

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
INSTITUT RUĐER BOŠKOVIĆ, ZAGREB**

**Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni doktorski studij
Zaštita prirode i okoliša**

mr. sc. Tomo Trstenjak

**UČINCI OKOLIŠNOG STRESA NA FOTOSINTETSKU
UČINKOVITOST OVOSEZONSKIH I
PROŠLOSEZONSKIH IGLICA ALEPSKOG BORA
(*Pinus halepensis* Mill.)**

Doktorski rad

OSIJEK, 2023.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
INSTITUT RUĐER BOŠKOVIĆ, ZAGREB**

**Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni doktorski studij
Zaštita prirode i okoliša**

mr. sc. Tomo Trstenjak

**UČINCI OKOLIŠNOG STRESA NA FOTOSINTETSKU
UČINKOVITOST OVOSEZONSKIH I
PROŠLOSEZONSKIH IGLICA ALEPSKOG BORA
(*Pinus halepensis* Mill.)**

Doktorski rad

**Doktorski rad predložen je
Sveučilišnom Vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne sveučilišne
doktorske studije
u svrhu stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti
na Poslijediplomskom interdisciplinarnom sveučilišnom doktorskom
studiju *Zaštita prirode i okoliša***

OSIJEK, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorski rad

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni doktorski studij *Zaštita prirode i okoliša*

Znanstveno područje: *Interdisciplinarno područje znanosti*

Znanstveno polje: *Biologija, Poljoprivreda*

UČINCI OKOLIŠNOG STRESA NA FOTOSINTETSKU UČINKOVITOST OVOSEZONSKIH I PROŠLOSEZONSKIH IGLICA ALEPSKOG BORA (*Pinus halepensis* Mill.)

mr. sc. Tomo Trstenjak

Doktorski rad izrađen je u: Laboratoriju poslijediplomskog interdisciplinarnog sveučilišnog studija Molekularne bioznanosti Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Zavodu za agroekologiju i zaštitu okoliša Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor, komentor: prof.dr.sc. Hrvoje Lepeduš, Filozofski fakultet Osijek, prof. dr. sc. Zdenko Lončarić, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Kratki sažetak doktorske disertacije:

Alepski bor je mediteranska drvenasta vrsta koja je tijekom ljetnih mjeseci izložena utjecaju solnog, temperaturnog i svjetlosnog stresa, što može dovesti do preuranjenog otpadanja iglica. Cilj istraživanja je utvrditi razlike u regulacijskim mehanizmima fotosinteze, koncentraciji klorofila, te razliku u koncentracijama odabranih elemenata između ovosezonskih (OS) i prošlosezonskih (PS) iglica. Sukladno tome, provedena je komparativna analiza fotosintetske učinkovitosti u ne-stresnim uvjetima (8-10h), te u uvjetima svjetlosnog i temperaturnog stresa (13-15h). Sadržaj natrija u suhoj tvari iglica je nedvojbeno pokazao utjecaj solnog stresa na PS iglice, u kojima je akumulacija natrija bila oko 4 puta veća u odnosu na OS iglice. Rezultati su pokazali da PS iglice unatoč funkcionalnom fotosustavu II i značajno višem sadržaju klorofila i karotenoida u odnosu na OS iglice imaju slabiju fotosintetsku učinkovitost (PI_{ABS}), te da je tolerancija iglica različite starosti na stresne uvjete regulirana na razini lanca za prijenos elektrona u kloroplastima dalje od primarnog akceptora Q_A .

Broj stranica: 83

Broj slika: 37

Broj tablica: 3

Broj literaturnih navoda: 98

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: alepski bor, fotosinteza, fotosustav II, klorofil, okolišni stres, elementarni sastav iglica, *Pinus halepensis*

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

Doktorski rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Ph.D. thesis

Ruder Bošković Institute

Postgraduate Interdisciplinary University Doctoral Study: *Environmental Protection and Nature Conservation*

