Inhibicija fotosinteze

Tripić, Neven

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:181:208837

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

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

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski studij biologije

Neven Tripić

INHIBICIJA FOTOSINTEZE

Završni rad

Mentor: Prof.dr.sc. Vera Cesar

Osijek,2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJASKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjel za biologiju
Završni rad
Preddiplomski studij biologije
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

INHIBICIJA FOTOSINTEZE

Neven Tripić

Rad je izrađen u : Laboratoriju za staničnu i molekularnu biologiju biljaka Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Mentor: Dr. sc. Vera Cesar, **red. prof.**
Neposredni voditelj: Dr.sc. Selma Mlinarić

Kratki sažetak završnog rada:

U ovom radu istraživan je utjecaj inhibitora fotosinteze DCMU-a na učinkovitost fotosustava II u lisnim diskovima japanskog dvornika (*Reynoutria japonica* Houtt.) uzgojenog u različitim svjetlosnim režimima. U tu svrhu mjerena je fluorescencija klorofila *a* koristeći uređaj M-PEA. DCMU blokira re-oksidaciju primarnog akceptora QA te uzrokuje inhibiciju fotosintetskog transporta elektrona. Tretman DCMU-om utječe na brže postizanje maksimalnog intenziteta fluorescencije u odnosu na kontrolu, što je vidljivo iz oblika OJIP krivulje: veći nagib početne, OJ faze te smanjena površina iznad OJIP krivulje (Area). To je u konačnici dovelo do smanjenja fotositetske učinkovitosti (PI_{ABS} i PI_{tot}) tretiranih lisnih diskova.

Broj stranica: 26
Broj slika: 13
Broj tablica: 1
Broj literaturnih navoda: 24
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: Japanski dvornik, DCMU, fluorescencija klorofila *a*, OJIP krivulja, PSII, Area

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek Department of Biology
Bachelor's Thesis
Scientific area: Natural science
Scientific field: Biology

INHIBITION OF PHOTOSYNTHESIS

Neven Tripić

Thesis performed at: Plant Molecular and Cellular Biology Laboratory, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Supervisor: PhD. Vera Cesar, Full Professor
Assistant in charge: PhD. Selma Mlinarić

Short abstract:

In this work, the effects of DCMU were investigated on photosystem II performance in leaf discs of Japanese knotweed (*Reynoutria japonica* Houtt.) which were cultivated in different light regimes. In that purpose chlorophyll *a* fluorescence was measured using the M-PEA analyzer. DCMU blocks re-oxidation of the primary acceptor Q_A and interrupts the photosynthetic electron chain. The DCMU treatment causes faster achieving of maximum intensity of chlorophyll *a* fluorescence compared to control, which is visible from the shape of the OJIP transient: initial slope of the OJ phase becomes considerably steeper and surface area above the OJIP transient (Area) was reduced. That lead to decrease of performance index (PI_{ABS}, PI_{tot}) in treated leaf discs.

Number of pages: 26

Number of figures: 13

Number of tables: 1

Number of references: 24

Original in: Croatian

Key words: Japanese knotweed, DCMU, chlorophyll *a* fluorescence, OJIP transient, PSII, Area

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

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1. Fluorescencija klorofila *a* 1
1.2. Struktura i heterogenost PSII 3
1.3. DCMU 4
1.4. Japanski dvornik (*Reynoturia japonica* Houtt.) 5
1.5. Cilj istraživanja 6
2. MATERIJALI I METODE 7
2.1. Biljni materijal 7
2.2. Priprava otopine 7
2.3. Mjerenje fluorescencije klorofila *a* 8
2.4. Statistička obrada podataka 10
3. REZULTATI 11
4. RASPRAVA 19
5. ZAKLJUČAK 23
6. LITERATURA 24

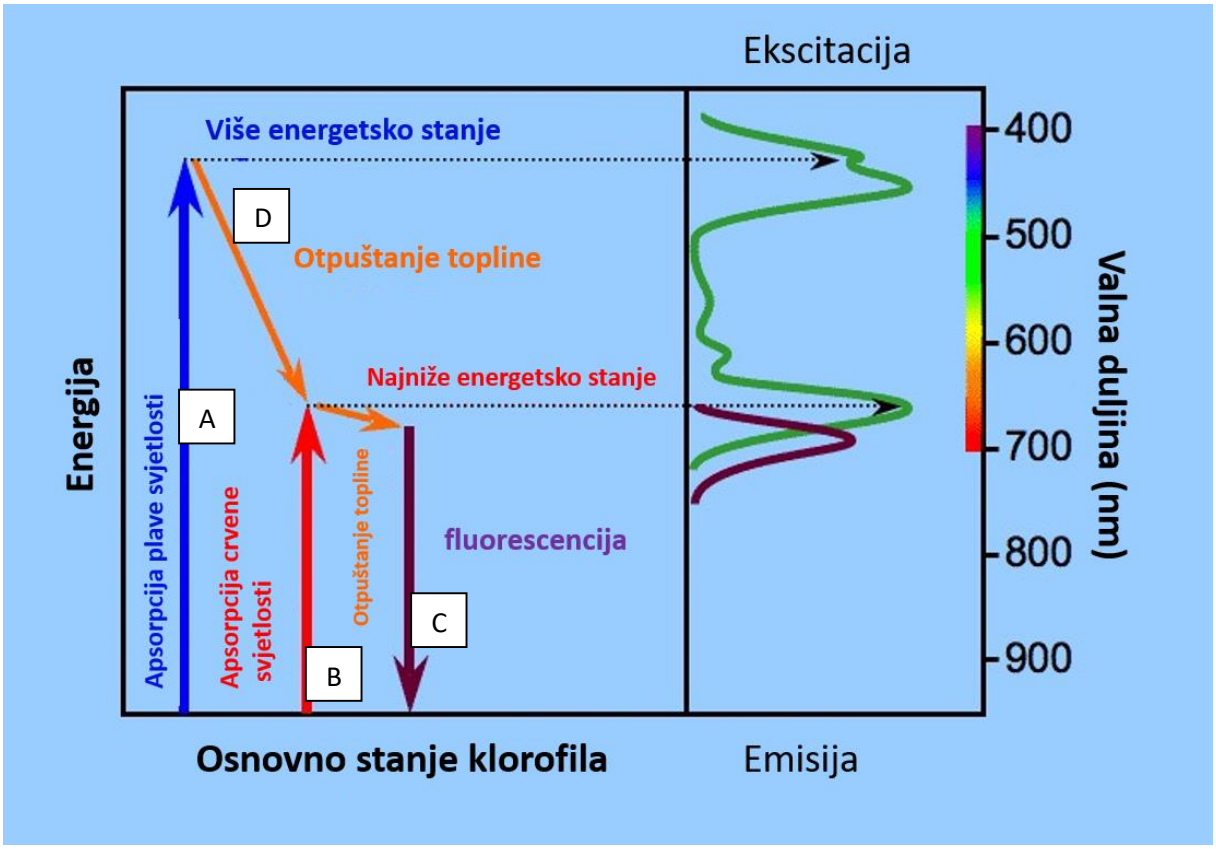
1. UVOD

Fotosinteza je proces pri kojem se prikuplja energija Sunčeve svjetlosti te se uz korištenje CO_2 i H_2O sintetizira glukoza. Proces fotosinteze je niz kemijskih reakcija u kojima se elektroni prenose s jedne vrste molekula (oksidacija) na drugu (redukcija) (Taiz i Zeiger, 2002). Cijeli proces se odvija u kloroplastima, Sunčeva energija se pretvara u kemijsku energiju. Svjetlost postaje fotosintetski aktivna tek nakon što ju fotosintetski pigmenti apsorbiraju i može se podijeliti na primarne procese, u kojima se koristi Sunčeva svijetlost, a odvija se u tilakoidnim membranama kloroplasta, te s druge strane na sekundarne procese za koje je nije potrebna Sunčeva energija i koja se odvija u stromi kloroplasta a nazivamo ga još i Calvinov ciklus.

Primarni procesi obuhvaćaju dvije uzastopne, usklađene i serijski povezane fotokemijske reakcije. Svaka je vezana na svoj reakcijski sustav, fotosustav II (P680) i fotosustav I (P700). Sunčeva svjetlost se apsorbira pomoću fotosintetskih pigmenata od kojih je najobilniji u biljaka klorofil. Prilikom apsorpcije Sunčevog svjetla dolazi do pobuđivanja elektrona u više energijsko stanje i na taj način dolazi do nastajanja kemijske energije. Fotosintetski pigmenti su organizirani u fotosredišta koji sadrže velik broj pigmenata, a oni pak djeluju kao antene koje apsorbiraju svjetlo i prenose energiju pobuđenih elektrona do molekule klorofila u reakcijskom središtu. Klorofil u reakcijskom središtu tada prenosi svoj visoko energetski elektron do molekule akceptora u transportnom lancu elektrona. Visoko energetski elektroni se prenose kroz seriju membranskih nosača pri čemu nastaje ATP i NADPH (Cooper, 2003; Voet i Voet, 2004).

