

Fotosinteza tijekom razvoja listova duhana

Vlašiček, Ivan

Master's thesis / Diplomski 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:181:967598>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**



**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

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Ivan Vlašiček

Fotosinteza tijekom razvoja listova duhana

(*Nicotiana tabacum* L.)

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

FOTOSINTEZA TIJEKOM RAZVOJA LISTOVA DUHANA (*Nicotiana tabacum* L.)

Ivan Vlašiček

Rad je izrađen u: Laboratoriju za staničnu i molekularnu biologiju biljaka, Odjel za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku

Mentor: Dr.sc. Vera Cesar, prof.

Komentor: Dr.sc. Jasenka Antunović Dunić, doc.

Kratak sažetak diplomskog rada

Duhan (*Nicotiana tabacum* L.) je gospodarski značajna kultura, a ujedno i često korišteni modelni organizam u biološkim istraživanjima. U ovom radu cilj je bio istražiti dinamiku razvoja fotosintetskog aparata tijekom ontogeneze listova duhana određivanjem koncentracija fotosintetskih pigmenata ključnih za apsorpciju svjetlosti (Chl *a*, Chl *b*) i mjerenjem fluorescencije klorofila *a* u svrhu procjene funkcionalnosti fotosintetskog aparata. Početna mjerenja izvršena su na listovima 14 dana starih presadnica, a sljedeća su obuhvatila pet insercija odnosno pet parova listova starosti 20, 24, 29, 32 i 37 dana. Rezultati su pokazali konstantni porast maksimalnog kvantnog prinosa fotosustava II (TR_0/ABS) i indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) tijekom razvoja, potvrđujući kompetentnost ispitivanih skupina listova za učinkovito apsorpiranje i iskorištavanje energije u fotokemijskim procesima, unatoč različitoj dinamici akumulacije fotosintetskih pigmenata (Chl *a*, Chl *b*, Chl *a+b*). Porast gustoće aktivnih reakcijskih središta (RC/CS_0) i smanjenje apsorpcije (ABS/RC) osigurali su porast učinkovitosti fotosustava II tijekom razvoja listova. Najviše koncentracije pigmenata izmjerene u insercijama 2 i 3 ukazuju na maksimum eksponencijalnog rasta listova u toj fazi razvoja. Degradacija pigmenata u insercijama 4 i 5 nije utjecala na funkcionalnost fotosintetskog aparata što je utvrđeno visokim vrijednostima parametara TR_0/ABS i PI_{ABS} , ali ipak ukazuje na početak senescencije listova.

Broj stranica: 47

Broj slika: 28

Broj tablica: 2

Broj literaturnih navoda: 45

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: fotosinteza, fotosintetski pigmenti, fluorescencija klorofila *a*, ontogeneza listova, učinkovitost fotosustava II (PSII)

Datum obrane: 27. rujna 2019.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Dr.sc. Janja Horvatić, izv. prof., predsjednik
2. Dr.sc. Jasenka Antunović Dunić, doc., član i komentor
3. Dr.sc. Vesna Peršić, doc., član
4. Dr.sc. Dubravka Špoljarić Maronić, doc., zamjena člana

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

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Biology
Graduate university study programme in Biology
Scientific Area: Natural sciences
Scientific Field: Biology

PHOTOSYNTHESIS IN TOBACCO (*Nicotiana tabacum* L.) LEAVES DEVELOPMENT**Ivan Vlašiček**

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

Supervisor: Vera Cesar, PhD, Full Professor
Cosupervisor: Jasenka Antunović Dunić, PhD, Assistant professor

Short abstract

Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) is one of the most economically important crops and also frequently used model organism in biological researches. The aim of this study was to investigate the dynamics of photosynthetic apparatus development during tobacco leaf ontogenesis. The concentration of photosynthetic pigments crucial for light absorption (Chl *a*, Chl *b*) as well as chlorophyll *a* fluorescence were measured to estimate functionality of photosynthetic apparatus. The measurements were performed on 14-day-old transplants and five insertions (leaf pairs) differing in developing stage (20, 24, 29, 32 and 37 days old). The results showed a constant increase of maximum quantum yield of photosystem II (TR_0/ABS) and performance index (PI_{ABS}) during development, confirming the competence of all studied leaves for efficient utilization of absorbed energy in photochemical processes, despite the different pattern of pigments accumulation. Increasing density of active reaction centers (RC/CS_0) and decreasing absorption (ABS/RC) provided a high photosystem II efficiency in developing leaves. The highest pigment concentrations measured in insertions 2 and 3 indicate that maximum exponential growth has been reached at this stage. The pigments degradation observed in insertions 4 and 5 did not affect the functionality of the photosynthetic apparatus, confirmed by the high values of TR_0/ABS and PI_{ABS} , but nevertheless suggested the onset of leaf senescence.

Number of pages: 47

Number of figures: 28

Number of tables: 2

Number of references: 45

Number of appendices: 0

Original in: Croatian

Keywords: photosystem II, photosynthetic pigments, chlorophyll *a* fluorescence, leaf ontogeny, photosystem II (PSII) efficiency

Date of thesis defence: 27th September 2019.

Reviewers:

1. Janja Horvatić, PhD, associate professor, chair
2. Jasenka Antunović Dunić, PhD, assistant professor, member and cosupervisor
3. Vesna Peršić, PhD, assistant professor, member
4. Dubravka Špoljarić Maronić, PhD, assistant professor, member

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

Srdačno zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Veri Cesar i komentorici doc. dr. sc. Jasenki Antunović Dunić na pomoći, savjetima, strpljenju i vremenu prilikom izrade ovog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima i braći na podršci, strpljenju i pomoći bez kojih ne bih mogao završiti studij.

Na kraju želim zahvaliti i mojim prijateljima i kolegama uz čije sam društvo i pomoć dočekaao završetak studija.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Opis vrste.....	1
1.2. Fotosinteza.....	2
1.2.1. Građa fotosintetskog aparata.....	3
1.2.2. Fotosintetski pigmenti i njihova funkcija.....	8
1.2.3. Fluorescencija klorofila <i>a</i>	10
1.3. Razvoj listova.....	12
1.4. Cilj rada.....	15
2. MATERIJAL I METODE.....	16
2.1. Opis eksperimenta.....	16
2.2. Mjerenje fluorescencije klorofila <i>a</i>	18
2.3. Mjerenje koncentracije fotosintetskih pigmenata.....	20
2.4. Izračun udjela suhe tvari.....	21
2.5. Statistička obrada podataka.....	21
3. REZULTATI.....	22
3.1. Parametri fluorescencije klorofila <i>a</i>	22
3.1.1. Maksimalni kvantni prinos PSII (TR_0/ABS).....	22
3.1.2. Indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}).....	23
3.1.3. Gustoća aktivnih reakcijskih središta (RC/CS_0).....	24
3.1.4. Apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu (ABS/RC).....	25
3.1.5. Hvatanje ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu (TR_0/RC).....	26
3.1.6. Transport elektrona po aktivnom reakcijskom središtu (ET_0/RC).....	27
3.1.7. Disipacija po aktivnom reakcijskom središtu (DI_0/RC).....	28
3.2. Koncentracija fotosintetskih pigmenata.....	29
3.2.1. Koncentracija klorofila <i>a</i>	29
3.2.2. Koncentracija klorofila <i>b</i>	30
3.2.3. Ukupna koncentracija klorofila <i>a</i> i <i>b</i>	31
3.2.4. Koncentracija karotenoida.....	32
3.2.5. Omjer koncentracija klorofila <i>a</i> i klorofila <i>b</i>	33
3.2.6. Omjer ukupnih koncentracija klorofila <i>a</i> i <i>b</i> i koncentracija karotenoida.....	34
3.3. Udio suhe tvari u biljnom materijalu.....	35
4. RASPRAVA.....	36
5. ZAKLJUČCI.....	42
6. LITERATURA.....	43

1. UVOD

1.1. Opis vrste

Duhan, *Nicotiana tabacum* L. pripada carstvu biljaka (Plantae), diviziji Magnoliophyta, razredu Magnoliopsida, redu Solanales, porodici Solnaceae i rodu *Nicotinana*. Sam rod *Nicotiana* sadrži 70-ak divljih vrsta, a vrsta *N. tabacum* je amfidiploid ($2n=48$), najvjerojatnije nastala hibridizacijom vrste *N. sylvestris* Spegazzini et Comes sa vrstama *N. tomentosiformis* Goodspeed i *N. otophora* Grisebach na području današnje Bolivije ili sjeverne Argentine (Lewis i Nicholson 2007). Duhan je jednogodišnja biljka sa zeljastom stabljikom visokom 100 – 120 m do cvata, građenom od internodija i nodija na kojima izrastaju listovi. Na jednoj biljci razvije se oko 20 listova. Cijela stabljika i listovi su prekriveni žljezdastim dlakama koje luče ljepljivu smolu. Na vrhu stabljike, kao i na bočnim ograncima (zapercima) razvijaju se cvjetovi skupljeni u štitasti cvat (Slika 1). Cvjetovi su bijeli ili u nijansi crvene boje, građeni od 5 sraslih lapova, 5 sraslih latica, 5 prašnika i tučka. Cvjetovi se uglavnom samooplođuju iako je moguća i stranooplodnja posredovana oprašivanjem koje vrše pčele i bumbari. Plod je tobolac u kojemu se nalaze okrugle, sitne, smeđe sjemenke. Korijen je vretenast s bočnim korijenjem koje se proteže do 1 m u širinu.

Godišnje se proizvodi više od 7 milijuna tona duhana, a glavni proizvođači u svijetu su Kina, Indija, Brazil, Sjedinjene Američke Države, Turska, Zimbabve i Malavi koji proizvedu više od 80 % svjetskih zaliha duhana. U Europi su najveći proizvođači Grčka, Italija i Španjolska, a značajni proizvođač je i Hrvatska (Web 1). U Hrvatskoj se proizvode dva tipa duhana vrste *N. tabacum* L., virdžinija (*virginia* ili *flue-cured*) i berlejš (burley). Oba tipa su slične morfologije, ali se razlikuju u sadržaju reducirajućih šećera, kojih ima mnogo više u tipu virdžinija (Stepić i sur. 2015).



Slika 1. Duhan (*Nicotiana tabacum* L.) (Web 2).

Osim što je gospodarski važna vrsta duhan je i modelna biljka u biološkim istraživanjima. On je prva genetski modificirana biljka, a na njemu su provedeni brojni eksperimenti vezani uz transformaciju, ekspresiju i stabilnost gena. Brojne spoznaje o uzgoju *in vitro* kultura kalusnog tkiva, utjecaju biljnih hormona i ostalih faktora na diferencijaciju i rast, te regeneraciju tkiva dobivene su eksperimentiranjem na duhanu. *In vitro* kulture tkiva duhana koriste se i za dobivanje i proučavanje sekundarnih metabolita, gdje je najznačajniji nikotin, ali su prisutni i drugi spojevi poput skopoletina, eskuletina i alifatskih alkana (Ganapathi i sur. 2004). Vrsta *N. tabacum* izvor je poznate stanične kulture BY-2, a sekvencioniran je i njezin genom (Sierro i sur. 2014).

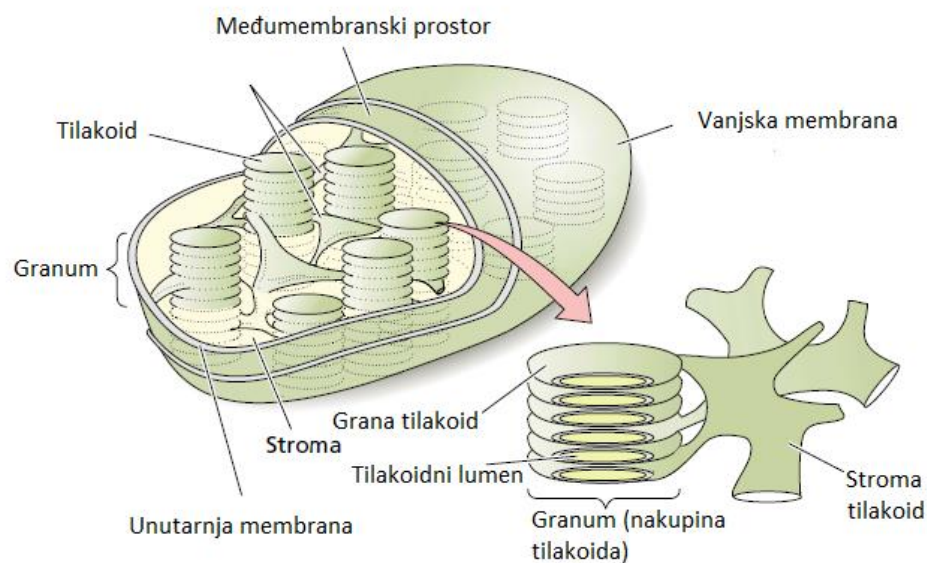
1.2. Fotosinteza

Fotosinteza je proces u kojemu organizmi koriste energiju svjetla za sintezu organskih spojeva korištenjem CO_2 u nizu redoks reakcija uz produkciju kisika fotolizom vode. Reakcije fotosinteze dijele se na svjetlosne reakcije i reakcije u tami (redukcija CO_2). U svjetlosnim reakcijama oksidacijom vode nastaje kisik i pokreće se transport elektrona u kojemu se

elektroni prenose s vode na NADP^+ pri čemu nastaje NADPH. U transportu elektrona generira se i energija u obliku protonskog gradijenta pa prolaskom protona kroz ATP - sintazu dolazi do fosforilacije ADP-a u ATP. NADPH daje elektrone bogate energijom, a ATP energiju koja se koristi za redukciju CO_2 u šećere u reakcijama u tami, poznate pod nazivom Calvinov ciklus (Buchanan i sur. 2015).

1.2.1. Građa fotosintetskog aparata

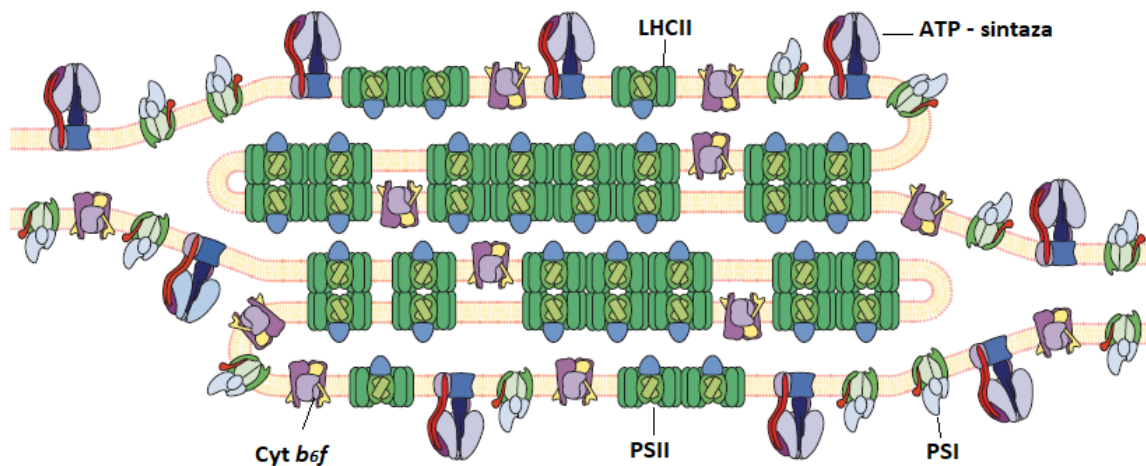
U biljkama se fotosinteza odvija u kloroplastima, zelenim plastidima koji su polusferični ili oblika leće, duljine 5 – 8 μm i debljine 3 – 4 μm . Otprilike se pola milijuna kloroplasta nalazi na jednom mm^2 lista te su većinom lokalizirani u stanicama mezofila (Buchanan i sur. 2015). U jednoj stanici broj kloroplasta varira ovisno o vrsti biljke i tipu stanice u rasponu od 50 do više od stotine (Cole 2016). Svjetlosne reakcije fotosinteze odvijaju se na tilakoidima, membranskim sustavima koji sadrže klorofil i ostale fotosintetske pigmente koji se nazivaju i antena pigmentima. Reakcije redukcije CO_2 (reakcije u tami) odvijaju se u stromi, regiji kloroplasta izvan tilakoida. Prostor unutar tilakoida naziva se lumen. Unutrašnji sustav tilakoida organiziran je u obliku stroma tilakoida i grana tilakoida koji su organizirani u granume. Kloroplasti su obavijeni sa dvije odvojene membrane koje sadrže raznolike sustave za transport metabolita (Slika 2).