Scientific Area: *Interdisciplinary Area of Science*

Scientific Field: *Biology, Agriculture*

ENVIRONMENTAL STRESS EFFECTS ON THE PHOTOSYNTHETIC PERFORMANCE OF CURRENT- AND PREVIOUS-SEASON ALEPPO PINE (*Pinus halepensis* Mill.) NEEDLES

mr. sc. Tomo Trstenjak

Thesis performed at: Laboratory of the Postgraduate Interdisciplinary University Doctoral Study of Molecular Biosciences in Josip Juraj Strossmayer University in Osijek and in the Department of Agroecology and Environmental Protection of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Supervisors: Prof. dr. sc. Hrvoje Lepeduš, Faculty of Humanities and Social Sciences, Prof. dr. sc. Zdenko Lončarić, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Summary:

Aleppo pine is a Mediterranean woody species that are exposed to the influence of salt, temperature and light stress during the summer months, which can lead to premature needles fall off. The research goal was to determine the differences in the regulatory mechanisms of photosynthesis, the concentration of chlorophylls and the concentrations of selected chemical elements, between current-season (CS) and previous-season (PS) needles. In respect to this, the comparative analysis of the photosynthetic performance was measured under non-stressful conditions (8-10 am) and under stressful conditions (1-3 pm). Quantitative analysis of sodium content revealed the effects of salt stress in PS needles since the sodium accumulation was 4 times increased with respect to the CS needles. Results revealed that PS needles had decreased photosynthetic performance (PI_{ABS}) in spite of fully functional photosystem II as well as increased chlorophyll content in comparison to the CS needles. It was also shown that the tolerance differences to the stressful conditions between needles of different age was regulated at the chloroplast electron-transport level, further that the primary electron acceptor Q_A .

Number of pages: 83

Number of figures: 37

Number of tables: 3

Number of references: 98

Original in: Croatian

Keywords: environmental stress, photosynthesis, photosystem II, chlorophylls, chemical elements needles, *Pinus halepensis*

Date of the thesis defense:

Reviewers:

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Tema doktorskog rada: prihvaćena je na sjednici Sveučilišnog vijeća za poslijediplomske interdisciplinarne sveučilišne doktorske studije dana 2. srpnja 2020. godine.

Zahvala

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

Posebno hvala dr. Selmi Mlinarić na pomoći tijekom početka pisanja doktorskog rada.

Hvala mojim kolegicama i kolegama na poslu u sadašnjem Državnom inspektoratu Republike Hrvatske na strpljenju, podršci i brojnim savjetima za preživljavanje u Uredu na poslu.

Također zahvaljujem svim svojim prijateljima koji su mi pomogli prilikom pisanja ovog rada, posebno Ekipi za provode i sprovode.

Najveće hvala mojoj obitelji, pokojnoj supruzi Željki, posebno mojoj djeci, Ariani i Lorenu, kojima posvećujem ovaj rad, da im bude motivacija za daljnji životni put.