1.1. Fluorescencija klorofila *a*

Fluorescencija je proces u kojemu dolazi do ponovnog re-emitiranja apsorbirane svjetlosti. Svjetlost ili elektromagnetsko zračenje koje se re-emitira ima drugačiju valnu duljinu od one koja je apsorbirana. Molekula klorofila *a* je fotoaktivni pigment u reakcijskom središtu, te je policikličke, planarne građe koja se sastoji od porfirinskog prstena (središnju poziciju ima ion Mg^{+2}) i fitolnog lanaca. Ona apsorbira svjetlost u plavom (valne duljine od 430-490 nm) i crvenom dijelu spektra (630-760 nm). Svjetlost ujedno ima i valnu i čestinu prirodu, što znači da se može promatrati kao transverzalni elektromagnetski val ili kao struja čestica koje nazivamo fotonima. Svaki foton posjeduje određenu energiju, tzv. kvant energije tako da energetski sadržaj svjetlosti nije kontinuiran već se doprema u kvantima



Slika 1. Energetska razina klorofila prilikom apsorpcije plave i crvene svjetlosti. Primjer A) prikazuje energetsku razinu prilikom pobuđivanja klorofila *a* plavom svjetlošću, B) prilikom pobuđivanja crvenom svjetlošću. C) višak energije koji se otpustio u obliku fluorescencije. D) Otpuštanje apsorbirane energije u obliku topline prilikom prelaska elektrona iz više u niže energetsko stanje (web 1).

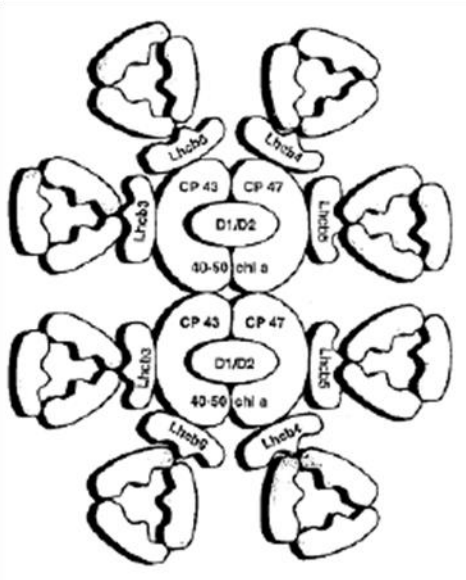
Energija fotona ovisi o valnoj duljini svjetlosti po Planckovom zakonu: E = hν. Sunčeva je svjetlost, prema tome, kao kiša fotona različitih energija (Taiz i Zeiger, 2002). Prilikom apsorpcije fotona, delokalizirani elektroni molekule klorofila prelaze u pobuđeno stanje. S obzirom da molekula klorofila *a* apsorbira u dva različita spektra (plavom i crvenom), apsorbira u dva različita energijska stanja (slika 1). Shodno tome elektroni molekule klorofila *a* se mogu nalaziti u dva različita pobuđena stanja (singlet 1 koji odgovara energijski nižem stanju i singlet 2 koji odgovara energijski višem stanju). Plavi dio spektra, koji ima manju valnu duljinu, a samim tim i veću energiju, pobuđuje elektron u drugo singletno stanje. Crvena svijetlost pak ima veću valnu duljinu, a manju energiju, te pobuđuje elektron u prvo singletno stanje. Kvant zračenja kojeg apsorbira klorofil, koristi se većim dijelom za fotokemijske reakcije (reakcije fotosinteze ovisne o svjetlosti). Pobuđivanjem elektrona dolazi do skoka u višu orbitalu (energijski viša) ima za posljedicu različite konformacijske promjene molekule klorofila. Kako

bi se to spriječilo, elektron se vraća u osnovno stanju uz moguća dva ishoda. Višak energije se otpušta kao toplina ili kao fluorescencija. Prijelaz iz drugog singletnog stanja u prvo singletno stanje se oslobađa kao toplina (vrijeme prijelaza 10 -11s), dok prijelaz iz prvog singletnog stanja u osnovno stanje je popraćen fluorescencijom klorofila *a*. Na fluorescenciju klorofila *a* od ukupne apsorbirane energije otpada 2-10%, te ju vidimo u obliku crvene svijetlosti valne duljine 695 nm (Porcar-Castell, 2008).

1.2. Struktura i heterogenost PSII

Poznato je da je PSII heterogen u mnogo aspekata, jedan od njih je i heterogenost PSII antena koja je vezana za njihovu veličinu i energetsku povezanost. Determinaciju heterogenosti antena PSII pomoću fluorescencije s 3-(3,4-diklorfenil)-1,1-dimetilurea (DCMU) po prvi put su predstavili Melis i Homann (Lazar i sur. 2004). Metoda se temeljila na evaluaciji protoka vremena komplementarnog područja (engl. *complementary area*, CA; područje između krivulje rasta fluorescencije i horizontalne linije na visini maksimalne fluorescencije F_m. Autori su zaključili da postoje dva različita tipa PSII: PSIIα i PSIIβ.

Fotosustavi su integralni membranski kompleksi izgrađeni od fotosintetskih pigmenata i proteina. Svi pigmenti fotosustava mogu apsorbirati fotone, ali samo klorofil *a* koji se nalazi u reakcijskom središtu sposoban je pretvarati svjetlosnu u kemijsku energiju. Ostale molekule pigmenata fotosustava su antenske molekule čija je zadaća apsorpcija i prijenos svjetlosne energije do reakcijskog središta (Nelson i Cox, 2012). PSII sastoji se od tri strukturno i funkcionalno različita dijela: antena kompleks, reakcijsko središte i kompleks koji ima funkciju ekstrakcije kisika iz vode (engl. „*oxygen-evolving complex*"- OEC) (slika 2). Antena kompleksi se sastoje od stotina molekula pigmenata kao što su klorofil *a, b* i karoteni (Toth, 2006). PSII nalazi se isključivo u grana tilakoidima. Primarne reakcije fotosinteze se odvijaju u reakcijskim središtima fotosustava, a antena kompleksi imaju funkciju apsorpcije i prijenosa ekscitona do reakcijskih središta. PSII se sastoji od najmanje 25 različitih proteinskih podjedinica (Voet i Voet, 2004). Reakcijsko središte fotosustava II je heterodimer, građen od dvije proteinske podjedinice, D1(PsbA) i D2 (PsD), koji su međusobno homologni. Na njih se vezuju četiri molekule klorofila *a*, dvije molekule feofitina (vezane na D1 i D2) i dvije molekule plastkinona, pri čemu je Q_A vezan na D2, a Q_B je vezan na D1 (Toth, 2006). Tok elektrona u fotosintetskom transportnom lancu započinje na PSII apsorpcijom fotona. Energija koja nastaje koristi se za cijepanja molekule vode na molekularni kisik i protone. Oslobađanjem protona iz vode uspostavlja se gradijent protona kroz tilakoidnu membranu. Visoko energetski elektroni nastali

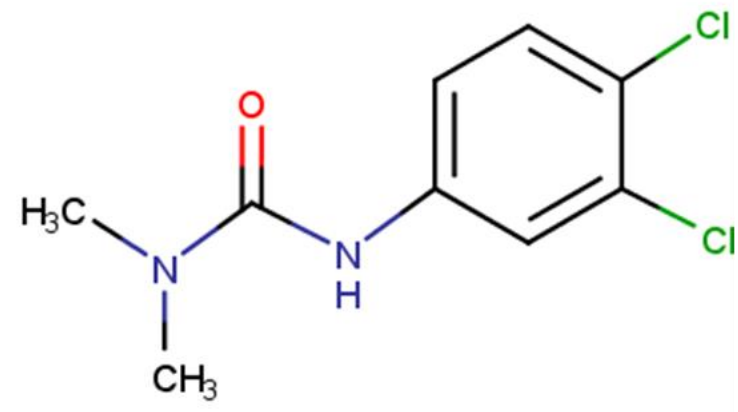


u ovom procesu prenose se preko serije nosača do plastokinona, a on pak prenosi elektrone na kompleks citokrom *b*$_6$*f* i potom na plastocijan. Na ovaj je način transport elektrona kroz PSII združen s uspostavom gradijenta protona što pokreće kemiosmotičku sintezu ATP (Cooper, 2003).

Slika 2. Shematski prikaz strukture fotosustava II (Jansson, 1994).