Slika 2. Građa kloroplasta i organizacija tilakoida (preuzeto i prilagođeno prema Taiz i Zeiger 2002).

Membrane tilakoida sadrže proteinske kompleks među kojima su fotosustavi I i II (PSI i PSII), antena kompleksi (LHCII), citokrom *b₆f* kompleksi i ATP – sintaze. Na svim ovim proteinima razlikuju se stromalna i lumenska domena. Klorofili i ostali fotosintetski pigmenti vezani su nekovalentnim vezama za proteine (Taiz i Zeiger 2002).

Proteinski kompleksi koji sudjeluju u fotosintetskim reakcijama nisu jednoliko raspoređeni na membranama tilakoida. Fotosustav II i LHCII kompleksi nalaze se gotovo isključivo u membranama grana tilakoda, a fotosustav I nalazi se primarno u membranama stroma tilakoida i na rubovima grana tilakoida. Citokrom *b₆f* kompleks je gotovo ravnomjerno raspoređen između ova dva tipa membrana, a ATP – sintaza je lokalizirana u membranama stroma tilakoida. Ovakav raspored omogućuje optimalno kruženje komponenti koje sudjeluju u elektronskom transportu i sintezi ATP-a (Blankenship 2014) (Slika 3).

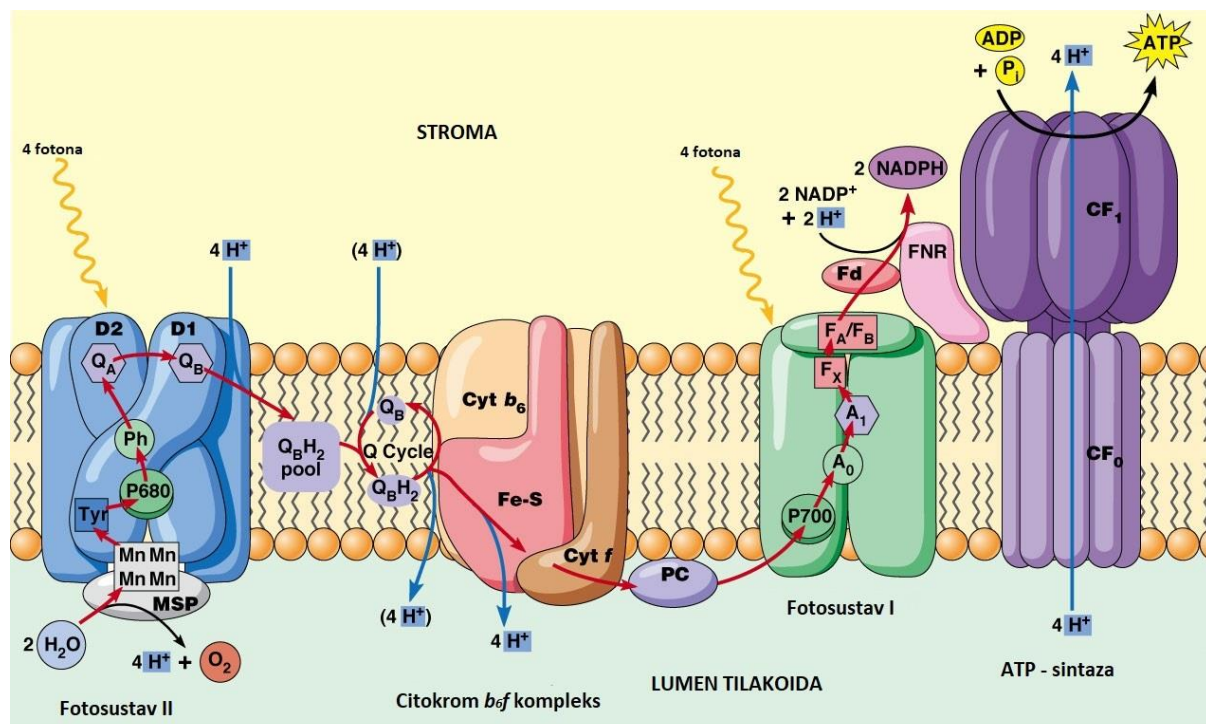


Slika 3. Lokalizacija proteinskih kompleksa fotosintetskog aparata na membranama tilakoida (preuzeto i prilagođeno prema Blankenship 2014).

Proteinski kompleksi na tilakoidnim membranama omogućuju odvijanje procesa poznatog pod nazivom elektronski transport koji je povezan sa transportom protona u lumen tilakoida što stvara gradijent protona koji se koristi za sintezu ATP-a. U kloroplastima postoje dva različita fotosustava jer se energija iz PSI koristi za proizvodnja NADPH, a energija iz PSII za sintezu ATP-a (Cooper i Hausman 2010). Reakcijski centri fotosustava sadrže specijalne parove molekula klorofila koje su primarni donori elektrona za transportni lanac. Prilikom pobuđivanja specijalnog para dolazi do razdvajanja naboja i prijenosa elektrona sa donora na akceptor. Elektron se može vratiti nazad na donor u procesu poznatom kao rekombinacija pri

čemu se energija gubi kao toplina. Rekombinacija se izbjegava transportom elektrona kroz niz akceptora (Blankenship 2014).

Jezgra fotosustava II je građena od proteina D1 i D2 koji prolaze kroz tilakoidnu membranu te su povezani sa antena kompleksima. Za njih je vezan specijalni par molekula klorofila koji se pobuđuje energijom apsorbirane svjetlosti. Apsorpcijski maksimum specijalnog para u PSII je na 680 nm pa se taj par naziva i P680. Nakon pobuđivanja, P680 predaje energiju obližnjem feofitinu, molekuli sličnoj klorofilu koji umjesto Mg^{2+} sadrži dva H^+ iona. Odavde se elektron prenosi na čvrsto vezanu molekulu plastokinona (Q_A), a zatim na izmjenjivi plastokinon (Q_B). Nakon pristizanja drugog elektrona, plastokinon je reduciran na plastokinol (PQH_2), uz utrošak 2 protona koji potječu iz strome (Berg i sur. 2002). Jedinstveni dio fotosustava II je kisik – razvijajući kompleks (OEC) na lumenskoj strani. OEC sadrži skup od četiri manganova atoma, gdje brojni aminokiselinski ostaci iz D1 služe kao ligandi, a prisutni su i drugi proteini. OEC katalizira oksidaciju H_2O na molekulu kisika, pri čemu nastaju četiri protona u lumenu i četiri elektrona koji se koriste u elektronskom transportu. Ova reakcija je moguća jer je oksidirani klorofil u reakcijskom centru ($P680^+$) jaki oksidans. Sam mehanizam oksidacije vode nije potpuno poznat (Blankenship 2014).



Slika 4. Prikaz transportnog lanca elektrona (preuzeto i prilagođeno prema Web 3).

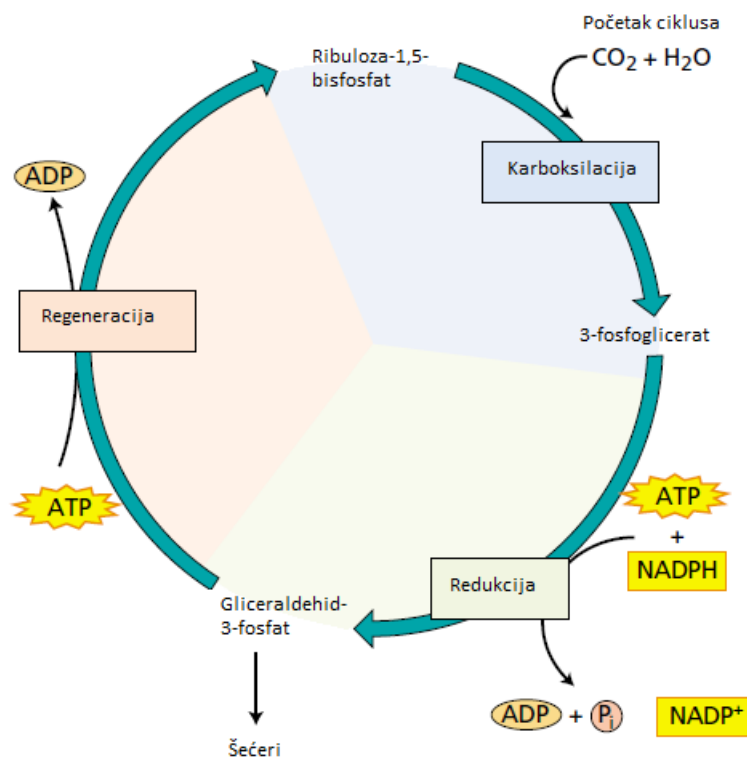
Fotosustavu II pridruženi su proteini zvani antena kompleksi (LHCII). U antena kompleksima su klorofil *a*, klorofil *b* i manji broj karotenoida povezani s proteinom. Karotenoidi i klorofil *b* apsorbiraju svjetlo i predaju ekscitacijsku energiju molekulama klorofila *b* (Taiz i Zeiger 2002). Energija se prenosi pigmentima prema reakcijskom središtu mehanizmom zvanim Försterov prijenos energije u kojem se energija prenosi klasičnim dipol – dipol interakcijama. Višak svjetlosne energije može uzrokovati fotoinhibiciju, pa se on rasipa u procesu poznatom kao nefotokemijsko gašenje (NPQ). Na periferiji LHCII su prisutni karoteniodi violaksantin i zeaksantin koji se nazivaju i ksantofilima, te koji sudjeluju u kružnom procesu poznatom kao ksantofilski ciklus. Ovaj proces je povezan sa NPQ i sudjeluje u zaštiti fotosintetskog aparata od viška svjetlosti (Blankenship 2014).

PQH₂ proizveden u PSII prenosi elektrone do citokrom *b₆f* kompleksa građenog od četiri podjedinice: 2 citokroma *b* – tipa, citokrom *f* i Rieskov Fe – S protein. Citokrom *b₆f* kompleks katalizira reakcije Q ciklusa u kojima se prenose elektroni sa PQH₂ na plastocijanin, protein koji sadrži bakar te se nalazi u lumenu tilakoida. U prvoj polovici Q ciklusa PQH₂ oksidira se u PQ pri čemu se oslobađaju 2 protona u lumen. Jedan se elektron iz te reakcije reducira plastocijanin i prenosi na PSI, a drugi reducira plastokinon u semiplastokinon prilikom čega se uzimaju dva protona iz strome. U drugom dijelu ciklusa je drugi PQH₂ oksidiran pri čemu se jedan elektron prenosi na plastocijanin, a drugi reducira semiplastokinon u PQH₂ uz utrošak 2 protona iz strome. Ukupno se preko citokrom *b₆f* prenesu 4 protona u lumen i 2 elektrona u PSI (Berg i sur. 2002; Taiz i Zeiger 2002).

Zadnji stadij elektronskog transporta kataliziran je u fotosustavu I (PSI). PSI je također građen od dvije podjedinice: *psaA* i *psaB*. Specijalni par molekula klorofila maksimalno apsorbira svjetlost na 700 nm i zove se P700. Ukupna reakcija koju katalizira PSI je redoks reakcija gdje se jedan elektron prenosi sa plastocijanina na feredoksin, topljivi protein koji sadrži dvije Fe – S grupe. Drugi elektron neutralizira pozitivni naboj na P700⁺. Feredoksin se koristi u redukciji NADP⁺ u NADPH koju katalizira feredoksin – NADP⁺ reduktaza. Protoni oslobođeni u lumen prilikom transporta elektrona stvaraju protonski gradijent koji koristi ATP – sintaza za stvaranje ATP-a (Berg i sur. 2002). ATP – sintaza građena je od dva dijela: CF₁ koji sadrži tri kopije α i β te po jednu kopiju γ , δ i ϵ podjedinica i CF₀ koji sadrži četiri podjedinice: I, II, III i IV. Enzim funkcionira kao molekularni motor građen od rotora i statora. Rotor pokreće proton – motorna sila nastala iz protonskog gradijenta, a njegovo okretanje katalizira sintezu molekula ATP-a (Blankenship 2014). Ovakav neciklički transport elektrona poznat je pod nazivom Z – shema (od eng. *zig – zag*) zbog izgleda njegovog energetskeg dijagrama. Osim transportnog

lanca elektrona, moguć je i kružni tok elektrona. U kružnom toku elektrona sudjeluju samo PSI i citokrom *b₆f* kompleks. PSI stvara feredoksin koji prenosi elektrone na citokrom *b₆f* kompleks, a plastocijanin prenosi elektrone na PSI pri čemu nastaje samo ATP, bez stvaranja NADPH (Cooper i Hausman 2010).

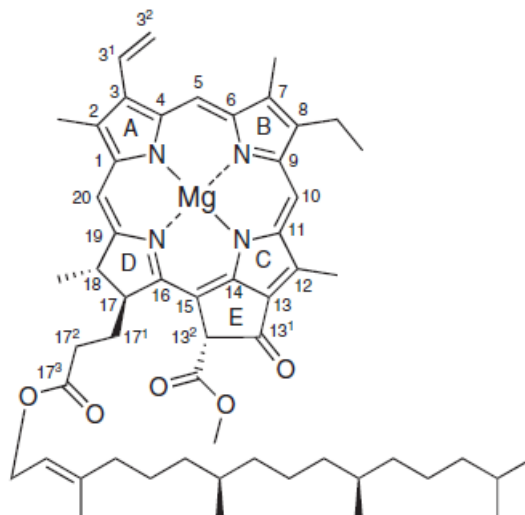
ATP i NADPH nastali u reakcijama na svjetlu koriste se za sintezu šećera redukcijom CO₂ iz zraka u procesu zvanom Calvinov ciklus (Slika 5). Calvinov ciklus sastoji se od tri faze: 1. karboksilacija ribuloza-1,5-bisfosfata, akceptora CO₂, pri čemu nastaju 2 molekule 3-fosfoglicerata; 2. redukcija 3-fosfoglicerata i formiranje gliceraldehid-3-fosfata; 3. regeneracija ribuloza-1,5-bisfosfata iz gliceraldehid-3-fosfata. Prvu reakciju, reakciju CO₂ sa ribuloza-1,5-bisfosfatom katalizira enzim RUBISCO koji čini više od 40 % ukupnih topljivih proteina u listovima (Taiz i Zeiger 2002).



Slika 5. Shematski prikaz faza Calvinova ciklusa (preuzeto i prilagođeno prema Taiz i Zeiger 2002).

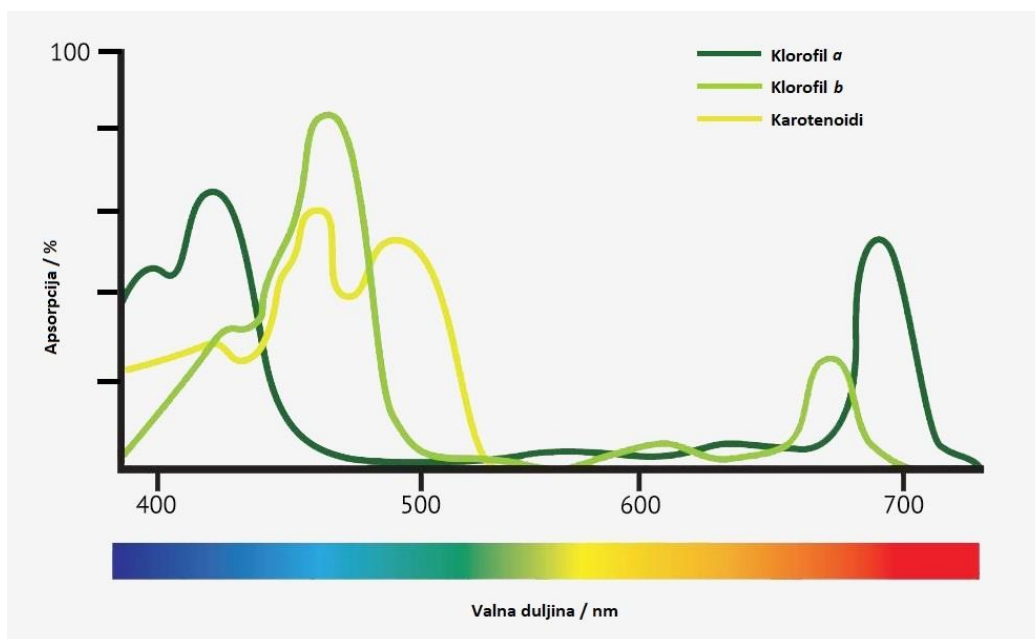
1.2.2. Fotosintetski pigmenti i njihova funkcija

Sposobnost apsorpcije svjetla postoji zahvaljujući pigmentima, među kojima su najznačajniji klorofili. Kod biljaka centralnu ulogu u apsorpciji energije svjetlosti imaju molekule klorofila *a*, čija je strukturna formula prikazana na Slici 6.