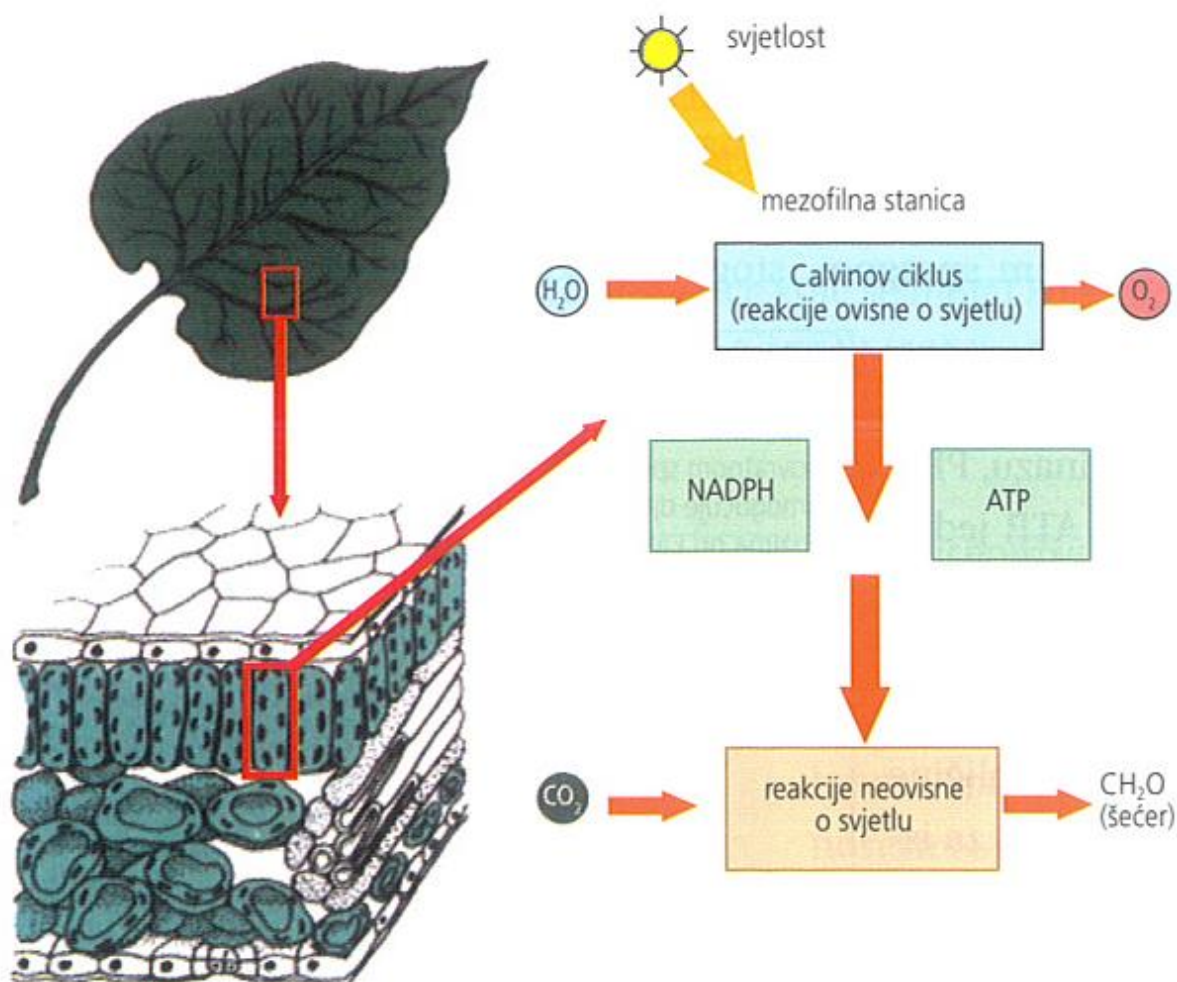
Tomo

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Ciljevi rada i hipoteze	4
2. OPĆI DIO.....	5
2.1. Karakteristike alepskog bora.....	6
2.1.1. Rasprostranjenost	8
2.1.2. Igljice (listovi)	10
2.2. Proces fotosinteze	11
2.2.1. Proteini fotosintetskog lanca transporta elektrona	14
2.2.2. Fotosintetski pigmenti	18
2.3. Fluorescencija klorofila <i>a</i>	20
2.4. Prethodna istraživanja stresa u drvenastih vrsta i fotoinhibicija	23
3. MATERIJALI I METODE	26
3.1. Agroekološki uvjeti.....	27
3.2. Priprema uzorka i analiza sadržaja kemijskih elemenata	27
3.3. Mjerenje polifaznog porasta fluorescencije klorofila <i>a</i> i JIP test.....	28
3.4. Spektrofometrijsko određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata	30
3.5. Statistička obrada podataka.....	30
4. REZULTATI.....	31
4.1. Koncentracija fotosintetskih pigmenata.....	32
4.1.1. Koncentracija klorofila <i>a</i>	32
4.1.2. Koncentracija klorofila <i>b</i>	33
4.1.3. Koncentracija ukupnih klorofila	34
4.1.4. Koncentracija ukupnih karotenoida	35
4.2. Omjeri koncentracija fotosintetskih pigmenata.....	36
4.2.1. Omjer koncentracija klorofila <i>a</i> i klorofila <i>b</i>	36
4.2.2. Omjer koncentracija ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida	37
4.3. Fluorescencija klorofila <i>a</i> i JIP test.....	38
4.3.1. Maksimalni prinos kvanta fotosustava II	38
4.3.2. Indeks fotosintetske učinkovitosti	39
4.3.3. Omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta PSII i klorofila u antenama PSII.....	40
4.3.4. Omjer hvatanja ekscitona i disipacije pobudne energije	41
4.3.5. Prijenos elektrona dalje od primarnog akceptora Q_a	42
4.3.6. Apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu PSII	43
4.3.7. Hvatanje ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu PSII.....	44
4.3.8. Prijenos elektrona po aktivnom reakcijskom središtu PSII	45
4.3.9. Disipacija pobudne energije po aktivnom reakcijskom središtu PSII	46
4.3.10. Gustoća aktivnih reakcijskih središta PSII.....	47
4.3.11. OJIP porast fluorescencije klorofila <i>a</i>	48
4.3.12. Varijabilna fluorescencija u J-stupnju	50
4.3.13. Varijabilna fluorescencija u I-stupnju	51
4.4. Sadržaj kemijskih elemenata.....	52
5. RASPRAVA	54
6. ZAKLJUČCI.....	65
7. LITERATURA.....	69
8. PRILOZI	79
8.1. Popis kratica.....	80
9. ŽIVOTOPIS	81