1.3. DCMU

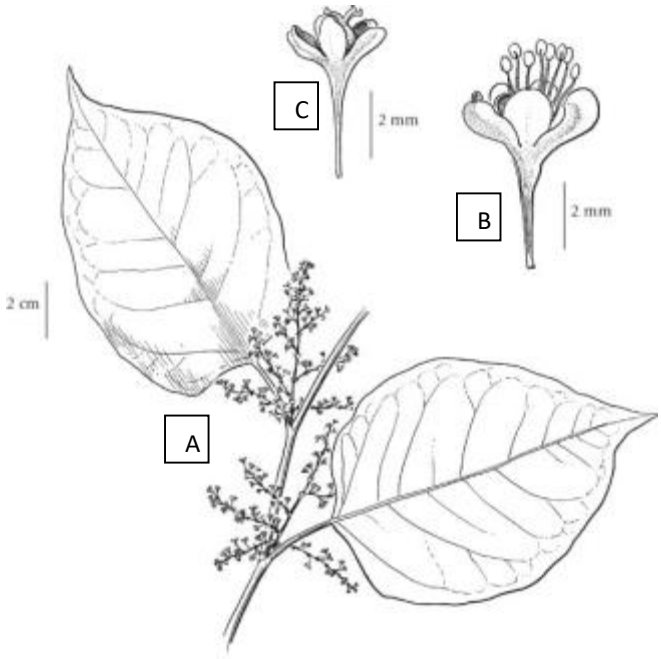
Spoj 1-(3,4-dikorofenil)-3,3-dimetilurea poznat je još pod nazivima Diuron ili DCMU (slika 3). To je kemijski spoj koji se koristi kao herbicid, te kao inhibitor fotosinteze. Ima široku primjenu u istraživanju transporta elektrona, fluorescencije i prijenosu energije u kloroplastima (Ridley, 1977). DCMU pomiče Q_B s njegovog vezujućeg mjesta na D1 proteinu te na taj način blokira plastokinon vezujuća mjesta i uzrokuje disocijaciju transporta elektrona između fotosustava II i plastokinona. Nije redoks aktivan te sprječava re-oksidaciju Q_A^-. Nema utjecaja na fotosustav I, niti na bilo koje druge reakcije u fotosintezi. (Toth, 2006).



Slika 3. Strukturni prikaz molekule DCMU (web 2).

1.4. Japanski dvornik (*Reynoturia japonica* Houtt.)

Japanski dvornik (*Reynoturia japonica* Houtt.) je invazivna, trajna zeljasta biljka iz porodice dvornika (Polygonaceae). Tvori mnogobrojne stabljike koje narastu i do 3 metra visine. Stabljike su uspravne, zadebljane, robusne, šuplje. Listovi su naizmjenično smješteni uzduž stabljika, ovalnog oblika, ušiljeni na vrhu. Cvjetovi su jednospolni, zelenkastobijeli, skupljeni u guste metličaste cvatove, a rastu u pazušcu listova (slika 4). Plodovi su trobridni oraščići do 4 mm dužine koji nose jednu sjemenku. Raste u vrlo gustim skupinama na vlažnim mjestima, često u blizini rijeka i potoka, odgovara joj zemljište siromašno vapnencem. Japanski dvornik raste na različitim tipovima tla.



Slika 4. Izgled biljke (*Reynoutria japonica* Houtt., A) nadzemni dio biljke. B) muški cvjetovi. C) ženski cvjetovi (web 3).

Japanski dvornik je jedna je od najšire rasprostranjenih invazivnih vrsta na području Republike Hrvatske. To je brzorastuća višegodišnja grmolika biljka, vrlo invazivna i opasna zbog brzog širenja u različitim ekosustavima i vrlo teškog uklanjanja. Karakterizira ih izuzetna sposobnost razmnožavanja i brze fiziološke prilagodbe na uvjete u novom okolišu (Spiering, 2011).

1.5. Cilj istraživanja

Cilj ovog rada je bio istražiti utjecaj inhibitora fotosinteze DCMU-a na minimalni i maksimalni intenzitet fluorescencije klorofila *a* te na brzinu postizanja maksimalne fluorescencije na lisnim diskovima japanskog dvornika koji je bio uzgojen u dva različita režima osvjetljenja. Također, cilj je bio utvrditi utjecaj ovog inhibitora na maksimalni kvantni prinos fotosustava II te ukupnu fotosintetsku učinkovitost japanskog dvornika.

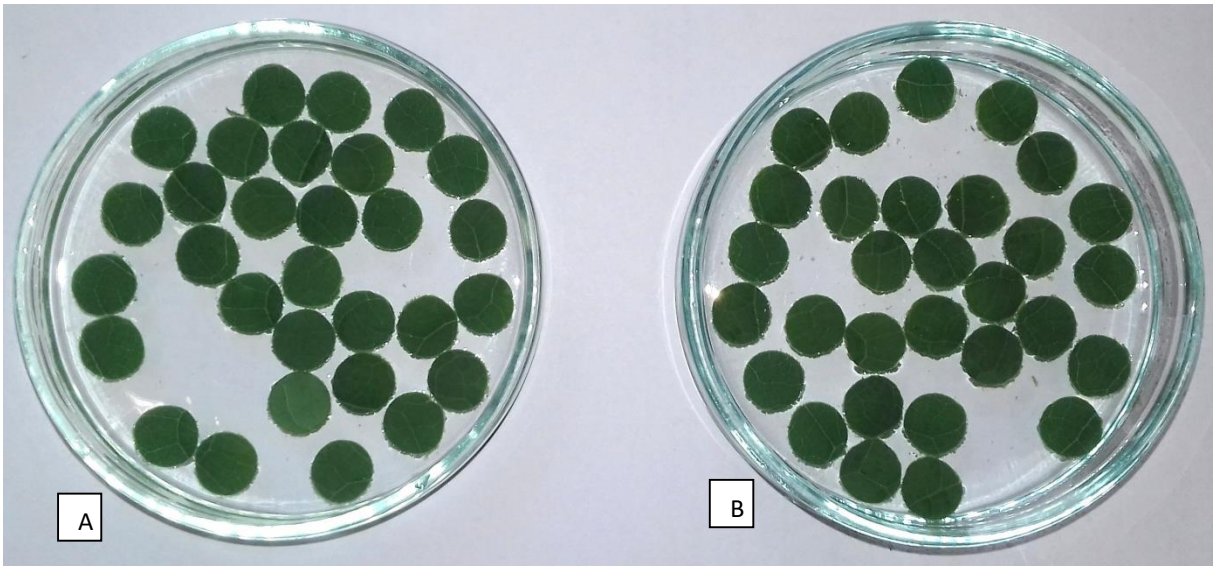
2. MATERIJALI I METODE

2.1. Biljni materijal

Japanski dvornik (*Reynoturia japonica* Houtt.) zasađen je u dvije skupine. α-skupina uzgajana pod utjecajem Sunčeve svjetlosti promjenjivog intenziteta (hodnik) i β-skupina (komora) uzgajana pod konstantnim osvjetljenjem niskog intenziteta (40 µmol $m^{-2}s^{-1}$). Mjerenja su vršena na listovima koji su potpuno razvijeni, odnosno uzorkovani su listovi koji se nalaze 3 do 4 lista od vrha biljke.

2.2. Priprava otopine

Lisni diskovi (slika 5) su tretirani otopinom DCMU-a (Toth, 2006), koja se pripremi na način da se 0,0048 grama Diurona otopi u 1000 µL 96% etanola. Kada se sav Diuron otopio, u otopinu se doda 96 mL vode. Konačna korištena koncentracija DCMU-a bila je 20 µM.



Slika 5. A) kontrola skupina lisnih diskova koji su tretirani 1% otopinom etanola. B) Skupina lisnih diskova koji su tretirani 20 µM otopinom DCMU-a.

2.3. Mjerenje fluorescencije klorofila *a*

Prije svakog mjerenja, tretiranja s DCMU-om, listovi su prethodno ostavljeni u mraku na sat vremena, te se pomoću bušača za čepove naprave diskovi promjera 9 mm (Slika 5). Sva mjerenja izvršena su na lisnim diskovima koje su prilagođeni uvjetima tame. Diskovi su tretirani prethodno pripremljenom 20 μM otopinom DCMU-a, a kontrolna grupa je tretirana s 1% etanolom. U svakoj Petrijevoj zdjelici se nalazilo 30 diskova koji su okrenuti licem prema gore. Korišteni su listovi biljaka obje skupine: α-skupina koja se nalazila u hodniku pod Sunčevim svjetlom promjenjivog intenziteta svjetlosti i biljaka β-skupine, koje su se nalazile u uzgojnoj komori pod konstantnim niskim osvjetjenjem. Ukupno su bile 4 Petrijeve zdjelice, dvije kontrolne (jedna predstavlja α-skupinu biljka, dok druga β-skupinu biljka), te dvije u kojima se nalazio DCMU. Svaku Petrijevu zdjelicu smo vakuumirali 4 puta po 2 minute, do pojave mjehurića. Eksperiment je ponovljen dva puta.

Prije mjerenja, uzorci se osuše na filtar papiru, te se mjeri fluorescencija klorofila *a* pomoću instrumenta M-PEA koji omogućava bilježenje promjena intenziteta fluorescencije klorofila *a* tijekom 1s, počevši od 20 μs nakon osvjetljavanja. Tijekom prvih 2 ms promjene se bilježe svakih 10 μs te nakon toga svake ms. Intenzitet korištene svjetlosti dovoljan je da omogući zatvaranje svih reakcijskih središta, odnosno postizanje maksimalnog intenziteta fluorescencije. Uređaj inducira fluorescenciju pomoću pulsa crvene saturacijske svjetlosti. Iz izmjerenih vrijednosti mjerenja moguće korištenjem JIP-testa izračunati niz parametara (tablica 1) koji opisuju redoks stanje fotosustava II i I te učinkovitosti fotosintetskog aparata. Također, moguće je i iscrtati OJIP krivulju koja pokazuje polifazni porast fluorescencije klorofila *a* koja pokazuje nagli porast intenziteta u prvoj sekundi mjerenja., a temelji se na teoriji protoka energije u biomebranama. Porast intenziteta fluorescencije klorofila *a* odražava nakupljanje reduciranog primarnog akceptora elektrona Q_A.