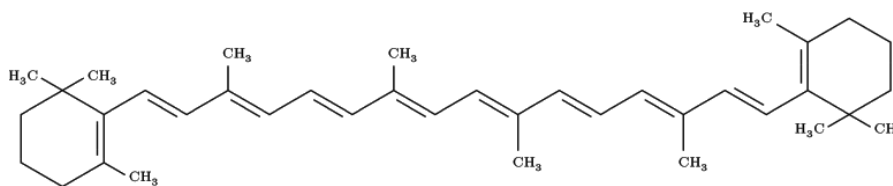
Slika 6. Strukturna formula klorofila *a* i oznake prema IUPAC nomenklaturi (preuzeto i prilagođeno prema Blankenship 2014).

Klorofil *a* je planarna molekula veličine oko 10 Å. Magnezijev atom (Mg^{2+}) koordiniran je u središtu planarnog dijela molekule sa četiri dušikova atoma. Dušikovi atomi dijelovi su četiriju peteročlanih pirolskih prstena (A, B, C, D) pa se klorofili i srodne molekule nazivaju tetrapirolima. Peti prsten (E) nalazi se u donjem desnom kutu molekule. Preko većeg dijela ovih prstenova proteže se delokalizirani π elektronski sustav, iznimka je D prsten, u kojemu je C-17 – C-18 dvostruka veza reducirana na jednostruku. Kroz A i C prstenove prolazi *y* os, kroz B i D prstenove *x* os, a *z* os prolazi okomito na ravninu molekule. Za D prsten esterskom vezom vezan je fitolov rep, nazvan po alkoholnom prekursoru građenom od četiriju izoprenskih jedinica sa 5 C- atoma. Klorofil *b* je slične građe kao i klorofil *a*, ali je na C-7 položaju formilna grupa umjesto metilne. Ovakva struktura daje karakteristična spektroskopska svojstva klorofilima (Blankenship 2014). Klorofili apsorbiraju svjetlost u plavom (~400 – 500 nm) i crvenom (~600 – 700 nm) dijelu spektra (Slika 7). Ovi apsorpcijski maksimumi nazivaju se Soretov maksimum i Q_y maksimum. Pri nešto kraćim valnim duljinama pojavljuje se i slabiji Q_x maksimum. Imena Q_y i Q_x maksimum potječu od naziva osi molekule kroz koje prolaze vektori prijelaznog dipolnog momenta, a oni uvjetuju sposobnost apsorpcije svjetlosti kod molekule klorofila (Walla 2014).



Slika 7. Apsorpcijski spektri klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida (preuzeto i prilagođeno prema Web 4).

Karotenoidi, druga važna skupina fotosintetskih pigmenata, izdužene su molekule sa delokaliziranim π elektronskim sustavom. Na krajevima molekula nalaze se prstenaste strukture (Slika 8), i većina karotenoida sadrži kisik kao dio hidroksilne ili epoksilne skupine. Osnovnu strukturu karotenoida čine izoprenske jedinice od 5 C – atoma, koje su povezane u molekulu sa 40 C – atoma, fitoen. Fitoen sadrži 8 linearno povezanih izoprenskih jedinica. Apsorpcijski maksimum karotenoida je između 400 – 500 nm valne duljine što im daje tipičnu narančastu boju. Uloga karotenoida u fotosintezi je apsorpcija svjetla nakon čega ekscitacijsku energiju predaju klorofilima, relaksacija tripletnih stanja klorofila čime se sprječava stvaranje singletnog kisika koji je visoko reaktivan i štetan, relaksacija pobuđenog singletnog stanja kisika tako što molekula karotenoida nakon pobuđivanja svjetlom uđe u tripletno stanje i regulacija protoka energije u antena kompleksima (Blankenship 2014). Protok i disipacija viška energije regulira se serijom fotoinduciranih reakcija karotenoida poznatih pod nazivom ksantofilski ciklus (Demmig – Adams i Adams 1996).



Slika 8. Strukturna formula β – karotena, tipičnog karotenoida (Web 5).

1.2.3. Fluorescencija klorofila *a*

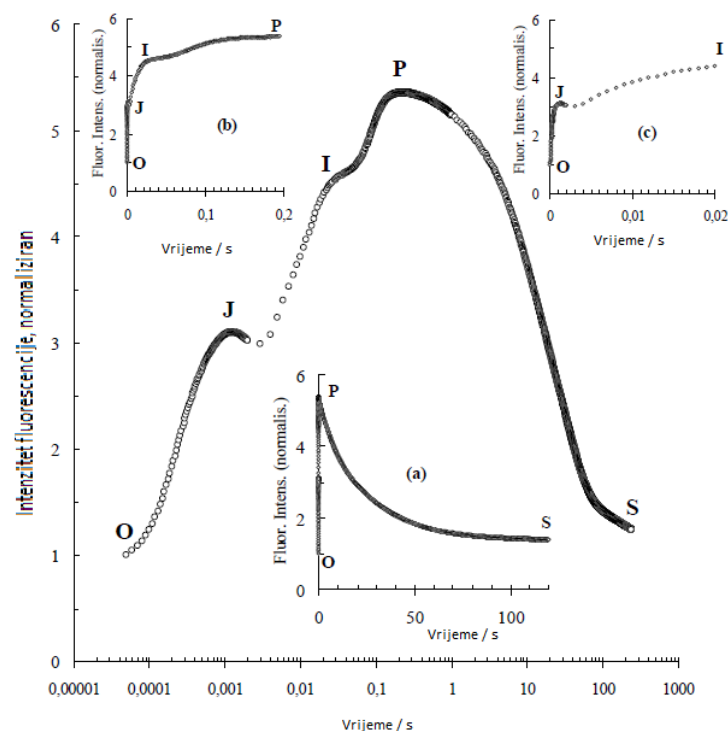
Svjetlost je elektromagnetski val, ali se može opisati i kao serija paketa energije poznatih pod nazivom kvanti. Energija jednog kvanta svjetlosti zvanog foton opisana je izrazom:

$$E = hv$$

gdje je E energija fotona, h je Planckova konstanta ($6,63 \times 10^{-34}$ Js), a v je frekvencija svjetlosti. Apsorpcija svjetlosti je apsorpcija jednog kvanta (fotona), a njegova se energija prenosi na materijal koji ga apsorpira. Molekula klorofila nakon apsorpcije fotona prelazi u pobuđeno stanje. Osnovno stanje klorofila, u kojemu su sve vezujuće molekulske orbitale popunjene parovima elektrona suprotnih spinova, naziva se osnovno singletno stanje (S_0). Kada molekula klorofila postane pobuđena tada elektroni iz vezujuće π orbitale prelaze u nevezujuću π orbitalu, i takvo stanje se naziva pobuđeno singletno stanje (S_1). Ukoliko molekula klorofila apsorpira fotone kraćih valnih duljina (u plavome dijelu spektra) tada ulazi u viša pobuđena singletna stanja (S_2 , S_3 i S_4) koja su vrlo kratkotrajna i relaksiraju procesom unutarnje pretvorbe u S_1 stanje pri čemu se oslobađa toplina (molekularne vibracije). Klorofil u S_1 relaksira se u osnovno stanje pri čemu se emitira foton procesom poznatim kao fluorescencija. S_1 stanje može se relaksirati i u tripletno stanje (T_1) u kojemu dva nesparena elektrona okupiraju dvije najviše molekulske orbitale. Molekule u tripletnom stanju obično su slabo reaktivne, ali se tripletni klorofil može relaksirati u reakciji sa O_2 , koji je u osnovnom stanju triplet, pri čemu nastaje visokoreaktivan singletni kisik (Harbinson i Rosenquist 2003).

Foton emitiran fluorescencijom nešto je dulje valne duljine od apsorbiranog fotona jer se nakon pobuđivanja događa brza vibracijska relaksacija molekule u S_1 stanju nakon čega se emitira foton i molekula prelazi u S_0 , a zatim se događa vibracijska relaksacija u S_0 stanju. Rezultat toga je gubitak dijela energije u obliku topline prilikom vibracijskih relaksacija (Walla 2014). U biljkama se fluorescencija klorofila *a* događa uglavnom u fotosustavu II, u dijelu spektra od 680 – 740. Na taj način se mogu dobiti informacije o protoku ekscitacijske energije u fotosustavu II (Strasser i sur. 2004). Energija apsorbirana molekulama klorofila može se osloboditi na tri načina: može se iskoristiti za pokretanje fotosinteze (fotokemija), višak energije može se rasipati u obliku topline i može se emitirati (fluorescencija). Ta se tri procesa međusobno nadmeću pa je povećanje vrijednosti jednog procesa povezano sa smanjenjem vrijednosti ostalih dvaju procesa. Na taj se način mogu dobiti informacije o učinkovitosti fotokemije i iznosu energije koja je rasipana kao toplina. Iako je ukupni iznos fluorescencije vrlo malen (samo 1 do 2 % od ukupne energije dobivene apsorpcijom svjetla), mjerenje

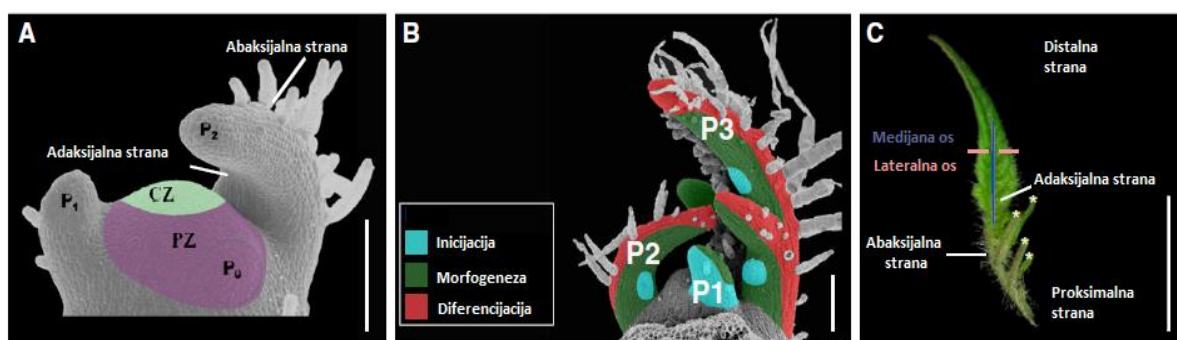
njezinog iznosa relativno je lagano jer se fluorescencijski spektar razlikuje od apsorpcijskog. Iznos fluorescencije se mjeri izlaganjem lista svjetlu sa definiranom valnom duljinom (Maxwell i Johnson 2000). Osnovni princip kojim se mjeri fluorescencija je osvjetljavanje uzorka koji je neko vrijeme proveo u tami. Fluorescencija klorofila *a* pokazuje promjenu u njezinom intenzitetu koja se naziva Kautskyjev efekt. Na krivulji kojom su prikazane vrijednosti fluorescencije vidljive su dvije faze: brza faza rasta intenziteta unutar vremena od sekunde i spora faza pada intenziteta koja traje nekoliko minuta. Brza faza naziva se OJIP prema oznakama na krivulji: O označava minimalnu vrijednost intenziteta fluorescencije, J i I su točke pregiba, a P je točka maksimalnog intenziteta. Primarni akceptori elektrona u PSII (Q_A) su u oksidiranom stanju (reakcijski centri su otvoreni) nakon držanja uzorka u tami. Svjetlost inducira redukciju Q_A i rast intenziteta fluorescencije sve do maksimuma kada su svi Q_A reducirani (reakcijski centri su zavoreni) (Stirbet i Govindjee 2011). Mjerenjem fluorescencije klorofila *a* dobivaju se informacije o stanju fotosustava II što omogućuje određivanje ukupne učinkovitosti fotosinteze i utjecaj brojnih čimbenika na proces fotosinteze (Maxwell i Johnson 2000).



Slika 9. Krivulja Kautskyjevog efekta prikazana na logaritamskoj skali. Manji grafikoni prikazuju krivulju istog fenomena na drugačijim vremenskim skalama (Strasser i sur. 2004).

1.3. Razvoj listova

Listovi se razvijaju iz apikalnog meristema koji ima različite funkcionalne regije: središnja zona sa pluripotentnim stanicama i periferna zona iz koje se razvijaju primordiji bočnih organa. Razvoj listova ima tri faze: inicijacija, morfogeneza i diferencijacija (Slika 10). Primordiji listova zameću se na bočnim stranama apikalnog meristema u procesu koji uključuje determinaciju nekoliko osi simetrija: proksimalno – distalnu, adaksijalnu – abaksijalnu i medio – lateralnu. Ova faza razvoja listova naziva se inicijacijom. U idućoj fazi, primarnoj morfogenezi, lamina se proširuje i pojavljuje se osnovni oblik lista. Tijekom faze diferencijacije list raste i njegove stanice podilaze diferencijaciji. Ova faza naziva se i sekundarna morfogeneza. Tijekom razvoja listova diferenciraju se različiti slojevi lista, vaskulatura i specijalizirane epidermalne stanice poput trihoma i stanica puči. Tijekom morfogeneze i diferencijacije oblikuju se i rubovi lista (Bar i Ori 2014).

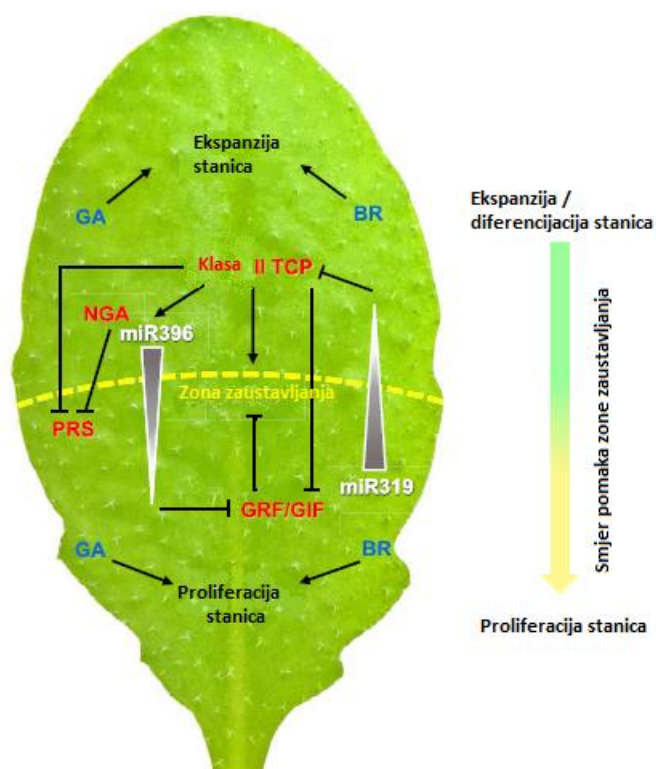


Slika 10. Stadiji razvoja listova. (A) Slika apikalnog meristema rajčice dobivena skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) na kojoj su prikazane središnja zona (CZ) i periferna zona u kojoj se zameću primordiji bočnih organa (P1, P2 i P3). Abaksijalna i adaksijalna strana prikazane su na P2 primordiju lista. (B) Shematski prikaz stadija razvoja lista prikazanih na SEM fotografiji. (C) Osi simetrije prikazane su na novo izraslom listu rajčice, zvjezdice prikazuju liske (preuzeto i prilagođeno prema Bar i Ori 2014).

Pluripotentnost stanica apikalnog meristema karakterizirana je ekspresijom klase I *KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN* (*KNOX*) gena. *KNOX* transkripcijski faktori reguliraju dva biljna hormona: giberelin (GA) i citokinin. GA potiče elongaciju i diferencijaciju stanica dok citokinin potiče proliferaciju stanica apikalnog meristema. Visok omjer citokinina u odnosu na GA je važan za održavanje apikalnog meristema u nediferenciranom stanju. *KNOX* proteini izravno smanjuju sintezu GA, a povećavaju sintezu citokinina. To dovodi do niskog omjera citokinina u odnosu na GA čime započinje diferencijacija stanica. Regulacija ekspresije *KNOX*

gena povezana je s polarnim transportom auksina i ostalim transkripcijskim faktorima koji čine složenu mrežu regulacije inicijacije lista. List tijekom razvoja postaje asimetričan oko osi simetrija navedenih ranije u tekstu. Polarizacija duž tih osi dovodi do asimetrične raspodjele tipova stanica u odraslom listu koji je ključan za normalno funkcioniranje biljke. Adaksijalna strana lista sadrži stanice specijalizirane za prikupljanje svjetla, dok abaksijalna strana sadrži stanice uključene u izmjenu plinova kako bi učinkovitost fotosinteze bila maksimalna. Adaksijalno – aksijalnu polarizaciju kontrolira antagonističko djelovanje klase III HOMEODOMAIN LEUCINE ZIPPER (HD-ZIPIII) proteina koji se eksprimiraju na adaksijalnoj strani lista i KANADI (KAN) proteina koji su karakteristični za abaksijalnu stranu lista. U regulaciju adaksijalno – abaksijalne polarizacije uključeni su i drugi proteini, među kojima su i regulatori *KNOX* gena. *KNOX* geni važni su i u regulaciji rasta lista duž proksimalno – distalne osi lista (Moon i Hake 2011).