1. UVOD

Zajedničko obilježje svih fotosintetskih organizama je korištenje svjetlosne energije u procesima sinteze organskih tvari. Pri tome se razlikuju primarni i sekundarni procesi. ATP i NADPH se stvaraju u primarnim procesima uz korištenje svjetlosne energije, dok sekundarni procesi podrazumijevaju njihovo stvaranje i uz odsutnost svjetla. Pri tome se koristi CO_2 i energija uskladištena u ATP i NADPH za stvaranje šećera (slika 1) (Pevalek-Kozlina 2003).



Slika 1. Shematski prikaz procesa fotosinteze
(preuzeto iz Pevalek-Kozlina 2003)

Količina svjetlosti i energije koje padaju na list linearno su proporcionalni. Moguće je oštećenje tilakoidnih membrana u uvjetima prekomjerne opskrbe u odnosu na potrošnju energije. Dio apsorbirane energije se gubi u obliku topline ili se emitira kao mjerljiva fluorescencija klorofila *a* koja može poslužiti kao kvantifikator podjele energije fotokemijskih i nefotokemijskih procesa (Schreiber i sur. 1994, Maxwell i Johnson 2000). Na taj način može se utvrditi fotosintetska učinkovitost zelene mase, tj. listova. Na osnovu iskorištavanja energije može se odrediti fiziološki status lista odnosno vitalnost. Nadalje vitalnost biljke je u izravnoj vezi s razinom stresa koju biljka trpi.

Po definiciji stres je stanje u kojem je poremećena homeostaza biološkog sustava, a predstavlja holističku transakciju između jedinke i mogućeg stresora koja izaziva stresni odgovor. Različit intenzitet stresora, njihova kombinacija i dužina trajanja, utječe na razinu stresa, a to uvijek izravno izaziva smanjenje prinosa i kvalitetu biljaka ispod genetskog potencijala. Smatra se da je 90% biljne proizvodnje u svijetu ugroženo stresom i da stres ima sve veći utjecaj. Stres izaziva veliki broj prirodnih čimbenika koji mogu biti biotski i abiotski.

1.1. Ciljevi rada i hipoteze

Ciljevi istraživanja su utvrditi razlike između ovosezonskih i prošlosezonskih iglica alepskog bora izloženih kombiniranom toplinskom, svjetlosnom i solnom stresu u:

- mehanizmima regulacije fotosinteze na fiziološkoj razini (parametri JIP-testa);
- koncentraciji fotosintetskih pigmenata (klorofila *a*, klorofila *b* te ukupnih karotenoida);
- koncentracijama kemijskih elemenata (Ca, Mg, P, K, Na, Cu, Fe, Mn, Zn, Ni, Pb, Cd).

Sukladno definiranim ciljevima, temeljne hipoteze istraživanja su:

H1: Prošlosezonske iglice usprkos funkcionalnom fotosustavu II i značajno višem sadržaju klorofila u odnosu na ovosezonske iglice imaju slabiju učinkovitost fotosinteze od ovosezonskih iglica u uvjetima opisanog okolišnog stresa.