Tablica 1. Podatci i parametri OJIP testa (prema Strasser i sur., 2009).

F_0	Intenzitet fluorescencije nakon 50 μs (O stupanj)
F_{300}	intenzitet fluorescencije nakon 300 μs
F_J	intenzitet fluorescencije nakon 2 ms (J stupanj)
F_I	intenzitet fluorescencije nakon 30 ms (I stupanj)
F_m	maksimalni intenzitet fluorescencije (P stupanj)
F_V	maksimalna varijabilna fluorescencija; F_m - F_0
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)
TR_0/ABS	maksimalni kvantni prinos PSII; 1-(F_0 - F_m) = F_v/F_m
ABS/RC	apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu; (TR_0/RC)/(TR_0/ABS)
TR_0/RC	hvatanje ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu; M_0/V_J
ET_0/RC	elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu; TR_0/RC - M_0
DI_0/RC	otpuštanje energije po aktivnom reakcijskom središtu; (ABS/RC) - (TR_0/RC)
RC/ABS	omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta i antena klorofila; (RC/ TR_0) (TR_0/ABS)
TR_0/DI_0	omjer hvatanja ekscitona i otpuštanja energije; F_V/F_0
ET_0/TR_0	transport elektrona dalje od primarnog akceptora; (RC/CS)/(ABS/CS)
RE_0/ET_0	Učinkovitost kojom elektron može reducirati krajnji akceptor elektrona na PSI
PI_{ABS}	indeks fotosintetske učinkovitosti; (RC/ABS) (TR_0/DI_0) [ET_0/(TR_0-ET_0)]
PI_{total}	indeks fotosintetske učinkovitosti pretvorbe energije od ekscitona do redukcije krajnjeg akceptora elektrona na PSI

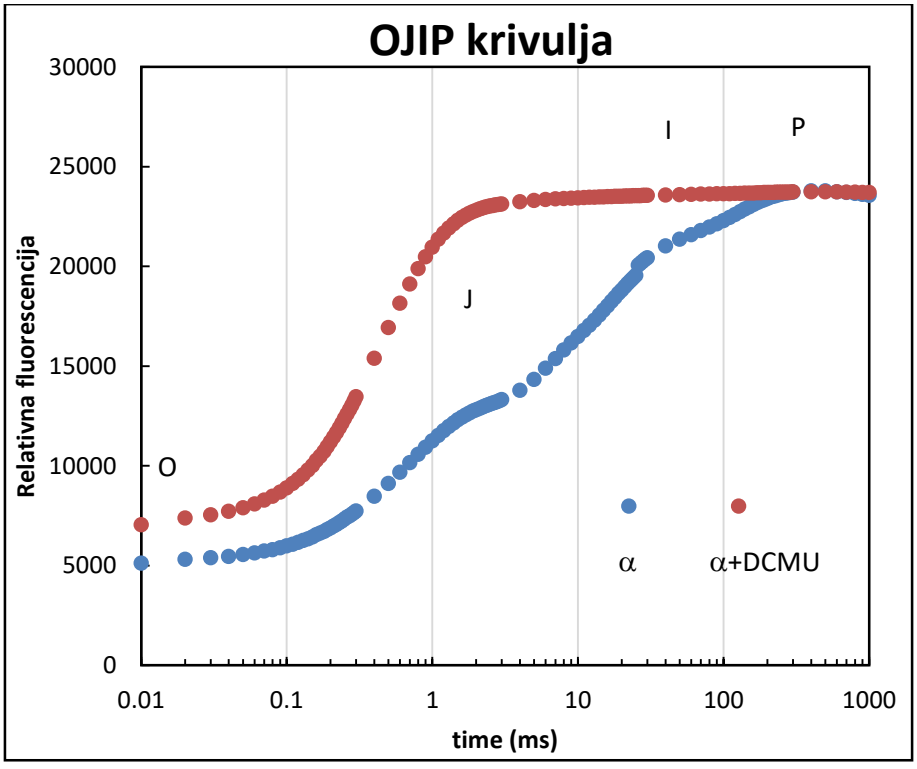
2.4. Statistička obrada podataka

Dobivene vrijednosti korištenih fluorescenciji klorofila *a* obrađene su računalnim programu StatSoft Inc. STATISTICA version 12. Razlike između parametara izmjerenih na lisnim diskovima α-skupine biljaka i β-skupine biljaka, te lisnim diskovima biljaka koje su inhibirane s DCMU-om uspoređene su analizom varijance (One-way ANOVA) nakon čega je primijenjen Fisher LSD (engl. „*Least Significant Difference*“) *post hoc* test. Značajnost je utvrđena na razini $P<0,05$.

3. REZULTATI

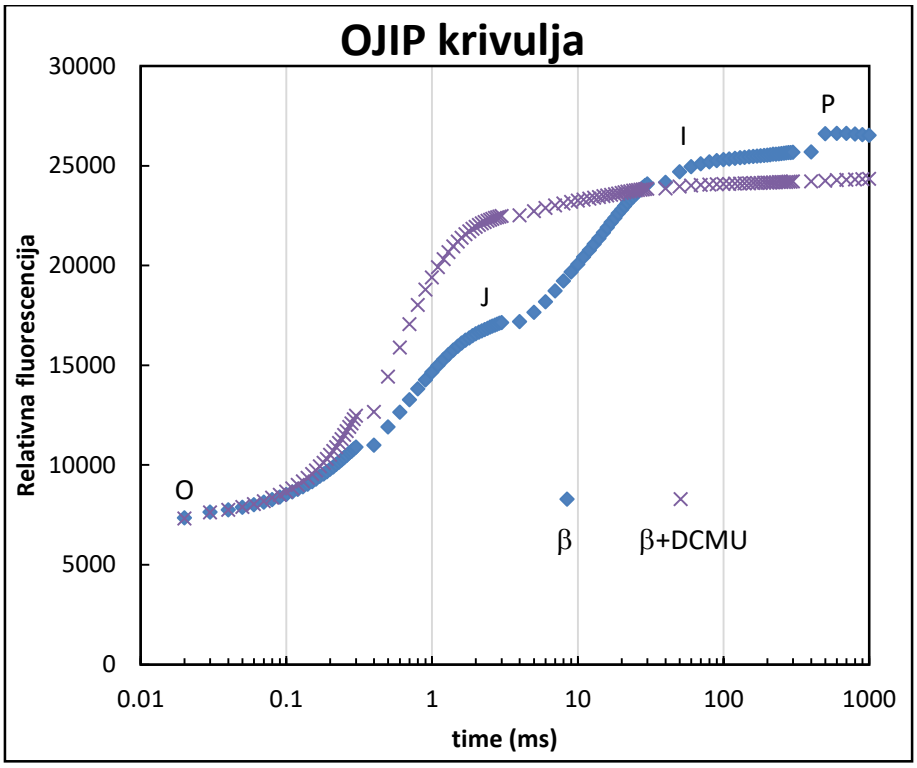
Kako bi istražili utjecaj inhibitora fotosinteze DCMU-a na fotosintetsku učinkovitost lisnih diskova japanskog dvornika, korišteni su sljedeći parametri: F_0- intenzitet fluorescencije nakon 20 μs (O stupanj, minimalna fluorescencija), F_m- maksimalni intenzitet fluorescencije (P stupanj), Area- normalizirana komplementarna površina iznad OJIP krivulje, t_{max}- vrijeme potrebno da se postigne F_m, F_v/F_m- predstavlja mjeru potencijalnog maksimalnog kvantnog prinosa PSII, PI_{abs}- indeks fotosintetske učinkovitosti pretvorbe energije od ekscitona do redukcije akceptora elektrona unutar PSII i PI_{total}- indeks fotosintetske učinkovitosti pretvorbe energije od ekscitona do redukcije krajnjeg akceptora elektrona na PSI.

OJIP krivulja izmjerena na Japanskom dvorniku (*Reynoturia japonica* Houtt.) pokazuje da je tretman DCMU-om povećao nagib O-J krivulje (slika 6). Vrijednost maksimalne fluorescencije u prisutnosti DCMU-a postižu se brže, čime krivulja ima sigmoidalni oblik, te manju površinu iznad nje (Area).