Nakon inicijacije lista dolazi do proliferacije i diferencijacije stanica u svim regijama lisne plojke, a taj proces se naziva interkalarnim rastom. Promjena stanica iz proliferirajućih u diferencirajuće događa se duž bazipetalnog gradijenta. Dvije klase modula miRNA / transkripcijski faktor imaju dominantnu i antagonističku ulogu u održavanju aktivnosti blastozona i interkalarnog rasta. Proces je potaknut miR319-*TCP* modulima koji smanjuju aktivnost marginalnog meristema i potiču promjenu proliferirajućih stanica u one koje se diferenciraju. Proces se utišava miR396-*GRF* modulima koji odgađaju prijelaz iz proliferacije u diferencijaciju stanica. Domene ekspresija *TCP* i *GRF* komplementarne su sa gradijentima miR319, odnosno miR396. *TCP* aktiviraju miR396 i time formiraju mehanizam povratne sprege koji uzrokuje pomicanje fronte zaustavljanja staničnog ciklusa. *PR5* i *WOX1* uzrokuju proliferaciju stanica u marginalnoj zoni lista. *TCP* i *NGA* utišavaju aktivnost blastozone lista na rubovima. Giberlini i brasinosteroidi potiču staničnu proliferaciju i ekspanziju tijekom interkalarnog rasta lista (Slika 11).



Slika 11. Regulacija marginalnog i interkalarnog rasta lista. Crvenom bojom prikazani su geni, plavom bojom biljni hormoni, a bijelom male RNA. Kratice: BR, brasinosteroidi; GA, giberelini; GIF, GRF-interakcijski faktor; GRF, faktor regulacije rasta; mi396, microRNA 396; miR319, microRNA 319; NGA, NGATHA; PRS, PRESSED FLOWER; TCP, TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PROLIFERATING CELL FACTOR (preuzeto i prilagođeno prema Du i sur. 2018).

Prijelaz stanica iz proliferacije u diferencijaciju događa se postupno i mnoge stanice istovremeno proliferiraju i povećavaju volumen. Tijekom tog se razdoblja povećava ekspresija gena koji kontroliraju stanični ciklus i procese fotosinteze. Razvoj fotosintetskog aparata bi stoga mogao biti povezan sa rastom volumena stanice. Ekspanzija stanica predstavlja brži i jednostavniji način kontrole veličine i biomase lista od stanične proliferacije (Du i sur. 2018).

1.4. Cilj rada

Ciljevi ovog rada bili su:

- istražiti dinamiku razvoja fotosintetskog aparata tijekom ontogeneze listova duhana određivanjem koncentracija fotosintetskih pigmenata ključnih za apsorpciju svjetlosti (Chl *a*, Chl *b*) i mjerenjem fluorescencije klorofila *a* u svrhu procjene funkcionalnosti fotosintetskog aparata,
- utvrditi dolazi li do promjene u učinkovitosti fotosustava II (PSII) tijekom razvoja listova analizirajući parametre OJIP testa,
- utvrditi dolazi li (i u kojem trenutku) do promjene u koncentraciji ključnih fotosintetskih pigmenata (Chl *a*, Chl *b*) u listovima tijekom razvoja,
- upotpuniti dosadašnje spoznaje o razvoju ove gospodarski značajne vrste.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Opis eksperimenta

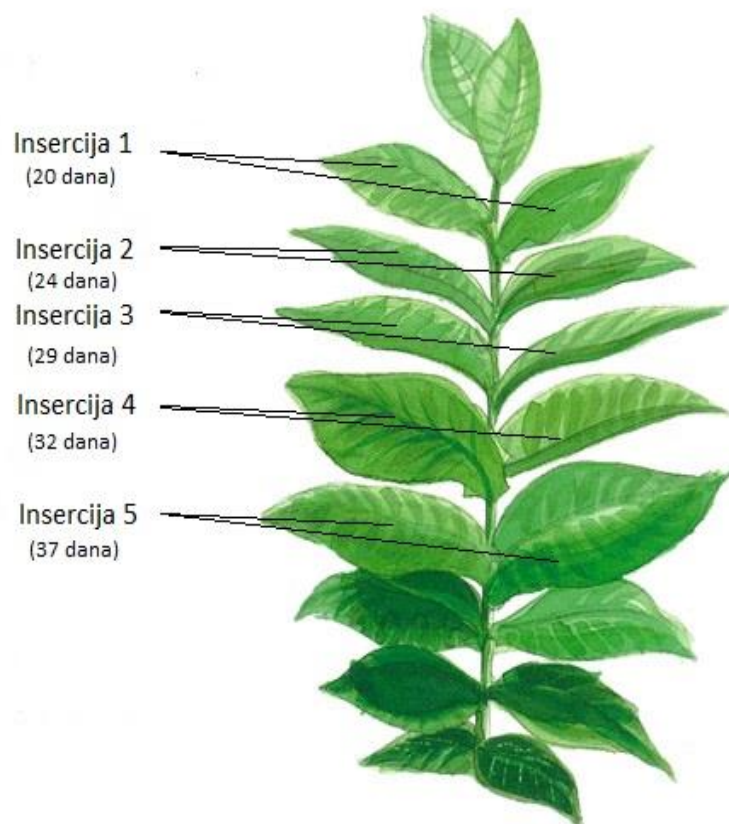
U ovome radu korišten je biljni materijal duhana (*Nicotiana tabacum* L.) sorte Virginija DH27, proizvođač Hrvatski duhani d.d. Presadnice duhana bile su stare oko tri tjedna, s dva para listova, parom kotiledona i parom pravih listova. Biljke su bile nasađene na tresetni supstrat u stiropornim kutijama te su stavljene na hidroponski uzgoj. Hranjiva otopina u hidroponu pripravljena je prema normativu gnojidbe za duhan Hrvatskih duhana. Prvotna otopina pripravljena je tako da je u vodu dodano NPK gnojivo u omjeru N:P:K= (150:75:150) gm^{-3} . Kasnije je dodana prihrana anorganskim dušikom u koncentraciji od 150 gm^{-3} . Hidropon se nalazio u plasteničkim uvjetima s prirodnim osvjetljenjem, dnevna temperatura zraka iznosila je oko 21 °C, a relativna vlažnost zraka oko 40 %.

Kada su biljke dovoljno izrasle, presađene su u stiroporne kutije s većim otvorima. Tijekom rasta biljaka praćeno je vrijeme pojave parova listova u danima. Prve analize napravljene su na 10 presadnica, na parovima listova starim 14 dana (Slika 12). Presadnice su donesene u laboratorij u prijenosnom hladnjaku.



Slika 12. Presadnice duhana (*N. tabacum*) na kojima su rađene prve analize (fotografirao: Ivan Vlašiček).

Nakon prvih analiza presadnice su vraćene na hidropon. Kasnije je ovih 10 biljaka presađeno u tlo na otvorenom kako bi rasle sve do pojave prvih cvjetnih pupova. Tijekom cijelog razdoblja praćeno je vrijeme pojave novih listova u danima. Kako su se novi listovi pojavljivali u parovima jednake starosti, biljke su podijeljene u pet insercija, odnosno parova listova (Slika 13). Brojevima od 1 do 5 označene su insercije, počevši s najmlađim listovima, starosti 20, 24, 29, 32 i 37 dana. U tim je listovima *in vivo* određena fotosintetska učinkovitost mjerenjem fluorescencije klorofila *a*. Isti listovi nasumično su uzorkovani i preneseni u laboratorij u prijenosnom hladnjaku kako bi se izmjerila koncentracija fotosintetskih pigmentata i udio suhe tvari (Slika 14).



Slika 13. Podjela biljke u pet insercija, parova listova jednake starosti i njihova starost u danima (prilagođeno prema Web 6).



Slika 14. Biljke na kojima je mjerena fluorescencija klorofila *a* i s kojih su uzorkovani listovi za daljnje analize (fotografirao: Ivan Vlašiček).

2.2. Mjerenje fluorescencije klorofila *a*

Fotosintetska učinkovitost određena je *in vivo* pomoću Handy PEA fluorometra (Hansatech, VB). Prije mjerenja listovi su bili u uvjetima tame 30 minuta kako bi se otvorila reakcijska središta. Na listovima presadnica, kao i na svakoj inserciji, napravljeno je po 10 mjerenja, a svako mjerenje je napravljeno na drugom listu. Listovi su iz svake insercije odabrani nasumično, a dio lista na kojemu je rađeno mjerenje nalazi se na otprilike jednoj trećini udaljenosti između baze i vrha lista (Slika 15). Mjerenje se vrši tako da uređaj stvara puls crvene saturacijske svjetlosti s maksimumom apsorpcije na 650 nm, intenziteta $3000 \mu\text{mol}_{\text{FOTONAM}}^{-2}\text{s}^{-1}$ koja potiče polifazni rast fluorescencije klorofila. Promjene u intenzitetu fluorescencije bilježe se tijekom vremena od 1 s, a bilježenje počinje nakon prvih 50 μs . Promjene tijekom prvih 2 ms bilježe se svakih 10 μs , a nakon toga svake milisekunde sve do pune sekunde. Budući da se reakcijska središta nakon prilagodbe u tami otvore, nakon 50 μs mjeri se minimalni intenzitet fluorescencije (F_0). Puls svjetlosti potiče zatvaranje reakcijskih središta i polifazni rast vrijednosti fluorescencije pa se nakon 50 μs bilježi inicijalni stupanj

(O), J stupanj (nakon 2 ms), I stupanj (nakon 30 ms) i P stupanj na kojemu se izmjeri maksimalna vrijednost fluorescencije (F_m). Ovim načinom se dobivaju podaci za izračunavanje parametara OJIP testa (Strasser i sur. 2004) navedeni u Tablici 1.



Slika 15. Položaj kvačica za prihvaćanje senzorne jedinice Handy PEA na listovima (fotografirao: Ivan Vlašiček).

Tablica 1. Podaci dobiveni mjerenjem polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* za izračunavanje i parametri OJIP testa

F_0	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	$F_v = F_m - F_0$
t_{max}	vrijeme potrebno da se postigne F_m	
V_J	varijabilna fluorescencija na J stupnju	$V_J = (F_J - F_0) / (F_m - F_0)$
V_I	varijabilna fluorescencija na I stupnju	$V_I = (F_I - F_0) / (F_m - F_0)$
S_m	normalizirana komplementarna površina iznad OJIP krivulje	$AREA / (F_m - F_0)$
M_0	ukupna brzina zatvaranja RC	$(TR_0/RC) - (ET_0/RC) = 4(F_{300\mu s} - F_0) / (F_m - F_0)$
N	prometni broj	$S_m \times [(dV/dt)_0] V_J$
TR_0/ABS	maksimalni kvantni prinos fotosustava II	$[1 - (F_0/F_m)] = F_v/F_m$
PI_{ABS}	indeks fotosintetske učinkovitosti	$(RC/ABS) \times (TR_0/DI_0) \times [ET_0 / (TR_0 - ET_0)]$
RC/CS_0	gustoća aktivnih reakcijskih središta	$F_v/F_m \times (V_J/M_0) \times ABS/CS_0$
ABS/RC	apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu	$M_0 \times (1/V_J) \times [1 / (F_v/F_m)]$

TR₀/RC	hvatanje ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu	$M_0 \times (1/V_j)$
DI₀/RC	disipacija po aktivnom reakcijskom središtu	$(ABS/RC) - (TR_0/RC)$
ET₀/RC	elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu	$M \times (1/V_j) \times (1-V_j)$

2.3. Mjerenje koncentracije fotosintetskih pigmenata

Za mjerenje koncentracije fotosintetskih pigmenata odabran je dio lista koji odgovara onom dijelu na kojemu je mjerena fotosintetska učinkovitost. Taj je dio lista izrezan u porculanski tarionik i usitnjen korištenjem tekućeg dušika do sitnog praha. Prije usitnjavanja dodan je magnezijev hidroksid karbonat. Oko 0,1 g odvagano usitnjenog tkiva dodano je u prethodno izvaganu plastičnu tubicu, pa je izračunata točna masa svježeg tkiva. U plastičnu tubicu dodan je 1 ml hladnog acetona. Ekstrakcija pigmenata je vršena 15 minuta na ledu, a nakon toga je homogenat promiješan na vrtložnoj mješalici i centrifugiran pri 15 000 g na 4 °C. Supernatant je prebačen u plastičnu epruvetu sa čepom na navoj od 12 ml. Reekstrakcija je ponavljana tri ili četiri puta, do obezbojenja taloga. Prilikom zadnje reekstrakcije homogenat je centrifugiran pri 18 000 g. Supernatanti dobiveni ekstrakcijama su spojeni i po potrebi razrijeđeni do volumena od 5 ml. Apsorbancije ekstrakta izmjerene su spektrometrom Specord 40, Analytic Jena na 661,6, 644,8 i 470 nm i acetonom kao slijepom probom. Za izračun koncentracija klorofila *a* (Chl *a*), klorofila *b* (Chl *b*), ukupnih klorofila (Chl *a+b*) i karotenoida (Car) korišteni su ekstinkcijski faktori prema Lichtenthaleru (1987):

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

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

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

$$\text{Car} = [103 \times A_{470} - 1,9 \times (11,24 \times A_{661,6} - 2,04 \times A_{644,8}) - 63,14 \times (20,13 \times A_{644,8} - 4,19 \times A_{661,6})] \times V / 214 \times m \times 10^3$$

gdje je:

V = ukupni volumen ekstrakta fotosintetskih pigmenata u mL

m = masa uzorka u gramima.

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

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

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

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

2.4. Izračun udjela suhe tvari

Za izračun suhe tvari biljno tkivo je usitnjeno u tarioniku korištenjem tekućeg dušika. Usitnjeno tkivo dodano je u prethodno izvaganu tubicu od 2 ml. Otvorene tubice stavljene su u sušionik na sušenje tijekom 24 h na 105 °C. Nakon sušenja tubice su zatvorene i ostavljene da se ohlade te su izvagane. Udio suhe tvari izražen kao % svježe tvari izračunat je iz izraza:

udio suhe tvari (%) = (masa suhe tvari / masa svježe tvari) x 100.

2.5. Statistička obrada podataka

Podaci o fotosintetskim parametrima, koncentracijama fotosintetskih pigmenata i udjelu suhe tvari statistički su analizirani u programskom paketu STATISTICA, verzija 13.4.0.14 StatSoft Inc. Razlike između srednjih vrijednosti fotosintetskih parametara, koncentracija fotosintetskih pigmenata, udjela suhe tvari pojedinih insercija i listova presadnica utvrđene su jednosmjernom analizom varijance (*One-way ANOVA*). Statistička značajnost razlika utvrđena je primjenom Fisher LSD (*Least Significant Difference*) testa. Statistički značajno različite skupine označene su različitim malim slovima, dok ista slova znače da razlike između skupina ne postoje. Statistička značajnost je utvrđena kada je $p < 0,05$.