H2: Tolerancija iglica različite starosti na toplinski i svjetlosni stres regulirana je na razini lanca za prijenos elektrona u kloroplastima.

2. OPĆI DIO

2.1. Karakteristike alepskog bora

Alepski bor (lat. *Pinus halepensis* Mill.) je crnogorična vrsta drveta iz porodice borovki (lat. *Pinaceae*), jedno je od tipičnih, najpoznatijih i najraširenijih stabala na području Mediterana (slika 2). Ime vrste (lat. *halepensis*) sugerira podrijetlo iz Alepa, najvećeg grada u Siriji gdje je prvi put primjećen. Drugi nazivi za ovo drvo uključuju i imena poput jeruzalemski bor, bili bor, sosna, itd. Alepski bor može narasti do visine 20 metara, a tvrda i žilava debla i grane su mu često zakrivljenih linija.



Slika 2. Stablo alepskog bora

(preuzeto s <http://www.plantea.com.hr/alepski-bor/#Staniste>, 15.3.2018.)

Alepski bor se razmnožava sjemenom, brzog je rasta, a životni vijek mu je do 200 godina. Listovi su igličasti, boja iglica varira od svijetlozelene (mlade iglice), plavkastozelene (starije iglice), pa do smeđe kada ujedno počinju otpadati. Duljina odraslih listova je 6-15 cm i najčešće su skupljeni u „čuperku“ po dva, a rijetko i tri lista. Cvijet alepskog bora je jednospolan, razvija se tijekom travnja, najkasnije svibnja. Oblik crveno-smeđih muških cvjetova je valjkast, a ženski se nalaze na drškama dugim do 2 cm i rastu na ovosezonskim izbojcima. Češeri imaju jajast oblik, visećeg su položaja, mogu biti dugi 5 cm, promjera do (slika 3). Sjeme se razvija na plodnim listovima, nakon sazrijevanja sjemenke ispadaju, a kasnije otpadaju i češeri (Tekić i sur. 2014).



Slika 3. Češer Alepskog bora

(preuzeto s https://hr.wikipedia.org/wiki/Alepski_bor#/media/File:Pinus_halepensis_g2.jpg, 15.3.2018.)

Iglice (listovi) alepskog bora pojavljuju se u bifacijalnom i ili izolateralnom obliku. S jedne strane su polukružnog oblika, a sa druge strane su ravni (slika 4).