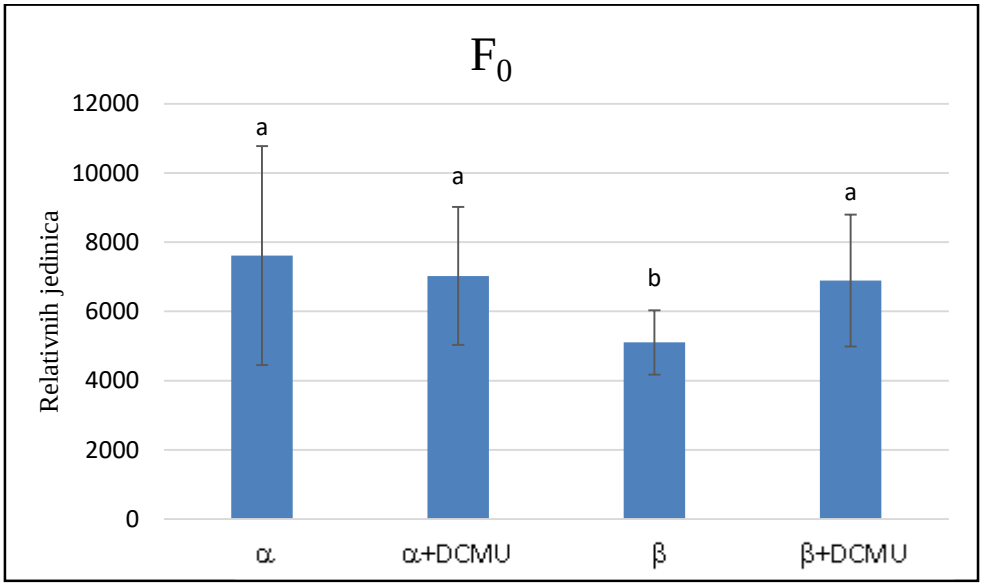
Slika 6. OJIP krivulja izmjerena na lisnim diskovima Japanskog dvornika (*Reynoutria japonica* Houtt*)* α-skupine biljaka tretiranih s 20 μM otopinom DCMU-a. α (plava krivulja) označava kontrolnu skupinu koja nije tretirana s DCMU-om. α+DCMU (crvena krivulja) označava biljke koje se tretirane s DCMU-om.

OJIP krivulja β-skupine biljaka pokazuje kao i u prvom slučaju sigmoidalni oblik krivulje zbog inhibicijskog djelovanja DCMU-a. Area iznad krivulje je veća, dok nagib krivulje je manja kod biljaka β-skupine, nego α-skupine biljaka (slika 7).



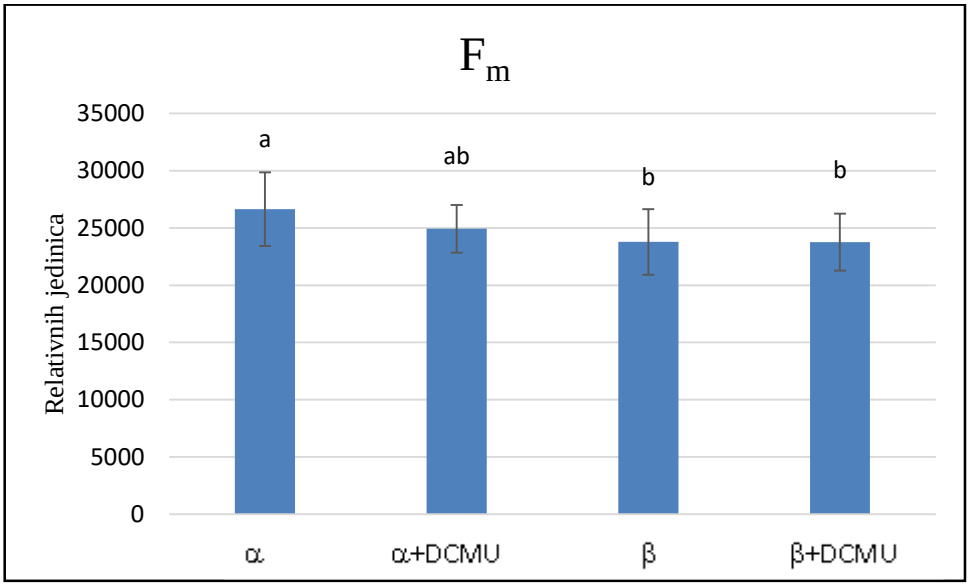
Slika 7. OJIP krivulja izmjerena na lisnim diskovima Japanskog dvornika (*Reynoutria japonica* Houtt*)* β-skupine biljaka uzgojenih u komori pod konstantnim niskim osvjetljenjem, tretiranih s 20µM otopinom DCMU-a. β+DCMU (ljubičasta krivulja) označava biljke koje se tretirane s DCMU-om,a β (plava krivulja) označava kontrolnu skupinu koja nije tretirana s DCMU-om.

Vrijednosti minimalnog intenziteta fluorescencije, F_0, izražene u relativnim jedinicama (slika 8), kretale su se u vrijednosti od 5101,43 (izmjerena u kontrolnoj α-skupini biljaka) do 7609,90 (izmjerena u kontrolnoj β-skupini biljaka). Statističkom analizom utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika između α i α+DCMU. Vrijednosti izmjerene kod biljaka β+DCMU bile su značajno više u odnosu na kontrolu (β).



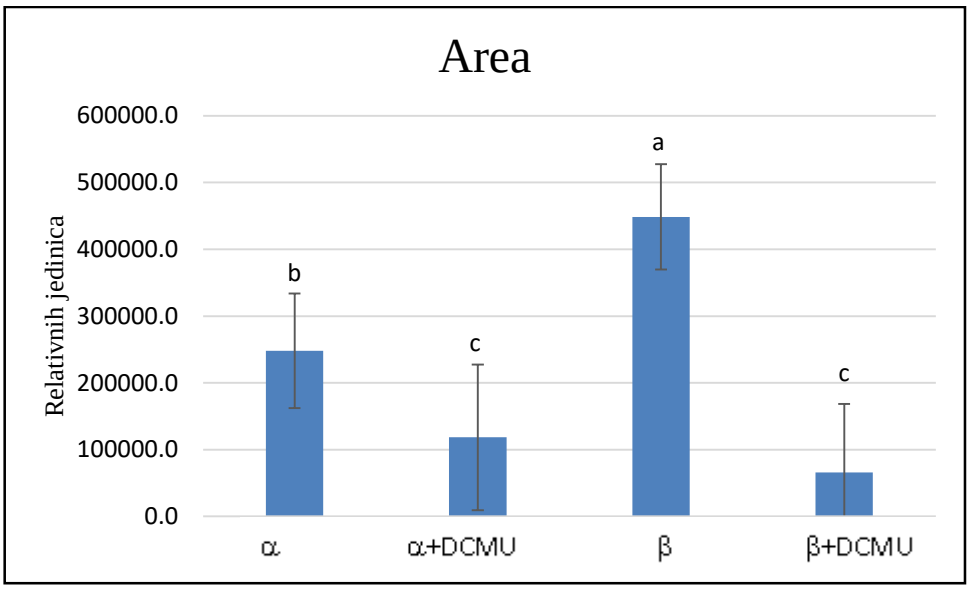
Slika 8. Prosječne vrijednosti i standardne devijacije minimalne fluorescencije klorofila *a* (F_0) izmjerene na lisnim diskovima japanskog dvornika (*Reynoutria japonica* Houtt.). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike prema LSD testu (ANOVA), P<0,05. Vrijednosti parametra prikazane su u relativnim jedinicama.

Vrijednosti maksimalnog intenziteta fluorescencije, $F_{m,}$ izražene u relativnim jedinicama (slika 9), kretale su se u vrijednosti: od 23770,58 (izmjerene u α+DCMU skupini-biljaka) do 26653,70 (izmjerene u β+DCMU skupini-biljaka). Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika između β-skupine i β+DCMU- skupine, ali postoji između njih i α-skupine, dok se α+DCMU-skupina statistički ne razlikuje niti s jednom od prethodno navedenih.



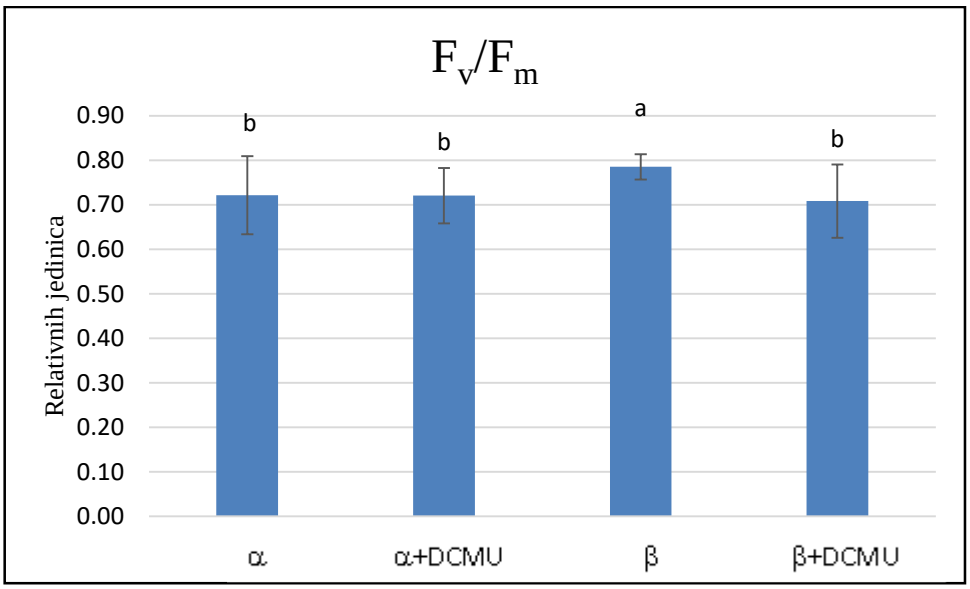
Slika 9. Prosječne vrijednosti i standardne devijacije maksimalne fluorescencije klorofila *a* (F_m) izmjerene na lisnim diskovima japanskog dvornika (*Reynoutria japonica* Houtt.). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike prema LSD testu (ANOVA), P<0,05. Vrijednosti parametra prikazane su u relativnim jedinicama.