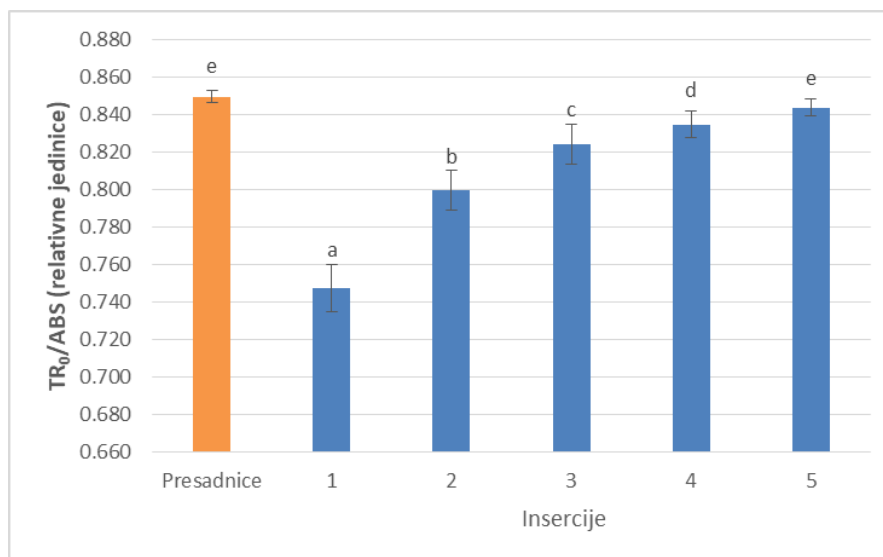
3. REZULTATI

3.1. Parametri fluorescencije klorofila *a*

Fluorescencija klorofila *a* izmjerena je u listovima presadnica duhana starim 14 dana te u sljedećih pet insercija odnosno parova listova različite starosti: 20, 24, 29, 32 i 37 dana (na grafičkom prikazu označeno brojevima od 1 do 5). U svim razvojnim stadijima listova fluorescencija je mjerena u 10 ponavljanja.

3.1.1. Maksimalni kvantni prinos PSII (TR_0/ABS)

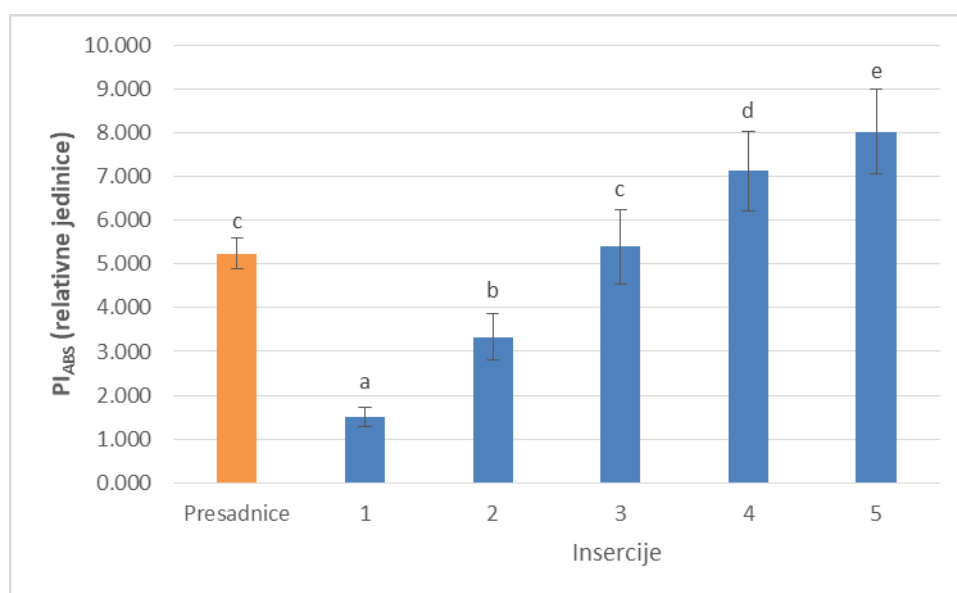
Srednje vrijednosti maksimalnog kvantnog prinosa (TR_0/ABS), izražene u relativnim jedinicama, prikazane su na Slici 16. Najviša vrijednost zabilježena je u listovima presadnica i iznosila je 0,850. Najniža vrijednost izmjerena je u najmlađim listovima (insercija 1), a iznosila je 0,747. Vrijednosti parametra TR_0/ABS rasle su s obzirom na starost listova (insercija 2 - 0,800, insercija 3 - 0,824, insercija 4 - 0,835, insercija 5 - 0,844). Statistički značajna razlika utvrđena je između vrijednosti svih skupina, osim između vrijednosti presadnica i insercije 5.



Slika 16. Srednje vrijednosti i standardne devijacije maksimalnog kvantnog prinosa PSII (TR_0/ABS) u listovima presadnica i insercijama različite starosti (najmlađi listovi – 1, najstariji listovi – 5). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti (ANOVA, LSD test, $p < 0,05$).

3.1.2. Indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS})

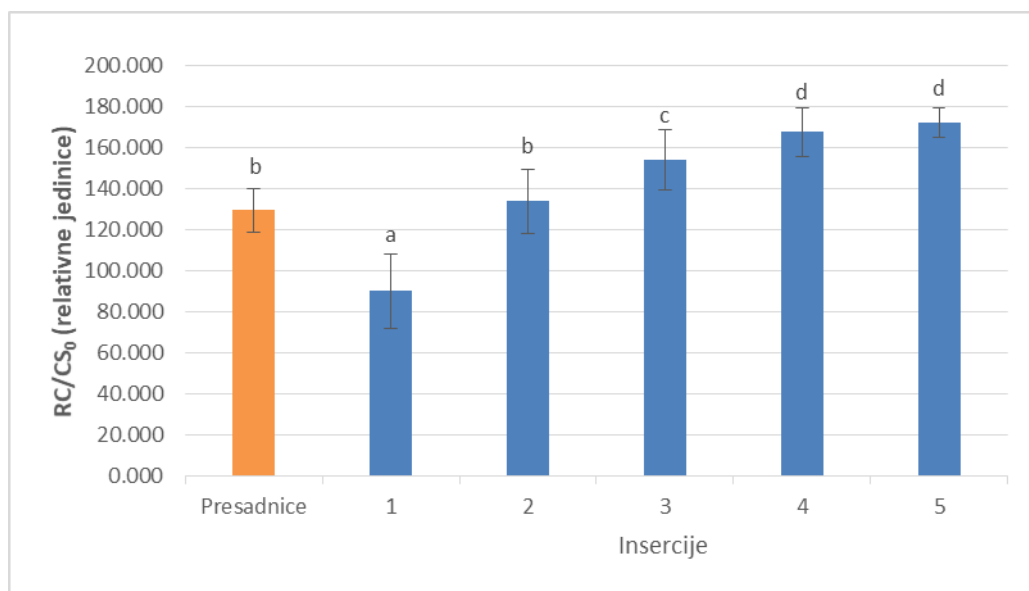
Srednje vrijednosti indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) u listovima duhana, izražene u relativnim jedinicama, prikazane su na Slici 17. Vrijednost parametra PI_{ABS} u listovima presadnica iznosila je 5,235. Najniža vrijednost zabilježena je u najmlađim listovima (insercija 1) i iznosila je 1,503. U ostalim insercijama su vrijednosti parametra PI_{ABS} rasle s obzirom na starost listova (insercija 2 - 3,329, insercija 3 - 5,391, insercija 4 - 7,119). Najviša vrijednost parametra PI_{ABS} zabilježena je u inserciji 5 i iznosila je 8,020. Statistički značajna razlika utvrđena je između srednjih vrijednosti svih skupina, osim između vrijednosti presadnica i insercije 3.



Slika 17. Srednje vrijednosti i standardne devijacije indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) u listovima presadnica i insercijama različite starosti (najmlađi listovi – 1, najstariji listovi – 5). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti (ANOVA, LSD test, $p < 0,05$).

3.1.3. Gustoća aktivnih reakcijskih središta (RC/CS₀)

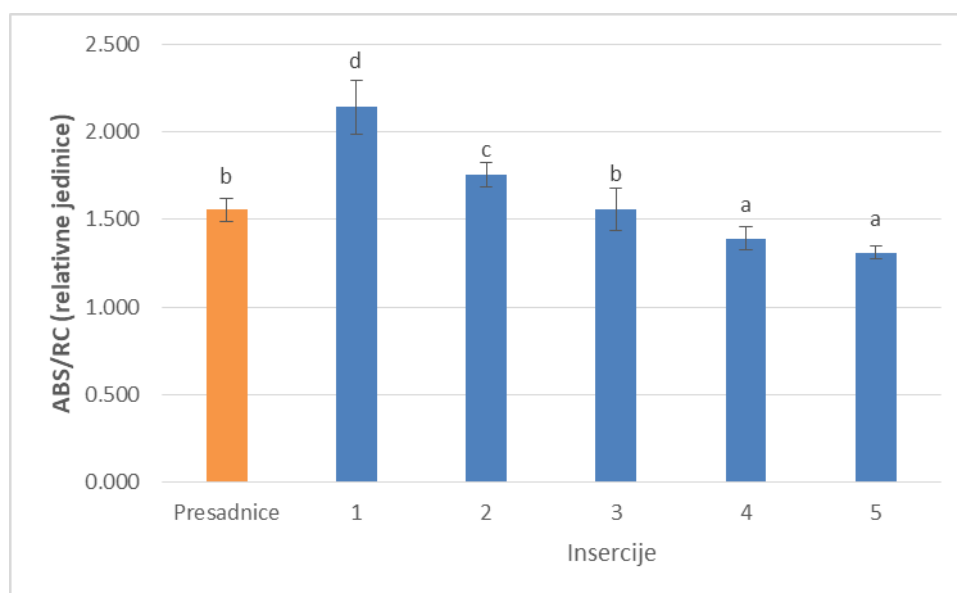
Srednje vrijednosti gustoće aktivnih reakcijskih središta (RC/CS₀), izražene u relativnim jedinicama, prikazane su na Slici 18. U listovima presadnica vrijednost parametra RC/CS₀ iznosila je 129,647. Najniža vrijednost (90,185) zabilježena je u najmlađim listovima (insercija 1). U ostalim su insercijama vrijednosti RC/CS₀ rasle s obzirom na starost listova (insercija 2 - 134,011, insercija 3 - 154,460, insercija 4 - 167,845, insercija 5 - 172,484). Između srednjih vrijednosti insercija 4 i 5 nije utvrđena statistički značajna razlika. Statistički značajna razlika također nije utvrđena niti između srednjih vrijednosti presadnica i insercije 2.



Slika 18. Srednje vrijednosti i standardne devijacije gustoće aktivnih reakcijskih središta (RC/CS₀) u listovima presadnica i insercijama različite starosti (najmlađi listovi – 1, najstariji listovi – 5). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti (ANOVA, LSD test, p<0,05).

3.1.4. Apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu (ABS/RC)

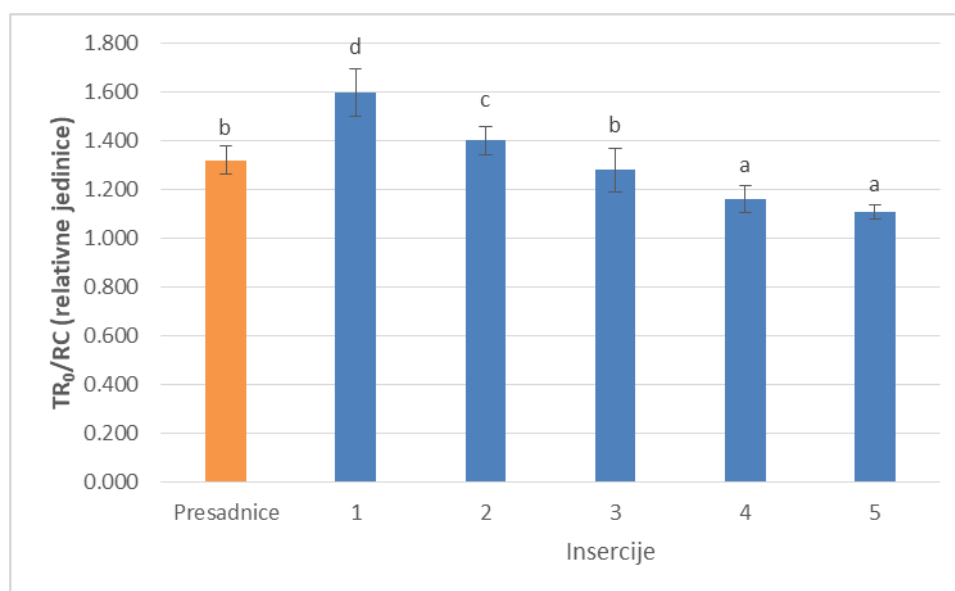
Srednje vrijednosti apsorpcije po aktivnom reakcijskom središtu (ABS/RC), izražene u relativnim jedinicama, prikazane su na Slici 19. U listovima presadnica vrijednost parametra ABS/RC iznosila je 1,554. Najviša vrijednost ABS/RC zabilježena je u najmlađim listovima insercije 1 (2,140), a dalje se smanjivala s obzirom na starost listova (insercija 2 - 1,753, insercija 3 - 1,556, insercija 4 - 1,391, insercija 5 - 1,311), pri čemu nije utvrđena statistički značajna razlika između insercija 4 i 5. Statistički značajna razlika nije utvrđena niti između srednjih vrijednosti presadnica i insercije 3.



Slika 19. Srednje vrijednosti i standardne devijacije apsorpcije po aktivnom reakcijskom središtu (ABS/RC) u listovima presadnica i insercijama različite starosti (najmlađi listovi – 1, najstariji listovi – 5). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti (ANOVA, LSD test, $p < 0,05$).

3.1.5. Hvatanje ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu (TR_0/RC)

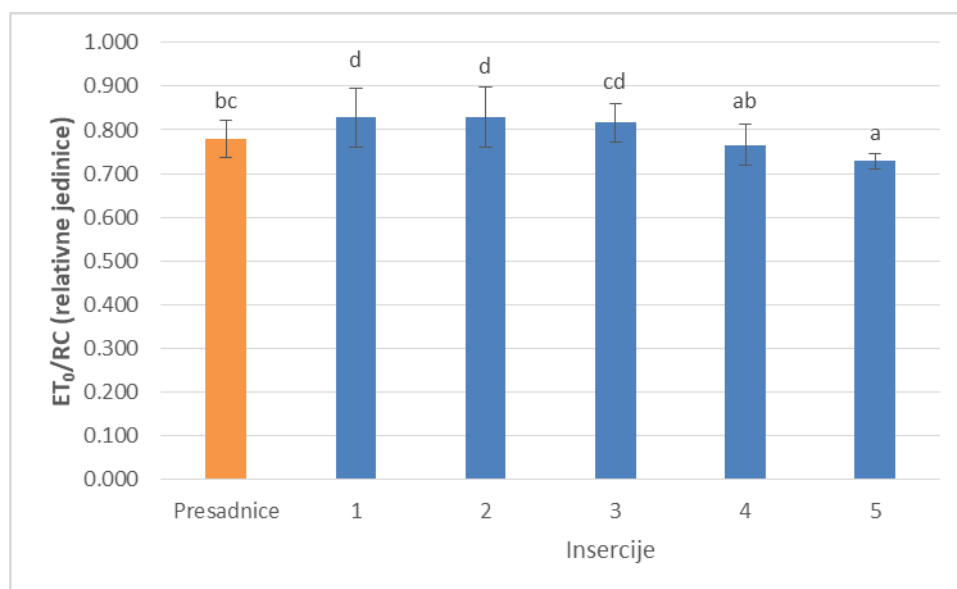
Srednje vrijednosti hvatanja ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu (TR_0/RC), izražene u relativnim jedinicama, prikazane su na Slici 20. U listovima presadnica vrijednost TR_0/RC iznosila je 1,320. Najviša vrijednost parametra TR_0/RC zabilježena je u najmlađim listovima insercije 1 (1,598), a dalje se smanjivala s obzirom na starost listova (insercija 2 - 1,402, insercija 3 - 1,281, insercija 4 - 1,161, insercija 5 - 1,106), pri čemu nije utvrđena statistički značajna razlika između insercija 4 i 5. Statistički značajna razlika također nije utvrđena niti između srednjih vrijednosti presadnica i insercije 3.



Slika 20. Srednje vrijednosti i standardne devijacije hvatanja ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu (TR_0/RC) u listovima presadnica i insercijama različite starosti (najmlađi listovi – 1, najstariji listovi – 5). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti (ANOVA, LSD test, $p < 0,05$).

