sh Sadak, M., Abdelhamid, M. T., Schmidhalter, U. (2015) Effect of foliar application of aminoacids on plant yield and some physiological parameters in bean plants irrigated with seawater. *Acta Biológica Colombiana* 20: 141-152.

Stirbet, A., Govindjee, G. (2011) On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* 104: 236-257.

Stirbet, A., Govindjee, G. (2012) Chlorophyll *a* fluorescence induction: A personal perspective of the thermal phase, the J-I-P rise. *Photosynthesis research* 113: 15-61.

Stirbet, A., Lazar, D., Kromdijk, J., Govindjee, G. (2018) Chlorophyll *a* fluorescence induction: Can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses?. *Photosynthetica* 56: 86-104.

Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., & Srivastava, A. (2004). Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. U: Papageorgiou, G. C., Govindjee (ur.) Chlorophyll *a* fluorescence. Springer, Dordrecht. str. 321-362.

Strasser, R. J., Srivastava, A., & Tsimilli-Michael, M. (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. U: Yunus, M., Pathre, U., Mohanty, P. (ur) Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation, Taylor and Francis, London, str. 445-483.

Teixeira, W. F., Fagan, E. B., Soares, L. H., Soares, J. N., Reichardt, K., Neto, D. D. (2018) Seed and foliar application of amino acids improve variables of nitrogen metabolism and productivity in soybean crop. *Frontiers in plant science* 9: 1-12.

Yusuf, M., Kumar, D., Rajwanshi, R. Strasser, R., Tsimilli-Michael, M., Govindjee, G., Sarin, N. (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 - Bioenergetics* 1797: 1428–1438.

Web2. Agrounik: Amiksol. <https://slavol.rs/proizvodi/Amiksol/o-Amiksolu> (15.6.2019.)