Vrijednosti parametra Area„komplementarne površine iznad krivulje, izražene u relativnim jedinicama (slika 10) kretale su se u vrijednosti od 65828,73 (izmjerene za β+DCMU-skupinu biljaka) do 448478,56 (izmjerene za β-skupinu biljaka). Statističkom analizom utvrđeno je da su oba tretmana, α+DCMU-skupine i β+DCMU-skupine značajno niža u odnosu na kontrolne skupine. Također, postoji značajna razlike između kontrola α-skupine i β-skupine, dok se tretmani međusobno ne razlikuju.



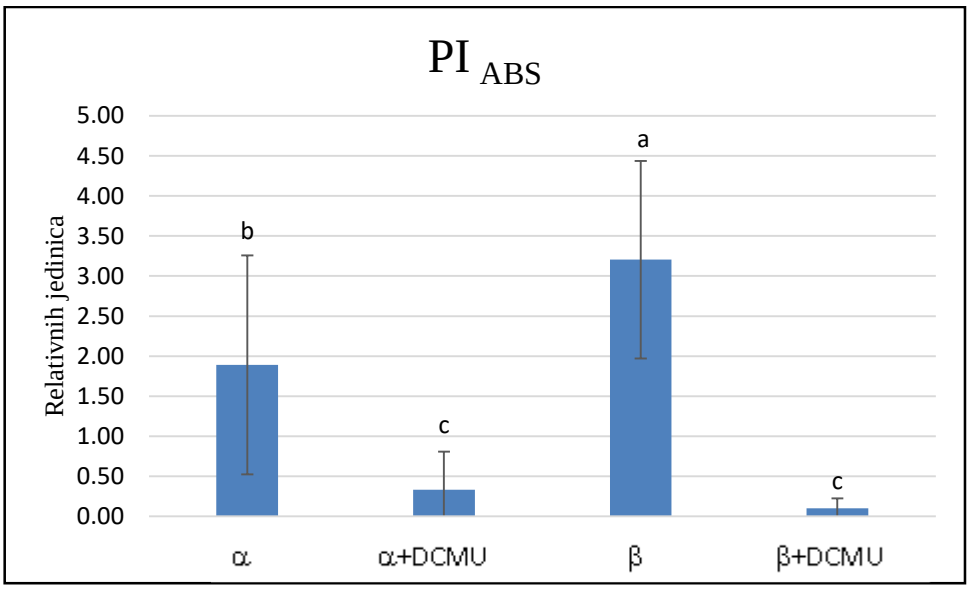
Slika 10. Prosječne vrijednosti i standardne devijacije parametra Area, komplementarne površine iznad OJIP krivulje (*Reynoutria japonica* Houtt.). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike prema LSD testu (ANOVA), P<0,05. Vrijednosti parametra prikazane su u relativnim jedinicama.

Vrijednosti mjere potencijalnog maksimalnog kvantnog prinosa fotosustava II (PSII), F_v/F_m, izražene u relativnim jedinicama (slika 11) kretale su se u vrijednosti od 0,708 (izmjerenih za β+DCMU-skupinu biljaka) do 0,786 (izmjerenih za β-skupinu biljaka). Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika između kontrole α-skupine i tretirane, α+DCMU-skupine. Kontrola β-skupine je značajno viša u odnosu na β+DCMU-skupine biljaka, ali i u odnosu na kontrolu i tretman biljaka α-skupine.



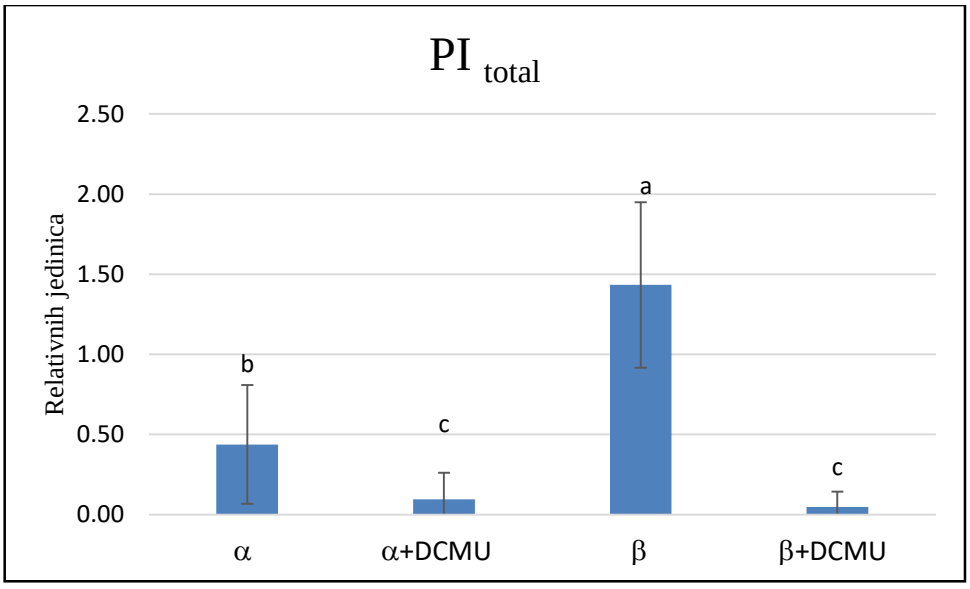
Slika 11. Prosječne vrijednosti i standardne devijacije potencijalnog maksimalnog kvantnog prinosa PSII, F_v/F_m, izmjerene na lisnim diskovima japanskog dvornika (*Reynoutria japonica* Houtt.). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike prema LSD testu (ANOVA), $P<0,05$. Vrijednosti parametra prikazane su u relativnim jedinicama.

Vrijednosti indeksa fotosintetske učinkovitosti $PI_{ABS,}$ izražene u relativnim jedinicama (slika 12) kretale su se u vrijednosti od 0,099 (izmjerenih za β+DCMU-skupinu) do 3,204 (izmjerenih za β-skupinu biljaka). Statističkom analizom utvrđeno je da su oba tretmana, α+DCMU-skupine i β+DCMU-skupine značajno niža u odnosu na kontrolne skupine. Također, postoji značajna razlike između kontrola α-skupine i β-skupine, dok se tretmani međusobno ne razlikuju.



Slika 12. Prosječne vrijednosti i standardne devijacije indeksa fotosintetske učinkovitosti, PI_{ABS}, izmjerene na lisnim diskovima japanskog dvornika (*Reynoutria japonica* Houtt.). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike prema LSD testu (ANOVA), $P<0,05$. Vrijednosti parametra prikazane su u relativnim jedinicama.

Vrijednosti indeksa fotosintetske učinkovitosti pretvorbe energije od ekscitona do redukcije krajnjeg akceptora elektrona na PSI (PI_{total})., izražene u relativnim jedinicama (slika 13). Kretale su se u vrijednosti od 0,4652 (izmjerenih za β-skupinu biljaka) do 1,4330 (izmjerenih za β+DCMU skupinu biljaka). Statističkom analizom utvrđeno je da su oba tretmana, α+DCMU-skupine i β+DCMU-skupine značajno niža u odnosu na kontrolne skupine. Također, postoji značajna razlike između kontrola α-skupine i β-skupine, dok se tretmani međusobno ne razlikuju.



Slika 13. Prosječne vrijednosti i standardne devijacije parametra PI_{total}, mjerene na lisnim diskovima japanskog dvornika (*Reynoutria japonica* Houtt.). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike LSD testu (ANOVA), $P<0,05$. Vrijednosti parametra prikazane su u relativnim jedinicama.

4. RASPRAVA

U radu je proučavan utjecaj DCMU-a na tijek fotosinteze Japanskog dvornika (*Reynoutria japonica* Houtt.*).* Dvije skupine biljaka, α-skupina uzgajana pod utjecajem Sunčeve svjetlosti promjenjivog intenziteta i β-skupina uzgajana pod konstantnim osvjetljenjem niskog intenziteta. Obije su grupe tretirane s DCMU-om.