3.1.6. Transport elektrona po aktivnom reakcijskom središtu (ET_0/RC)

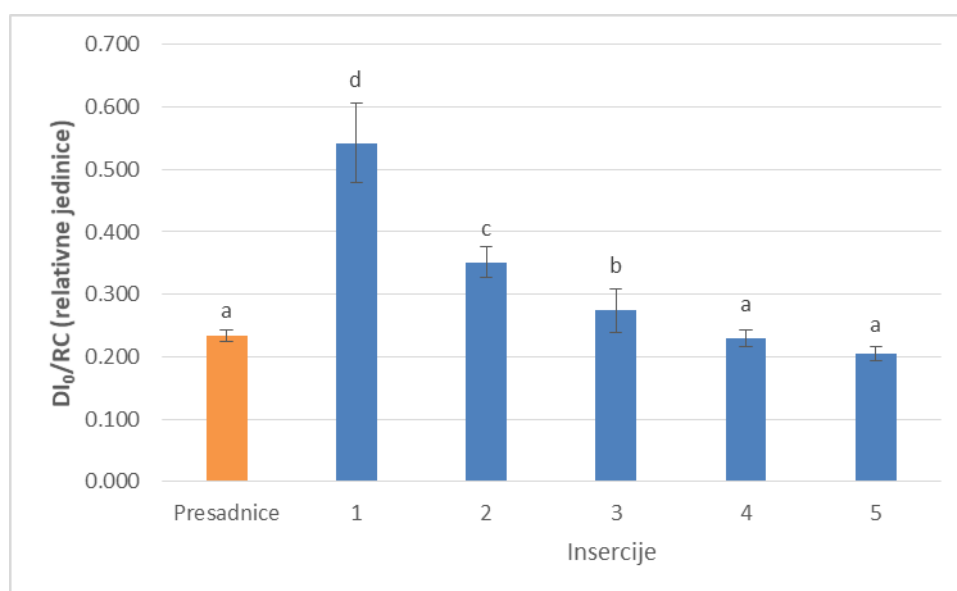
Srednje vrijednosti elektronskog transporta po aktivnom reakcijskom središtu (ET_0/RC), izražene su u relativnim jedinicama, prikazane su na Slici 21. U listovima presadnica vrijednost parametra ET_0/RC iznosila je 0,779. Nije utvrđena statistički značajna razlika između vrijednosti ET_0/RC insercije 1 (0,828), insercije 2 (0,828) i insercije 3 (0,816), koje su bile značajno više u odnosu na presadnice. Srednje vrijednosti zabilježene u insercijama 4 (0,766) i 5 (0,729) značajno su bile niže od ostalih insercija ali se nisu međusobno razlikovale. Srednje vrijednosti zabilježene u presadnicama nisu se značajno razlikovale od vrijednosti zabilježenih u insercijama 3 i 4.



Slika 21. Srednje vrijednosti i standardne devijacije elektronskog transporta po aktivnom reakcijskom središtu (ET_0/RC) u listovima presadnica i insercijama različite starosti (najmlađi listovi – 1, najstariji listovi – 5). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti (ANOVA, LSD test, $p < 0,05$).

3.1.7. Disipacija po aktivnom reakcijskom središtu (DI_0/RC)

Srednje vrijednosti disipacije po aktivnom reakcijskom središtu (DI_0/RC), izražene u relativnim jedinicama, prikazane su na Slici 22. U listovima presadnica vrijednost DI_0/RC iznosila je 0,234. Najviša vrijednost parametra DI_0/RC zabilježena je u najmlađim listovima insercije 1 (0,542), a dalje se smanjivala s obzirom na starost listova (insercija 2 - 0,351, insercija 3 - 0,274, insercija 4 - 0,230, insercija 5 - 0,205), pri čemu nije utvrđena statistički značajna razlika između insercija 4 i 5. Srednja vrijednost zabilježena u presadnicama značajno je bila niža od vrijednosti zabilježenih u insercijama 1, 2 i 3, ali se nije značajno razlikovala od insercija 4 i 5.



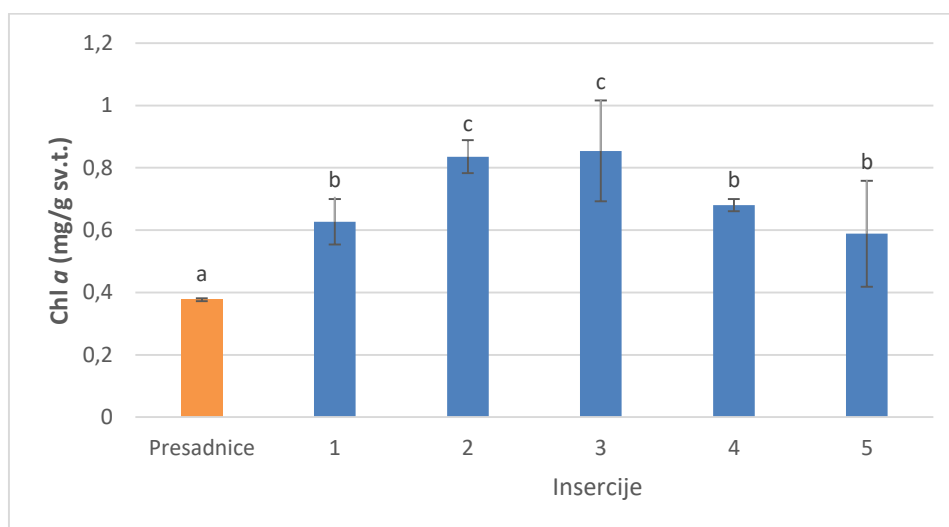
Slika 22. Srednje vrijednosti i standardne devijacije disipacije po aktivnom reakcijskom središtu (DI_0/RC) u listovima presadnica i insercijama različite starosti (najmlađi listovi – 1, najstariji listovi – 5). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti (ANOVA, LSD test, $p < 0,05$).

3.2. Koncentracija fotosintetskih pigmenata

Koncentracija klorofila *a* (Chl *a*), klorofila *b* (Chl *b*), ukupnih klorofila (Chl *a+b*) i karotenoida (Car) izmjerena je u ekstraktima listova presadnica duhana starih 14 dana te u ekstraktima sljedećih pet insercija odnosno parova listova različite starosti: 20, 24, 29, 32 i 37 dana (na grafičkom prikazu označeno brojevima od 1 do 5). Iz dobivenih koncentracija izračunat je međusobni omjer klorofila *a* i *b* (Chl *a/b*) i omjer ukupnih klorofila i karotenoida (Chl *a+b/Car*). U svim razvojnim stadijima listova koncentracija fotosintetskih pigmenata je mjerena u 5 ponavljanja.

3.2.1. Koncentracija klorofila *a*

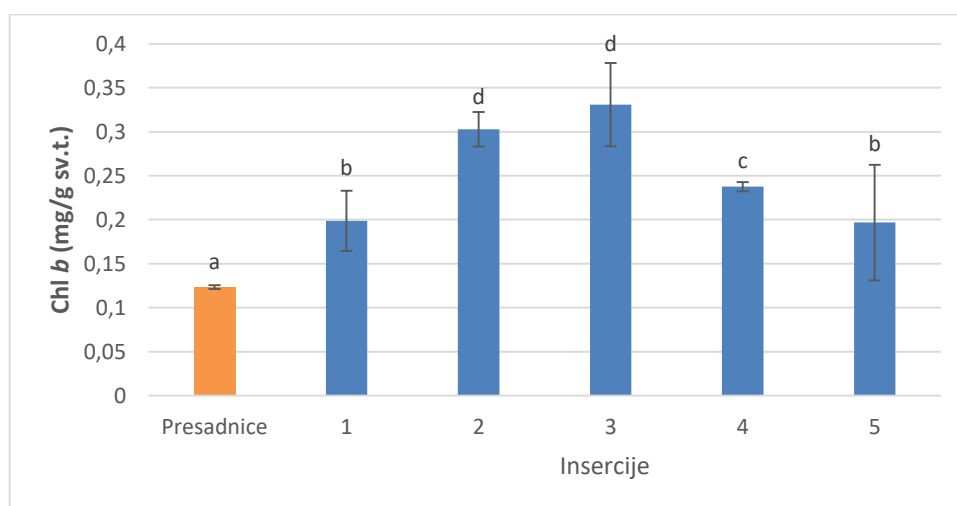
Srednje vrijednosti koncentracije klorofila *a* (Chl *a*), izražene u mg/g svježe tvari (sv.t.), prikazane su na Slici 23. U listovima presadnica izmjerena je značajno niža koncentracija Chl *a* (0,377 mg/g sv.t.) u odnosu na koncentracije u insercijama 1 do 5. Nije utvrđena statistički značajna razlika između koncentracija Chl *a* u listovima insercije 1 (0,627 mg/g sv.t.), insercije 4 (0,680 mg/g sv.t.) i insercije 5 (0,588 mg/g sv.t.). Najviše koncentracije Chl *a* zabilježene su u listovima insercija 2 (0,836 mg/g sv.t.) i 3 (0,854 mg/g sv.t.), pri čemu između njih nije utvrđena značajna razlika.



Slika 23. Srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracije klorofila *a* (Chl *a*), izražene u mg/g svježe tvari, u listovima presadnica i insercijama različite starosti (najmlađi listovi – 1, najstariji listovi – 5). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti (ANOVA, LSD test, $p < 0,05$).

3.2.2. Koncentracija klorofila *b*

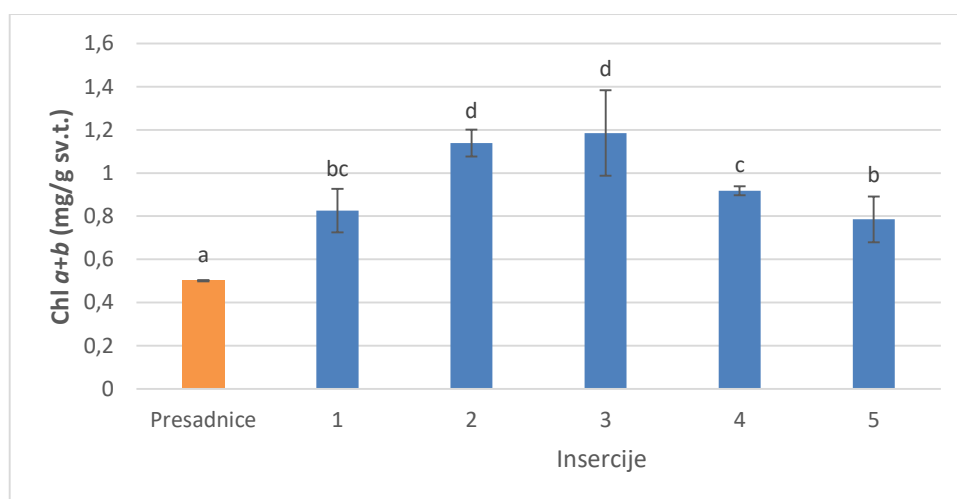
Srednje vrijednosti koncentracije klorofila *b* (Chl *b*), izražene u mg/g svježe tvari (sv.t.), prikazane su na Slici 24. U listovima presadnica zabilježena je značajno niža koncentracija Chl *b* (0,123 mg/g sv.t.) u odnosu na koncentracije u insercijama 1 do 5. Porast koncentracije Chl *b* zabilježen je u inserciji 1 (0,199 mg/g sv.t.), a najviše koncentracije izmjerene su u insercijama 2 (0,303 mg/g sv.t.) i 3 (0,331 mg/g sv.t.), pri čemu između insercija 2 i 3 nije utvrđena statistički značajna razlika. Smanjenje koncentracije klorofila *b* zabilježeno je u insercijama 4 (0,238 mg/g sv. t.) i 5 (0,197 mg/g sv.t.). Između insercija 1 i 5 nije utvrđena značajna razlika.



Slika 24. Srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracije klorofila *b* (Chl *b*), izražene u mg/g svježe tvari, u listovima presadnica i insercijama različite starosti (najmlađi listovi – 1, najstariji listovi – 5). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti (ANOVA, LSD test, $p < 0,05$).

3.2.3. Ukupna koncentracija klorofila *a* i *b*

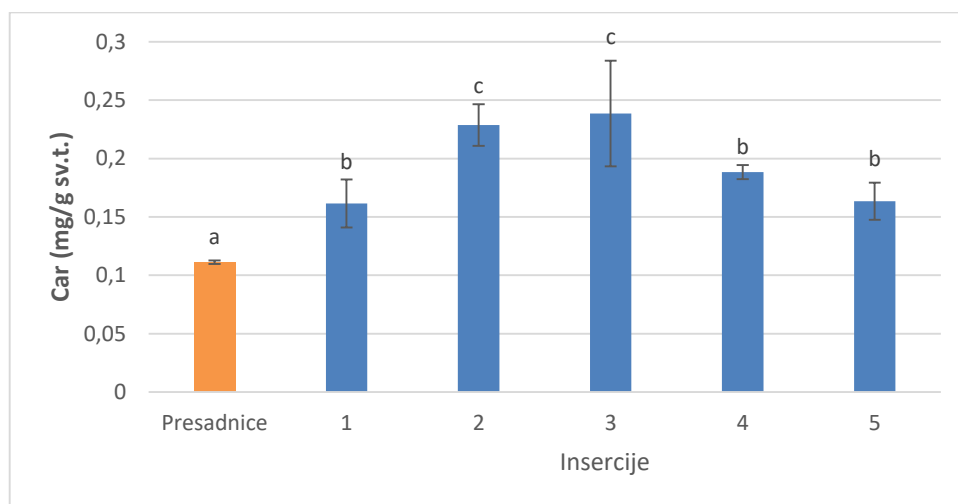
Srednje vrijednosti ukupne koncentracije klorofila *a* i *b* (Chl *a+b*), izražene u mg/g svježe tvari (sv.t.), prikazane su na Slici 25. U listovima presadnica zabilježena je značajno niža koncentracija ukupnih klorofila (0,501 mg/g sv.t.), u odnosu na koncentracije u insercijama 1 do 5. Najviše koncentracije zabilježene su u insercijama 2 (1,139 mg/g sv.t.) i 3 (1,185 mg/g sv.t.), pri čemu između njih nije utvrđena značajna razlika. U listovima insercija 4 (0,918 mg/g sv.t.) i 5 (0,785 mg/g sv.t.) zabilježeno je smanjenje koncentracije ukupnih klorofila, u odnosu na insercije 2 i 3. Ukupna koncentracija klorofila zabilježena u inserciji 1 (0,825 mg/g sv.tv.) bila je značajno niža od koncentracija u insercijama 2 i 3, ali nije se značajno razlikovala od koncentracija zabilježenih u insercijama 4 i 5.



Slika 25. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ukupne koncentracije klorofila *a* i *b* (Chl *a+b*), izražene u mg/g svježe tvari, u listovima presadnica i insercijama različite starosti (najmlađi listovi – 1, najstariji listovi – 5). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti (ANOVA, LSD, $p < 0,05$).

3.2.4. Koncentracija karotenoida

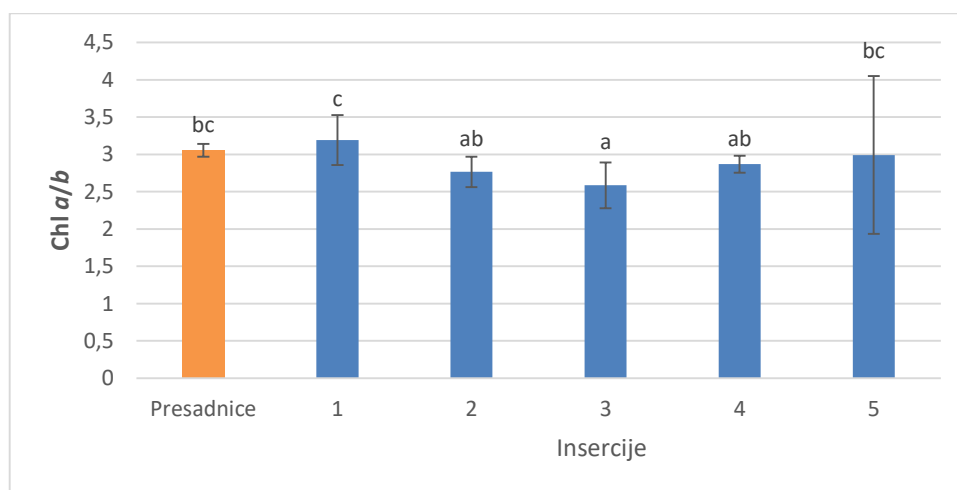
Srednje vrijednosti koncentracije karotenoida (Car), izražene u mg/g svježe tvari (sv.t.), prikazane su na Slici 26. U listovima presadnica zabilježena je značajno niža koncentracija karotenoida (0,111 mg/g sv.t.), u odnosu na koncentracije u insercijama 1 do 5. Najviše vrijednosti zabilježene su u insercijama 2 (0,229 mg/g sv.t.) i 3 (0,239 mg/g sv.t.), pri čemu između njih nije utvrđena statistički značajna razlika. Značajno niže koncentracije karotenoida izmjerene su u insercijama 1 (0,161 mg/g sv.t.), 4 (0,188 mg/g sv.t.) i 5 (0,163 mg/g svježe tvari), u odnosu na insercije 2 i 3, no nije utvrđena statistički značajna razlika između insercija 1, 4 i 5.



Slika 26. Srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracije karotenoida (Car), izražene u mg/g svježe tvari, u listovima presadnica i insercijama različite starosti (najmlađi listovi – 1, najstariji listovi – 5). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti (ANOVA, LSD test, $p < 0,05$).

3.2.5. Omjer koncentracija klorofila *a* i klorofila *b*

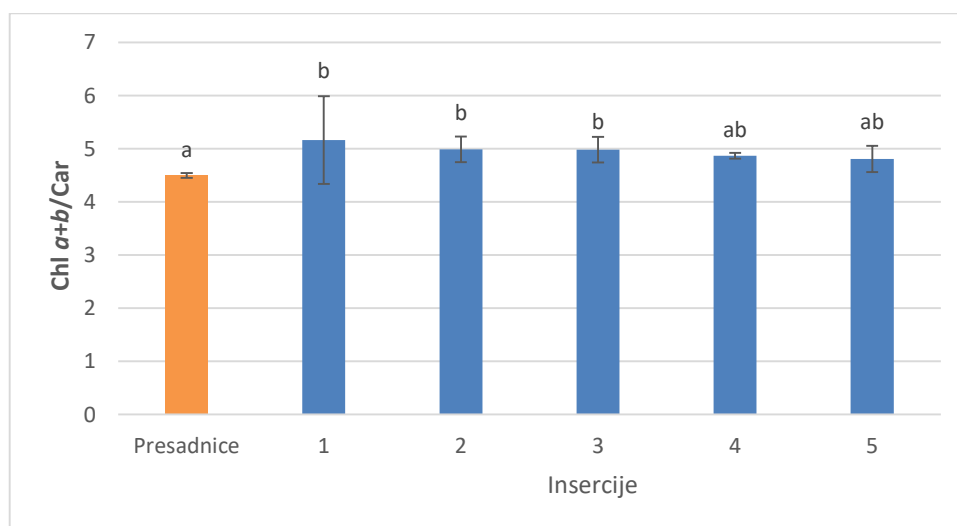
Srednje vrijednosti omjera koncentracija klorofila *a* i klorofila *b* (Chl *a/b*) prikazane su na Slici 27. Nisu zabilježene značajnije oscilacije u omjerima tijekom razvoja listova duhana. U listovima presadnica omjer Chl *a/b* je iznosio 3,056 i značajno se razlikovao samo od insercije 3 u kojoj je omjer bio niži. Omjeri u inserciji 2 (2,766), inserciji 3 (2,586) i inserciji 4 (2,869) nisu se značajno razlikovali međusobno, kao niti međusobni omjeri u listovima insercije 1 (3,193) i insercije 5 (2,992). Također nije bilo značajne razlike između insercija 2, 4, 5 međusobno.



Slika 27. Srednje vrijednosti i standardne devijacije omjera koncentracija klorofila *a* i klorofila *b* (Chl *a/b*) u listovima presadnica i insercijama različite starosti (najmlađi listovi – 1, najstariji listovi – 5). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti (ANOVA, LSD test, $p < 0,05$).

3.2.6. Omjer ukupnih koncentracija klorofila *a* i *b* i koncentracija kartenoida

Srednje vrijednosti omjera ukupne koncentracije klorofila i koncentracije karotenoida (Chl $a+b$ /Car) prikazane su na Slici 28. Nisu zabilježene značajnije oscilacije u omjerima tijekom razvoja listova duhana. U listovima presadnica omjer Chl $a+b$ /Car iznosi 4,501 i statistički značajno se ne razlikuje od omjera Chl $a+b$ /Car u listovima insercije 4 i insercije 5. Nije utvrđena statistički značajna razlika u omjerima Chl $a+b$ /Car zabilježenim u listovima insercije 1 (5,165), insercije 2 (4,989) i insercije 3 (4,985) međusobno, niti u odnosu na omjere dobivene u listovima insercije 4 (4,872) i insercije 5 (4,807).



Slika 28. Srednje vrijednosti i standardne devijacije omjera ukupne koncentracije klorofila i koncentracije karotenoida (Chl $a+b$ /Car) u listovima presadnica i insercijama različite starosti (najmlađi listovi – 1, najstariji listovi – 5). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti (ANOVA, LSD test, $p < 0,05$).

3.3. Udio suhe tvari u biljnom materijalu

Udio suhe tvari izražen je u postotku svježe tvari. Srednje vrijednosti su prikazane u Tablici 2. Najniži udio suhe tvari zabilježen je u listovima presadnica. Značajno više vrijednosti, u odnosu na presadnice, zabilježene su u svim insercijama, pri čemu nije pokazana razlika između insercija 1, 2, 3 i 5.

Tablica 2. Srednje vrijednosti i standardne devijacije udjela suhe tvari u listovima presadnica i insercijama različite starosti (najmlađi listovi – 1, najstariji listovi – 5). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti (ANOVA, LSD, $p < 0,05$).

	Presadnice	1	2	3	4	5
Suha tvar	10,164	11,969	12,056	12,263	10,999	12,269
(%)	±0,233 a	±0,203 c	±0,386 c	±0,408 c	±0,818 b	±0,084 c

4. RASPRAVA

U ovom radu praćene su promjene tijekom razvoja fotosintetskog aparata u listovima duhana (*Nicotiana tabacum* L.) mjerenjem fluorescencije klorofila *a* te određivanjem koncentracije fotosintetskih pigmenata u mladim presadnicama starim 14 dana i listovima starim 20, 24, 29, 32 i 37 dana (insercije 1 do 5).

Razvoj listova praćen je brojnim strukturnim i funkcionalnim promjenama koje uz razvoj fotosintetskog aparata rezultiraju progresivnim povećanjem kapaciteta fotosinteze čiji maksimum se postiže u potpuno razvijenim listovima (Chondrogiannis i Grammatikopoulos 2016; Zivcak i sur. 2014). Poznato je kako se fotosintetski aparat potpuno razvije prije nego listovi postignu svoju maksimalnu veličinu. Vrijeme ekspanzije listova kreće se od 10 do 40 dana, ovisno o vrsti (Tardieu i sur. 1999.), a značajnu ulogu tijekom ontogeneze imaju i okolišni čimbenici (Miller i sur. 1997). Za učinkovitu asimilaciju CO₂ i sintezu ugljikohidrata kao i za prijenos elektrona i produkciju kisika ključan je funkcionalni fotosintetski aparat. Smatra se da je fotosustav II (PSII) jedna od glavnih regulatornih komponenata transportnog lanca elektrona u kloroplastima (Barber i sur. 1997.), stoga je i u ovom radu upravo fotokemijska učinkovitost PSII, procijenjena *in vivo* mjerenjem fluorescencije klorofila *a*, korištena za praćenje razvoja fotosintetskog aparata. Maksimalni kvantni prinos PSII ($TR_0/ABS = F_v/F_m = \phi_{P_0}$), parametar koji se izračunava iz ekstremnih vrijednosti (minimalne - F_0 i maksimalne - F_m) intenziteta fluorescencije, opisuje primarnu fotokemiju PSII. Vrijednost parametra TR_0/ABS u optimalnim uvjetima iznosi između 0,80 i 0,83 u većine biljnih vrsta (Schreiber i sur. 1995), dok niže vrijednosti ukazuju na mogući stres i fotoinhibiciju (smanjena učinkovitost fotosinteze zbog oštećenja reakcijskog centra izazvanog jakim svjetlom ili nekim drugim stresnim čimbenikom) (Maxwell i Johnson 2000). Prema Bolhàr-Nordenkampf i sur. (1989) granična vrijednost TR_0/ABS pri kojoj je PSII funkcionalan iznosi 0,75. Rezultati mjerenja, prikazani na Slici 16, pokazali su značajan porast vrijednosti TR_0/ABS tijekom razvoja listova od insercije 1 do insercije 5. Najmanja vrijednost (0,747) izmjerena je u najmlađim listovima (inserciji 1) i vrlo je slična graničnoj. Vrijednosti TR_0/ABS u listovima ostalih insercija nalaze se u rasponu uobičajenih vrijednosti, pri čemu su najviše vrijednosti izmjerene u inserciji 5 i listovima presadnica. Zabilježene vrijednosti ukazuju na fotosintetsku kompetentnost svih listova duhana, a porast vrijednosti tijekom razvoja na povećanu učinkovitost reakcijskih središta u hvatanju fotona apsorbirane svjetlosti (Maxwell i Johnson 2000). Budući da su mjerenja fluorescencije klorofila *a* izvršena u ranijim jutarnjim satima, čime je izbjegnuta utjecaj

visokog intenziteta svjetlosti, možemo isključiti pojavu fotoinhibicije koja bi u suprotnome mogla negativno utjecati na maksimalni kvantni prinos PSII u mlađim listovima. Niže vrijednosti izmjerene u mlađim listovima ukazuju na različite razvojne faze PSII kompleksa. Isto je utvrđeno i u radu Jiang i sur. (2006) u kojemu su autori proučavali razvoj listova brijesta. Sličnu dinamiku porasta vrijednosti parametra TR_0/ABS tijekom razvoja pokazali su Viljevac Vuletić i sur. (2019) prateći razvoj lista zastavičara u dva kultivara pšenice. Lepeduš i sur. (2011) su pratili razvoj listova javora koji su bili podijeljeni u pet kategorija na temelju veličine listova, te su pokazali kontinuirani rast TR_0/ABS počevši od 0,726 sve do vrijednosti $\sim 0,810$, zabilježenih u listovima posljednjih dviju kategorija koji su postigli svoju maksimalnu veličinu. Sličan trend povećanja vrijednosti tijekom razvoja listova duhana (Slika 16) pokazao je i indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}), koji je u odnosu na TR_0/ABS bio nešto izraženiji/brži, što nije neobično jer se smatra da je i osjetljiviji u odnosu na TR_0/ABS . PI_{ABS} je kompleksniji parametar jer sadrži podatke o svim ključnim događajima tijekom fotosinteze: apsorpciji i hvatanju ekscitiranih fotona svjetlosti, transportu elektrona dalje od primarnog akceptora, kao i rasipanju suvišne energije (Strasser i sur. 2004). Veću osjetljivost ovog parametra istaknuli su Viljevac Vuletić i sur. (2019) prateći razvoj zastavičara, Katanić i sur. (2012) uspoređujući fotokemiju PSII u pupovima i iglicama smreke, kao i mnogi autori koji su istraživali utjecaj različitih stresnih čimbenika na rast i razvoj fotosintetskog aparata u biljkama (Mlinarić i sur. 2016; Antunović Dunić i sur. 2015; Lepeduš i sur. 2012). Trend rasta gustoće aktivnih reakcijskih središta po ekscitiranoj površini (RC/CS_0), zabilježen od listova insercije 1 do insercija 4 i 5 (koje se međusobno nisu razlikovale, Slika 18) u pozitivnoj je korelaciji sa parametrima TR_0/ABS i PI_{ABS} , što i nije neočekivano s obzirom na konstantni porast fotosintetske učinkovitosti tijekom razvoja. Vrijednost parametra RC/CS_0 u listovima presadnica slična je onoj u listovima insercije 2, što pokazuje da i manji broj aktivnih reakcijskih središta, može biti dovoljan za učinkovito odvijanje fotosinteze, na što je ukazao i PI_{ABS} koji je bio jednak u potpuno razvijenim listovima presadnica i inserciji 3 (Slika 17).

Osim parametara TR_0/ABS , PI_{ABS} i RC/CS_0 , iz podataka dobivenih mjerenjem fluorescencije klorofila *a* izračunati su i parametri ABS/RC , TR_0/RC , DI_0/RC i ET_0/RC koji opisuju specifični protok energije izražen po aktivnom reakcijskom središtu, središtu koje ima mogućnost reducirati Q_A (Strasser i sur. 2004). ABS označava protok fotona apsorbiranih od strane antena pigmentata, DI_0 označava energiju rasipanu u obliku topline i fluorescencije, TR_0 označava energiju koja se usmjerava prema reakcijskom središtu i pretvara u redoks energiju reduciranjem akceptora elektrona Q_A u Q_A^- . Q_A^- se reoksidira u Q_A što dovodi do stvaranja

elektronskog transporta, a taj se protok energija označava sa ET_0 (Strasser i sur. 2000). Vrijednosti navedenih parametara TR_0/RC , ABS/RC , DI_0/RC i ET_0/RC su se mijenjale tijekom razvoja listova duhana vrlo sličnom dinamikom (Slike 19-22). Najviša apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu (ABS/RC), kao i sposobnost hvatanja ekscitona (TR_0/RC) zabilježena je u listovima insercije 1 i progresivno se smanjivala tijekom razvoja listova do insercije 4, pri čemu nije bilo statistički značajne razlike između insercija 4 i 5. Nije bilo razlike niti između presadnica i listova insercije 3. Parametar ABS/RC opisuje ukupnu količinu svjetlosti apsorbiranu od strane molekula klorofila podijeljenu sa brojem aktivnih reakcijskih središta, a njegovo povećanje ukazuje na inaktivaciju određenog broja reakcijskih središta (Stirbet i Govindjee 2011; Strasser i sur. 2004, Strasser i sur. 2000). Promjene u apsorpciji energije mogu biti rezultat promjena u funkcionalnoj veličini antena (Yusuf i sur. 2010), što se može potvrditi negativnom korelacijom s gustoćom aktivnih reakcijskih središta izraženih po ekscitiranoj površini (RC/CS_0) (Kalaji i sur. 2014). Chondrogiannis i Grammatikopoulos (2016) su zabilježili progresivno smanjenje parametara ABS/RC i TR_0/RC tijekom razvoja ispitivanih listova što ukazuje na povećanje funkcionalnih reakcijskih središta, dok je omjer $Chl\ a/b$ ostao nepromijenjen. Gao i sur. (2013) su također pokazali smanjenje vrijednosti parametra ABS/RC tijekom razvoja listova jabuke (*Malus micromalus*), praćeno porastom vrijednosti parametara F_v/F_m i RC/CS_0 . Dobivene rezultate objasnili su time da je porast broja P680 nadmašilo povećanje ukupne koncentracije klorofila, odnosno da je došlo do smanjenja relativne veličine antena kompleksa u odnosu na P680. Slični rezultati dobiveni su i u ovom radu, u kojemu je utvrđeno kako rast koncentracije klorofila (a , b , $a+b$) tijekom razvoja listova duhana ne prati rast vrijednosti RC/CS_0 , a dolazi do pada vrijednosti ABS/RC odnosno povećanja aktivnih reakcijskih središta na što ukazuje i povećanje maksimalnog prinosa kvanta PSII (TR_0/ABS), iako se prema stabilnom omjeru $Chl\ a/b$ veličine antena ne bi trebale mijenjati. Rasipanje suviška energije po aktivnom reakcijskom središtu (DI_0/RC) također se smanjuje tijekom razvoja listova gotovo istim trendom kao ABS/RC i TR_0/RC (Slika 22). Najviša disipacija (DI_0/RC) zabilježena je u listovima insercije 1 i progresivno se smanjivala tijekom razvoja listova do insercije 4, pri čemu nije bilo statistički značajne razlike između insercija 4 i 5. Nije bilo razlike niti između presadnica i listova insercija 4 i 5. Rasipanje suvišne energije u obliku topline i fluorescencije po aktivnom reakcijskom središtu (DI_0/RC) je onaj dio apsorbirane energije kojega reakcijska središta ne mogu uhvatiti (Strasser i sur. 2004). Kako je glavna uloga antena kompleksa prijenos ekscitacijske energije do reakcijskih središta, rasipanje te energije može značiti da antena kompleksi nisu potpuno funkcionalni ili da su uključeni mehanizmi zaštite od fotoinhibicije uzrokovane jakim svjetlom. Smanjenje vrijednosti DI_0/RC moglo bi

biti posljedica povećavanja učinkovitosti antena kompleksa, a učinkovitost raste smanjenjem veličina samih antena kompleksa (Melis 2009). Smanjenje veličine antena kompleksa uzrokuje i smanjenu količinu apsorbirane energije čime se povećava učinkovitost fotokemije izražene parametrom F_v/F_m jer je manja vjerojatnost da će doći do fotoinhibicije. Mala veličina antena kompleksa kompenzirana je većim brojem reakcijskih središta (RC/CS_0) kako bi se omogućilo učinkovitije iskorištavanje svjetlosti bez oštećenja fotosintetskog aparata. Chondrogiannis i Grammatikopoulos (2016) su zabilježili smanjenje vrijednosti DI_0/RC tijekom razvoja listova, pri čemu je vrijednost parametra DI_0/RC bila najviša u najmlađim listovima, što je utvrđeno i u mladim listovima duhana (inserciji 1). Navedeni rezultat pokazuje da mladi listovi imaju potrebu na taj način se zaštititi od fotoinhibicije. Elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu (ET_0/RC) također se smanjuje tijekom razvoja listova (Slika 21), ali sporije u odnosu na ostale parametre izražene po aktivnom reakcijskom središtu. Najveće vrijednosti elektronskog transporta zabilježene su u listovima insercija 1, 2 i 3, a postupno su se smanjivale u insercijama 4 i 5. Vrijednost parametra ET_0/RC u listovima presadnica ne razlikuje se značajno od one u listovima insercija 3 i 4. Parametar ET_0/RC mjera je protoka energije po aktivnom reakcijskom centru koja pokreće transport elektrona od H_2O do feredoksina (Stirbet i Govindjee 2011). Relativno male oscilacije u vrijednosti elektronskog transporta ukazuju na fotosintetsku učinkovitost svih istraživanih listova duhana tijekom razvoja, što potvrđuju i parametri TR_0/ABS i PI_{ABS} .