Fluorescencija Chl *a* osjetljivi je pokazatelj stanja fotosintetskog transporta elektrona, u kojem OJIP krivulja reflektira redukcijsko stanje prenositelja elektrona. Mjerenjem fluorescencije biljaka tretiranih s DCMU-om može se ustanoviti heterogenost antena fotosustava II (PSII). Metodu su po prvi put uveli i predstavili Melis i Homann (1975, 1976) i temelji na evaluaciji vremena koje je potrebno da se postigne CA (engl. *complemetary area* - područje između krivulje fluorescencije i horizontalne linije vrijednosti maksimalne fluorescencije). Autori su determinirali dvije vrste PSII: $PSII_{\alpha}$ koja nema eksponencijalan rast i $PSII_{\beta}$ koja ima eksponencijalni rast (Lazar, Tomek, 2000). $PSII_{\alpha}$ zauzima 75-80% od ukupnog broja PSII i lokaliziran je u membranama grana tilakoida. Središta PSII pokazuju heterogenost u transportu elektrona od reakcijskog centra do plastokinona. Fluorescencija je povezana s količinom reduciranog Q_A, odnosno, krivulja i sam rast fluorescencije uglavnom je determiniran redoks stanjem $Q_{A.}$ (Strasser and Stribet, 2001). DCMU mijenja stopu reduciranog Q_A, kao i intenzitete svjetlosti, a povećanje intenziteta svjetlosti uzrokuje bržu redukciju Q_A. Također, uzrokuje pomak sekundarnog akceptora Q_B iz svog vezujućeg mjesta, D1 proteina na PSII. DCMU nije redoks aktivan i sprječava re-oksidaciju Q_A^- (Lazar, 2003).

OJIP krivulja temelji se na teoriji protoka energije u biomebranama. Definicija i jednadžbe OJIP testa prikazuju se shematski, i to poznatom Z-shemom fotosinteze. Primjenom OJIP testa (Strasser i sur., 2004) moguće je izračunati niz parametara (Tablica 1) koji detaljno opisuju funkcioniranje PSII, glavne komponente transportnog lanca elektrona u kloroplastima. U samim istraživanjima fotosinteze, fluorescencija klorofila *a* je najraširenija metoda.

Nakon izlaganja svjetlosti *in vivo,* klorofil *a* pokazuje promjene u intenzitetu fluorescencije koja pokazuje nagli porast intenziteta u prvoj sekundi mjerenja. Taj porast intenziteta fluorescencije klorofila *a* odražava nakupljanje reduciranog primarnog akceptora elektrona Q_A, što se može prikazati u obliku OJIP krivulje. Na njoj se uočava nekoliko različitih koraka: početna fluorescencija (O), fluorescencija nakon 2 ms (J), fluorescencija nakon 30 ms (I) te maksimalna fluorescencija (P). Kada je OJIP krivulja iscrtana na logaritamskoj vremenskoj skali, ona pokazuje polifazni porast koji predstavlja postupnu redukciju specifičnih prenosioca elektrona. Porast krivulje od O do J koraka predstavlja fotokemijsku fazu, dok JI te

IP porast krivulje predstavljaju nefotokemijsku fazu. Što se više elektrona prenosi u transportni lanac, to će duže fluorescencija ostati niža od maksimalne, a površina iznad OJIP krivulje veća. Biljke su u prirodnom okolišu izložene kombinaciji različitih abiotičkih čimbenika. Oblik OJIP krivulje kao i površina iznad nje izrazito su osjetljive na stres koji izazivaju promjene u okolišu te mogu odražavati fiziološko stanje biljke (Strasser, 2004).

Budući da je OJ faza OJIP krivulje fotokemijska faza, u tom dijelu intenzitet osvjetljenja ima velik utjecaj na nagib krivulje. Na fotokemijsku fazu utječe nekoliko procesa: heterogenost PSII, redoks stanje PQ-pool, povezanost PSII antena. OJ faza odgovara redukciji akceptorskog dijela PSII, gdje dolazi do prijenosa 3 elektrona: jednog elektrona na Q_A, te dva elektrona na Q_B (Toth, 2007). U prisutnosti DCMU, re-oksidacija Q_A^- je inhibirana i samo odcjepljenje jednog naboja je moguće. Prilikom te inhibicije dostiže se maksimalna fluorescencija F_m. Iz grafikona (Slike 6 i 7) je moguće zaključiti da na kinetiku OJ faze utječe DCMU. Biljke tretirane DCMU-om imaju veći nagib krivulje, što može biti povezano s bržom reoksidacijom Q_A (Toth, 2006). Heterogenost PSII utječe na oblik OJ faze. Prema teoriji povezanosti ili grupacije fotosustava, energija ekscitona može migrirati između antena više PSII, što objašnjava sigmoidalni oblik krivulje u prisutnosti DCMU u našem istraživanju.

JI faza se pojavljuje između 2 i 30 ms, neovisno o intenzitetu svjetlosti. Redukcija ukupnog plastokinona (engl. *PQ – pool*) podudara se s JI fazom. Plastokinon igra važnu ulogu u regulaciji elektronskog transportnog kapaciteta (PSII-fosforilaciju, regulacija nekoliko gena koji su povezani s fotosintezom). J korak predstavlja zamjenu reducirane PQ-molekule na Q_B vezujućem mjestu, s oksidiranom, dok I korak predstavlja re-oksidaciju PQH_2. (Toth, 2006). Tretman DCMU-om inhibira re-oksidaciju Q_A što dovodi do povećanja intenziteta fluorescencije na J i I koracima (Toth, 2006). U ovom istraživanju obje istraživane skupine biljaka su pokazale povećanje fluorescencije na J i I koracima (slike 6 i 7) što je rezultat inhibirane re-oksidacije Q_A nakon tretmana DCMU-om.

IP faza predstavlja aktivnost PSI, te ovisi o redukciji ferodoksina (Fd). Re-oksidaciju PQH_2 se odražava u intenzitetu fluorescencije I koraka, dok P korak predstavlja inaktivaciju FNR (ferodoksin $NADP^+$-reduktaze) (Strasser, 2004). FNR postaje inaktivan tijekom adaptacije biljaka u maraku. IP korak se može uzeti kao grubi pokazatelj stanja PSI, odnosno predstavlja redukciju akceptorskog dijela PSI. IP faza je povezana s aktivnošću PSI.

Vrijednosti parametra F_m i F_0 su značajno niže kod kontrolnih biljaka β-skupine u odnosu na kontrolu α-skupine (slike 8 i 9). Nakon tretmana DCMU-om, vrijednost F_0 se povećala samo kod biljaka β-skupine (slika 8). Razlog zbog kojeg su vrijednosti F_0 bile niže kod kontrolne β-skupine biljaka može se pripisati nedovoljnoj količini otvorenih reakcijskih

centara. Taj efekt se može izbjeći ako su biljke prilagođene duljem periodu tame (Strasser, 2004). Izmjerene F_m vrijednosti bile su značajno niže kod biljka β-skupne u odnosu na biljke α-skupine (slika 9). Niža F_m vrijednost kod α-skupine biljaka nego kod β-skupine biljaka može biti i zbog razlike u vakuumiranju, jer prilikom vakuumiranja dolazi do oštećenja u tilakoidnim membranama (Toth, 2006). Također, tretman DCMU-om nije izazvao promjenu ovog parametra (slika 9). Unatoč tome što nije došlo do značajne promjene u intenzitetu samog parametra, maksimalna fluorescencija F_m je nakon tretmana DCMU-om dostignuta prije nego u kontroli (slike 6 i 7). Prijašnja istraživanja su pokazala se maksimum fluorescencije zbog tretmana DCMU-om dostiže već nakon OJ faze jer je u prisutnosti DCMU-a re-oksidacija Q_A inhibirana (Pan, 2009; Lazar, 2005).

Područje iznad OJIP krivulje pruža informacije o broju elektrona koje treba transportirati prije završetka redukcije Q_A, odnosno do postizanja F_m vrijednosti, a naziva se Area (engl. *Complementary area*). Nakon redukcije transportnog lanca elektrona pomoću crvene saturacijske svjetlosti, Area se povećava, što se vidi i iz OJIP krivulje (slike 6 i 7). Jednom kad je plastokinon Q_A reduciran, DCMU ga zadržava u tom obliku jer nema protoka elektrona s elektron transportnim lancem, što se odražava na fluorescenciju, jer je signal fluorescencije direktno povezan s količinom reduciranog Q_A (Toth, 2007). Uzorci α-skupine biljaka imaju značajno više vrijednosti ovog parametra od uzoraka β-skupine biljaka (slika 10). Razlog zbog kojeg su α-skupina biljka imale više vrijednosti parametra Area u odnosu na β-skupinu biljka je taj što su α-skupina biljka bile izložene višim intenzitetima svjetlosti. Naime, nakon izlaganja višem intenzitetu svjetlosti, povećan je broj elektrona koji se moraju ukloniti prije oksidacije transportnog lanaca elektrona (Strasser, 2004). Nadalje, u prisutnosti DCMU, samo jedan elektron bi trebao biti dovoljan za postizanje F_m vrijednosti (Toth, 2006). Prema tome, vrijednosti maksimalne fluorescencije F_m se postiže puno brže u prisutnosti DCMU-a (slike 5 i 6). Mjerenjem fluorescencije klorofila *a* u lisnim diskovima japanskog dvornika izloženog različitim režimima osvjetljenja utvrđena je učinkovitost fotosintetskog aparata. Parametar TR_0/ABS (F_v/F_m) predstavlja mjeru potencijalnog maksimalnog kvantnog prinosa PSII i jedan je od najčešće korištenih indikatora stresa i učinkovitosti fotosinteze. U mnogim biljnim vrstama njegova optimalna vrijednost iznosi oko 0,83. Kontrolne biljke β-skupine imale su značajno više vrijednosti ovog parametra u odnosu na sve ostale ispitivane skupine (kontrola i DCMU-tretman α-skupine te DCMU-tretman β-skupine; slika 11). Niži intenzitet svjetlosti utjecao je na niže F_v/F_m vrijednosti kontrolnih biljaka β-skupine. Budući da ovaj parametar daje informaciju o količini apsorbirane svjetlosti koja se potencijalno može utrošiti u fotokemijskim

procesima (Maxwell i Jonhson, 2000), može se pretpostaviti da su biljke uzgojene na višem intenzitetu svjetlosti sposobne veću količinu energije prevesti u transportni lanac elektrona i utrošiti u fotokemijskim reakcijama. Tretman DCMU-om, koji je pokazao značajno niže vrijednosti ovog parametra kod α-skupine biljaka (slika 11), blokirao je prijenos elektrona dalje od primarnog akceptora u elektronskom lancu elektrona u konačnici je utjecao na smanjenje ukupne učinkovitosti fotosintetskog aparata.