Promjene u koncentraciji klorofila ($Chl\ a$, $Chl\ b$, $Chl\ a+b$) i karotenoida (Car) tijekom razvoja listova duhana odvijale su se gotovo identičnom dinamikom (Slike 23 - 25). Najniže koncentracije pigmenata izmjerene su u presadnicama, a trend akumulacije zabilježen je do listova insercija 2 i 3, u kojima je postignuta maksimalna vrijednost (24 i 29 dana stari listovi). Dosadašnja istraživanja ontogeneze listova i senescencije pokazala su podudaranje najvećeg porasta koncentracije fotosintetskih pigmenata s krajem eksponencijalne faze rasta listova (Chondrogiannis i Grammatikopoulos 2016; Jiang i sur. 2006; Munné-Bosch i Alegre 2002). U insercijama 4 i 5 zabilježeno je značajno smanjenje koncentracija pigmenata, što vodi ka zaključku da su ti listovi ipak bili u početnoj fazi senescencije, iako su bili zeleni i normalnog turgora odnosno bez ikakvih vizualnih simptoma senescencije. Slično su pokazali Junker i Ensminger (2016) koji su uspoređivali ljetne zelene (ne-senescentne) i jesenske zelene listove javora (*Acer saccharum* L.). Unatoč zelenoj boji jesenski su imali značajno manju koncentraciju klorofila i karotenoida. Zanimljivo je kako su ljetni i jesenski zeleni listovi javora, unatoč razlici u pigmentima, pokazali da nema razlike u maksimalnom kvantnom

prinosu PSII, ukazujući na činjenicu kako su prisutni klorofili i dalje organizirani u funkcionalne PSII komplekse. Naše istraživanje razvoja listova duhana također je pokazalo kako su parametri TR_0/ABS i PI_{ABS} konstantno rasli unatoč varijaciji u koncentracijama pigmenata, što znači da još nije došlo do funkcionalnih promjena koje su prisutne kad jednom list uđe u senescenciju. Udio suhe tvari (Tablica 1.) nije se značajno mijenjao tijekom razvoja listova od insercije 1 do insercije 5. Nešto niža vrijednost izmjerena je u presadnicama. Uzelac i sur. (2016) su paralelno analizirali sadržaj klorofila i ultrastrukturu mezofilnih stanica u *in vitro* uzgojenim biljkama duhana te pokazali progresivno smanjenje koncentracije klorofila korelirano s postupnim raspadanjem tilakoidnih membrana u kloroplastima tijekom starenja listova. Balazadeh i sur. (2008) su istaknuli kako sadržaj klorofila ipak nije potpuni odraz starosti lista, s obzirom da su istraživanja na molekularnoj razini pokazala već započetu senescenciju u potpuno zelenim listovima. Unatoč nedostatku molekularnih analiza u ovom istraživanju možemo pretpostaviti da su listovi insercije 4 i 5, stari 32 i 37 dana, ipak u nekoj fazi rane senescencije bez vizualnih promjena. Za razliku od rezultata dobivenih u našem istraživanju, u kojemu je u starijim listovima došlo do smanjenja koncentracije fotosintetskih pigmenata, Chondrogiannis i Grammatikopoulos (2016) su zabilježili progresivan rast koncentracija klorofila i karotenoida kao i parametara ϕ_{P_0} i PI_{ABS} tijekom razvoja listova podijeljenih u četiri skupine ili pak stagnaciju porasta u posljednjim razvojnim fazama u vrsta *Nerium oleander*, *Phlomis fruticosa* i *Cercis siliquastrum*. Slična dinamika pokazana je i u radu Lepeduša i sur. (2011) u kojemu je paralelno sa koncentracijama pigmenata (Chl *a*, Chl *b*, Chl *a+b*, Car) rastao i maksimalni kvantni prinos PSII tijekom razvoja listova javora. Biljke proučavane u dvije prethodno navedene studije su, kao i u ovom istraživanju, rasle u promjenjivim okolišnim uvjetima. Omjer koncentracija klorofila *a* i klorofila *b* (Chl *a/b*) tijekom razvoja listova duhana nije se značajno mijenjao (Slika 27). Svaka promjena omjera značila bi promjenu u veličini antena. Niži omjer ukazuje na veće antena komplekse i obrnuto (Ghirardi i Melis 1988). Kloroplasti smješteni dublje u mezofilu lista prilagođeni su nižem intenzitetu svjetlosti, a njihovi fotosustavi imaju veće antene odnosno niži omjer Chl *a/b* dok se u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti veličina antena smanjuje (Dinç i sur. 2012). U radu Lepeduša i sur. (2011) najviša vrijednost omjera zabilježena je u najmanjim/najmlađim listovima, zatim se smanjila i ostala nepromijenjena u ostalim skupinama, što ukazuje na veće antene u odnosu na antene najmanjih listova. Mladi listovi smokve su također pokazali viši omjer Chl *a/b* (Mlinarić i sur. 2016). Dinç i sur. (2012) su utvrdili kako je mjerenje fluorescencije neosjetljivo na promjene u sadržaju pigmenata sve dok se ne mijenja omjer Chl *a/b*. Omjeri ukupnih koncentracija klorofila *a* i *b* i koncentracija karotenoida (Chl *a+b/Car*)

također su bili stabilni tijekom razvoja listova duhana (Slika 28), što bi moglo značiti da su sinteza i razgradnja klorofila i karotenoida međusobno usklađene.

Rezultati dobiveni u ovome radu pokazali su promjene u korist učinkovitosti PSII kao i promjene u koncentraciji fotosintetskih pigmenata tijekom razvoja listova duhana. S obzirom da genske modifikacije idu u smjeru poboljšanja gospodarskih svojstava biljke, primarno veličine, otpornosti i kvalitete listova, buduća istraživanja trebala bi uključiti i insercije u fazi senescencije, kao i molekularne analize čiji rezultati bi upotpunili dosadašnje spoznaje o regulaciji fotosinteze tijekom ontogeneze listova duhana.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju istraživanja učinkovitosti fotosustava II (PSII) mjerenjem fluorescencije klorofila *a* i promjena u koncentracijama fotosintetskih pigmenata tijekom razvoja listova duhana (*Nicotiana tabacum* L.) izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Konstantni porast maksimalnog kvantnog prinosa PSII (TR_0/ABS) i indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) tijekom razvoja pokazali su kompetentnost svih ispitivanih listova za učinkovito apsorbiranje i iskorištavanje energije u fotokemijskim procesima, iako trend porasta koncentracije fotosintetskih pigmenata (Chl *a*, Chl *b*, Chl *a+b*) nije pratio konstantan porast parametara fluorescencije klorofila *a* (TR_0/ABS i PI_{ABS}).
2. Listovi insercija 2 i 3, starosti 24 i 29 dana, dosegli su maksimum eksponencijalnog rasta, na što ukazuju najveće izmjerene vrijednosti koncentracija fotosintetskih pigmenata (Chl *a*, Chl *b*, Chl *a+b*).
3. Listovi insercija 4 i 5, starosti 32 i 37 dana i bez vizualnih simptoma senescencije, ušli su u ranu fazu senescencije, na koju je ukazala degradacija fotosintetskih pigmenata (Chl *a*, Chl *b*, Chl *a+b*). Degradacija pigmenata nije utjecala na funkcionalnost fotosintetskog aparata.
4. Smanjenje apsorpcije po aktivnom reakcijskom središtu (ABS/RC), praćeno smanjenjem protoka uhvaćenih fotona (TR_0/RC) i disipacije (DI_0/RC), ukazuje na povećanje antena kompleksa tijekom razvoja. Suprotno očekivanjima, omjer Chl *a/b* nije pokazao promjene u veličini antena.
5. Negativna korelacija između apsorpcije po aktivnom reakcijskom središtu (ABS/RC) i gustoće aktivnih reakcijskih središta izraženih po ekscitiranoj površini (RC/CS_0) osigurava učinkovitost PSII pokazanu visokim vrijednostima parametara TR_0/ABS i PI_{ABS} .

6. LITERATURA

- Antunović Dunić, J., Lepeduš, H., Šimić, D., Lalić, A., Mlinarić, S., Kovačević, J., Cesar, V. (2015) Physiological response to different irradiation regimes during barley seedlings growth followed by drought stress under non-photoinhibitory light. *Journal of agricultural science* 7(6): 69-83.
- Balazadeh, S., Parlitz, S., Mueller-Roeber, B., Meyer, R. C. (2008) Natural developmental variations in leaf and plant senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* 10 (Suppl. 1): 136-147.
- Bar, M., Ori, N. (2014) Leaf development and morphogenesis. *Development* 141(22): 4219-4230.
- Barber, J., Nield, J., Morris, E. P., Zheleva, D., Hankamer, B. (1997) The structure, function and dynamics of photosystem two. *Physiologia Plantarum* 100: 817-827.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2002) *Biochemistry*. 5th edition, WH Freeman, New York.
- Blankenship, R. E. (2014) *Molecular mechanisms of photosynthesis*. John Wiley & Sons.
- Bolhàr-Nordenkamp, H. R., Long, S. P., Baker, N. R., Oquist, G., Schreiber, U., Lechner, E. G. (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.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2015) *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & Sons, Chichester.
- Chondrogiannis, C., Grammatikopoulos, G. (2016) Photosynthesis in developing leaf of juveniles and adults of three Mediterranean species with different growth forms. *Photosynthesis research* 130(1-3): 427-444.
- Cole, L. W. (2016) The Evolution of Per-cell Organelle Number. *Frontiers in cell and developmental biology* 4: 85.
- Cooper, G. M., Hausman, R. E. (2010) *Stanica: Molekularni pristup*. Medicinska naklada, Zagreb.

Demmig-Adams, B., Adams, W. W. (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1(1): 21–26.

Dinç, E., Ceppi, M. G., Tóth, S. Z., Bottka, S., Schansker, G. (2012) The chl *a* fluorescence intensity is remarkably insensitive to changes in the chlorophyll content of the leaf as long as the chl *a/b* ratio remains unaffected. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817: 770-779.

Du, F., Guan, C., Jiao, Y. (2018) Molecular mechanisms of leaf morphogenesis. *Molecular plant* 11(9): 1117-1134.

Ganapathi, T. R., Suprasanna, P., Rao, P. S., Bapat, V. A. (2004) Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)-A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. *Indian Journal of Biochemistry* 3(2): 171-184.

Gao, J., Li, P., Ma, F., Goltsev, V. (2013) Photosynthetic performance during leaf expansion in *Malus micromalus* probed by chlorophyll *a* fluorescence and modulated 820 nm reflection. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 137: 144-150.

Ghirardi, M. L., Melis, A. (1988) Chlorophyll *b* deficiency in soybean mutants. I. Effects on photosystem stoichiometry and chlorophyll antenna size. *Biochimica et Biophysica Acta* 932: 130-137.

Harbinson, J., Rosenquist, E. (2012) An introduction to chlorophyll fluorescence. U: DeEll, J. R., Toivonen, P. M. (ur.) Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology. Springer Science & Business Media.

Jiang, C. D., Jiang, G. M., Wang, X., Li, L. H., Biswas, D. K., Li, Y. G. (2006) 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: 261–268.

Junker, L. V., Ensminger, I. (2016) Relationship between leaf optical properties, chlorophyll fluorescence and pigment changes in senescing *Acer saccharum* leaves. *Tree Physiology* 36: 694-711.

Kalaji, H. M., Oukarroum, A., Alexandrov, V., Kouzmanova, M., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, I. A., Cetner, M. D., Allakhverdiev, S. I., Goltsev, V. (2014) Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence measurements. *Plant Physiology and Biochemistry* 81: 16-25.

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.

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

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.

Lewis, R. S., Nicholson, J. S. (2007) Aspects of the evolution of *Nicotiana tabacum* L. and the status of the United States Nicotiana Germplasm Collection. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54(4): 727-740.

Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 349-382.

Maxwell, K., Johnson, G. N. (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51(345): 659-668.

Melis, A. (2009) Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Science* 177: 272-280.

Miller, A., Tsai, C. H., Hemphill, D., Endres, M., Rodermel, S., Spalding, M. (1997) Elevated CO₂ Effects during Leaf Ontogeny (A New Perspective on Acclimation). *Plant Physiology* 115(3): 1195-1200.

Mlinarić, S., Antunović Dunić, J., Štolfa, I., Cesar, V., Lepeduš, H. (2016) High irradiation and increased temperature induce different strategies for competent photosynthesis in young and mature fig leaves. *South African Journal of Botany* 103: 25-31.

Moon, J., Hake, S. (2011) How a leaf gets its shape. *Current opinion in plant biology* 14(1): 24-30.

Munné-Bosch, S., Alegre, L. (2002) Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. *Planta* 214: 608-615.

Schreiber, U., Bilger, W., Neubauer, C. (1995) Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. U: Schulze, ED., Caldwell M. M. (ur.) Ecophysiology of Photosynthesis. Springer Study Edition, vol 100. Springer, Berlin, Heidelberg, str. 49-70.

Sierro, N., Battey, J. N., Ouadi, S., Bakaher, N., Bovet, L., Willig, A., Goepfert, S., Peitsch, M. C., Ivanov N. V. (2014) The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. Nature communications 5:3833.

Stepić, H., Budimir, A., Zdeličan, J., Pleša, Z., Kozumplik, V. (2015) Proizvodnja i skladištenje sjemena duhana. Agronomski glasnik: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva 77(4-6): 263-271.

Stirbet, A., Govindjee. (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 (1-2): 236–257.

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.

Strasser, R. J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M. (2004) Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. U: Papageorgiou., G. C., Govindjee (ur.) Chlorophyll *a* fluorescence *a* signature of photosynthesis: Advances in photosynthesis and respiration. Vol 19, Springer, Dordrecht, str. 321-362.

Taiz, L., Zeiger, E. (2002) Plant Physiology. 3rd ed, Sinauer, Sunderland.

Tardieu, F., Granier, C., Muller, B. (1999) Modelling leaf expansion in a fluctuating environment: are changes in specific leaf area a consequence of changes in expansion rate? New Phytology 143: 33-43.

Uzelac, B., Jaošević, D., Simonović, A., Motyka, V., Dobrev, P. I., Budimir, S. (2016) Characterization of natural leaf senescence in tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants grown in vitro. Protoplasma 253: 259-275.

Viljevac Vuletić, M., Marček, T., Španić, V. (2019) Photosynthetic and antioxidative strategies of flag leaf maturation and its impact to grain yield of two field-grown wheat varieties. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 31(3): 387-399.

Walla, P. J. (2014) *Modern biophysical chemistry: Detection and analysis of biomolecules*. John Wiley & Sons.

Yusuf, M. A., Kumar, D., Rajwanshi, R., Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., Govindjee, Sarin, N. B. (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.

Zivcak, M., Brestic, M., Kalaji, H. M., Govindjee (2014) Photosynthetic responses of sun- and shade-grown barley leaves to high light: is the lower PSII connectivity in shade leaves associated with protection against excess of light? *Photosynthetic Research* 119:339-354.

Mrežne stranice

Web1. <http://www.fao.org/3/y4956e/y4956e08.htm> (15.07.2019.).

Web2. <https://www.pinterest.coFWebm/pin/569494315381675220/> (03.08.2019.).

Web3. http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-09-11/11_09.jpg (28.08.2019)

Web4.

<https://www.philpoteducation.com/mod/book/tool/print/index.php?id=782&chapterid=1131> (24.08.2019.).

Web5. <https://www.worldofmolecules.com/colors/bcarotene.htm> (23.08.2019.).

Web6. https://www.cgarsltd.co.uk/cigar-library/dominican_republic_cigar_tour.html (28.08.2019.).