Za detaljniji uvid u vitalnost i učinkovitost fotosinteze izračunat je indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}), parametar koji objedinjuje sve ključne događaje u reakcijskom središtu PSII o kojima ovisi fotosintetska aktivnost. PI_{ABS} obuhvaća tri koraka koja reguliraju fotositetsku aktivnost, reakcijskih središta PSII (RC), hvatanje i ekscitacija energije (TR), te konverzija ekscitacijske energije transportnim lancem elektrona (Toth, 2007). Viša vrijednost ovog parametra izmjerenog u kontroli biljaka β-skupine u odnosu na kontrolu biljaka α-skupine (slika 12) ukazuje da nizak intenzitet svjetlosti u komori predstavlja određeni stres na biljku. Takav niski intenzitet može dovesti do inaktivacije reakcijskih središta što u konačnici utječe na ukupnu učinkovitost biljaka α-skupine. Također, niže vrijednosti PI_{ABS} parametra za uzorke koje su tretirane s DCMU-om ukazuje da DCMU smanjenje funkcionalnost PSII zbog inhibicije plastokinona Q_A. DCMU zadržava Q_A u reduciranom stanju, te sprječava njegovu re-oksidaciju čime PI_{ABS}.

PI_{tot} je indikator fotosintetske učinkovitosti, te je jedan najosjetljiviji parametar OJIP testa jer objedinjuje nekoliko parametara koji se računaju iz OJIP krivulje kao što su: maksimalni kvantni prinos, vjerojatnost prijenosa elektrona dalje od plastokinona, redukciju krajnjeg akceptora elektrona na PSI, te odnos između RC/ABS (Yusuf, 2010). Vrijednosti skupine biljaka koje su tretirane s DCMU-om bile su niže od kontrolnih uzoraka koji nisu tretirani s DCMU-om (slika 13). Također, primijećene niže vrijednosti ovog parametra u odnosu na PI_{abs} (slika 13) kod svih istraživanih skupina. Razlog tome leži u činjenici da je u PI_{tot} uključen dodatni parametar koji opisuje stanje krajnjeg akceptora na PSI (Yusuf, 2010). Prema tome, niže vrijednosti sugeriraju da sve ispitivane skupine biljaka imaju smanjenu sposobnost prijenosa energije do krajnjeg akceptora. DCMU je dodatno utjecao na smanjenje vrijednosti PI_{tot} parametra (slika 13) unatoč tome što ne djeluje direktno na PSI. Inhibicija transporta elektrona na PSII, točnije inhibirana re-oksidacija plastokinona je blokirala je prijenos elektrona dalje od primarnog akceptora, pa sve do krajnjega ackeptora elektrona na PSI.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju istraživanja utjecaja DCMU-a na inhibiciju fotosustava II (PSII) mjerenjem fluorescencije klorofila *a* na listovima japanskog dvornika (*Reynoutria japonica* Houtt.) može se zaključiti slijedeće:

1. DCMU blokira plastokinon vezujuća mjesta i uzrokuje inhibiciju elektronskog transporta između PSII i plastokinona.
2. Lisni diskovi tretirani DCMU-om postižu maksimalni intenzitet fluorescencije F_m brže u odnosu na netretirane što se može očitati i iz površine iznad OJIP krivulje (Area), koja je u tretiranim biljkama manja.
3. Brži porast OJ faze OJIP krivulje u tretiranih lisnih diskova posljedica je inhibicije re-oksidacije primarnog akceptora elektrona Q_A uslijed tretmana DCMU-om
4. Niži maksimalni kvantni prinos PSII (F_v/F_m), indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) te indeks ukupne fotosintetske učinkovitosti (PI_{tot}) pokazuje negativan utjecaj DCMU na učinkovitost čitavog fotosintetskog aparata uslijed blokiranog prijenosa elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A.

6. LITERATURA

Cooper G, Hausman RE. 2004. *The cell: a molecular approach* 3rd edition, Palgrave-Macmillans Global Academic Publishing, Sunderland, SAD, 713 pp.

Guenther JE, Melis A. 1990. The physiological significance of photosystem II heterogeneity in chloroplasts. *Photosynth Res* 23:105-109.

Jansson S. 1994. The light-harvesting chlorophyll *a*/*b*-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1184:1-19

Lazar D. 2003. Chlorophyll *a* fluorescence rise induced by high light illumination of dark-adapted plant tissue studied by means of a model of photosystem II and cnsidering photosystem II heterogeneity. *J theor Biol* 220:469–503.

Lazar D, Ilı´k P, Kruk J, Strza"ka K, Nausˇ J. 2004. A theoretical study on effect of the initial redox state of cytochrome b559 on maximal chlorophyll fluorescence level (FM): implications for photoinhibition of photosystem II. *J Theor Biol* 233:287–300.

Maxwell K, Jonhson GN. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. J Exp. Biol 51:659-668.

Melis A, Homann PH. 1975. Kinetic analysis of the fluorescence induction in 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,l-dimethylurea poisoned chloroplasts. *Photochem Photobiol* 21:431-437.

Melis A, Homann PH. 1976. Heterogeneity of the photochemical centers in system II of chloroplasts. *Photochem Photobiol* 23:343-350.

Nelson DL, Cox MM. 2012. *Lehninger principles of biochemistry, 6th edition*. Freeman WH. & Company, New York, SAD, 1340 pp.

Pan X, Chen X, Wang J, Mu G, Zhu H. 2009. Effect of chromium (VI) on photosystem II activity and heterogeneity of *Synechocystis sp*. (Cyanophyta): studied with *in vivo* chlorophyll fluorescence tests, *J Phycol* 45:386–394.

Porcar-Castell A. 2008. Studying the diurnal and seasoal acclimation of photosystem II using chlorophyll-*a* fluorescence. Academic dissertation, University of Helsinki, Helsinki.1795-7389.

Ridley MS. 1977. Induction of chlorosis by diuron during prolonged illumination *in vitro*. *Plant Physiol* 59:724-732.

Spiering DJ. 2011. Effectiveness of two alternative herbicides compared to a conventional chemical herbicide for control of Japanese knotweed (*Polygonum cuspidatum*). *Bull Buffalo Soc Nat Sci* Vol 40, Universety of Buffalo, New York 14203.

Srivastava A, Ju¨ttner F, Strasser RJ. 1998. Action of the allelochemical, fischerellin A, on photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1364:326–336.

Strasser RJ, Stribet AD. 2001. Estimation of the energetic connectivity of PS II centres in plants using the fluorescence rise O–J–I–P Fitting of experimental data to three different PS II models. *Math Comput Simul* 56:451–461.

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

Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M. 2004. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. u: *Chlorophyll a fluorescence: A signature of photosynthesis*. Vol. 19 Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland, 321-362 pp.

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

Taiz L. Zeiger E. 2003. *Plant physiology*. 3rd *edition*, Vol. 91, *Ann Bot* Issue 6, 750–751 pp.

Voet D, Voet JG 2004. *Biochemistry* 3rd *edition*. University of Pennsylvania, USA, 1616 pp.

Tóth S,Schansker G, Garab G,.Strasser RJ. 2007. Photosynthetic electron transport activity in heat-treated barl ey leaves: The role of internal alternative electron donors to photosystem II *Biochim Biophys Acta* 1767:295–305.

Tóth S. 2006. Analysis and application of the fast Chl *a* fluorescence (OJIP) transient complemented with simultaneous 820 nm transmission measurements. *Annu Rev Clin* 1:409-438.

Xiangliang P, Xi C, Daoyong Z, Jianlong W, Chunnuan D, Guijin Mu, Huaisong Z. 2009. Effect of chromium (VI) on photosystem II activity and heterogeneity of *Synechocystis sp*. (Cyanophyta): studied with *in vivo* chlorophyll fluorescence tests, *J Phycol* 45:386–394.

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

.

Web izvor:

1. http://p2psearcher.info/xanthophyll-absorption-spectrum
2. https://www.chemaxon.com
3. http://linnet.geog.ubc.ca/Images/Drawings/PDPGN0L0U0.jpg