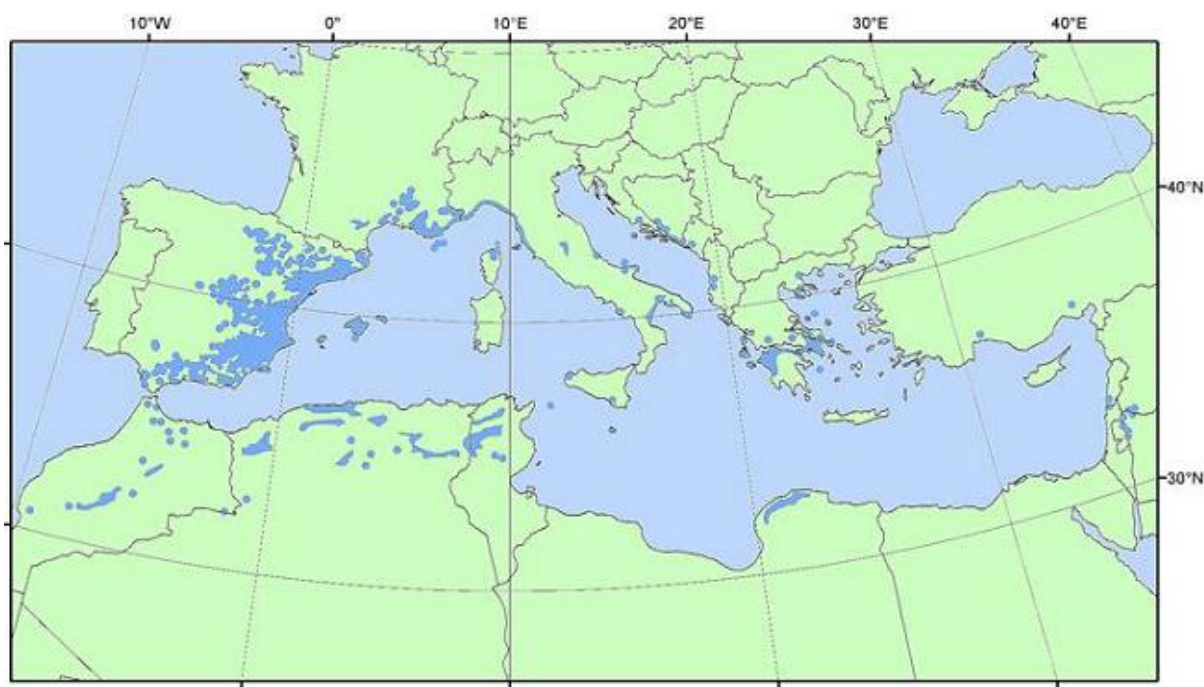
Slika 4. Iglice alepskog bora

(preuzeto s <https://prirodahrvatske.com/2019/08/09/alepski-bor/>, 9.8.2019.)

Alepski bor se upotrebljava u drvenoj industriji, uglavnom se melje i proizvodi iverica. Od iglica se može praviti čaj, a u manjoj mjeri koristi se i u prehrani jer su mu sjemenke jestive. Svjetlija boja lista sugerira produljenje razvoja mladih listova tijekom ljeta bez obzira postoje li stresni okolišni uvjeti kao što su visoka količina svjetlosti, povišena temperatura, vjetar i salinitet (Tekić i sur. 2014).

2.1.1. Rasprostranjenost

Rasprostranjenost alepskog bora duž cijelog Mediterana uvjetovana je iznimno maloj potrebi za vodom, ali i općenitoj otpornosti biljke tijekom duljih sušnih razdoblja. Pogoduje mu mediteranska klima i dobro uspijeva u polusušnim (oborine od 250-500 mm) i umjereno vlažnim (750-1000 mm) područjima (Tekić i sur. 2014, Prgin 2005, Jeddi i sur. 2009). Pogoduju mu skromna i oskudna tla u gotovo svim dijelovima Sredozemlja, pa čak i u šumama većih nadmorskih visina. Ipak, njegova primarna rasprostranjenost je zapadni, a ne istočni Mediteran (slika 5).



Slika 5. Rasprostranjenost Alepskog bora
(preuzeto s EUFORGEN, 2009, 7.11.2015.)

U Republici Hrvatskoj alepski bor se nalazi od Istre do Prevlake, no ipak je znatno češći u srednjoj i južnoj Dalmaciji, najčešće u parkovima. Često se koristi u svrhu pošumljavanja degradiranog krša, posebice nakon požara jer raste umjesto makije. Budući da odbacuje veliku količinu iglica, na ogoljelom kršu se njihovom razgradnjom stvara humus i šumsko tlo (Tekić i sur. 2014, Prgin 2005, Jeddi i sur. 2009).

Dok se na sjevernom Jadranu nalazi uglavnom u šumskim plantažama, u srednjoj Dalmaciji se prirodnim putem proširio i izvan pošumljenih područja, a posebno uspijeva u najtoplijem dijelu Dalmacije na samom jugu gdje pokazuje osobine autohtone vrste, iako u literaturi uglavnom prevladava stav da je autohton samo u obalnom dijelu Dalmacije južnije od Splita, te na otocima južno od Krpnja (Trinajstić 2011).

Sukladno *Pravilniku o područjima provenijencija svojti šumskog drveća od gospodarskog značaja* (Narodne novine br. 107/2008) alepski bor, zajedno s brucijskim borom, nalazi se u oblasti eumediteranskih šuma (0-400 m nadmorske visine). Prema smjernicama iz istog dokumenta, dozvoljeno je koristiti šumski reprodukcijski materijal unutar sjemenske oblasti u dvije sjemenske regije: od Šibenika prema sjeveru (uključujući otoke), te od Šibenika prema jugu (uključujući otoke) (slika 6).

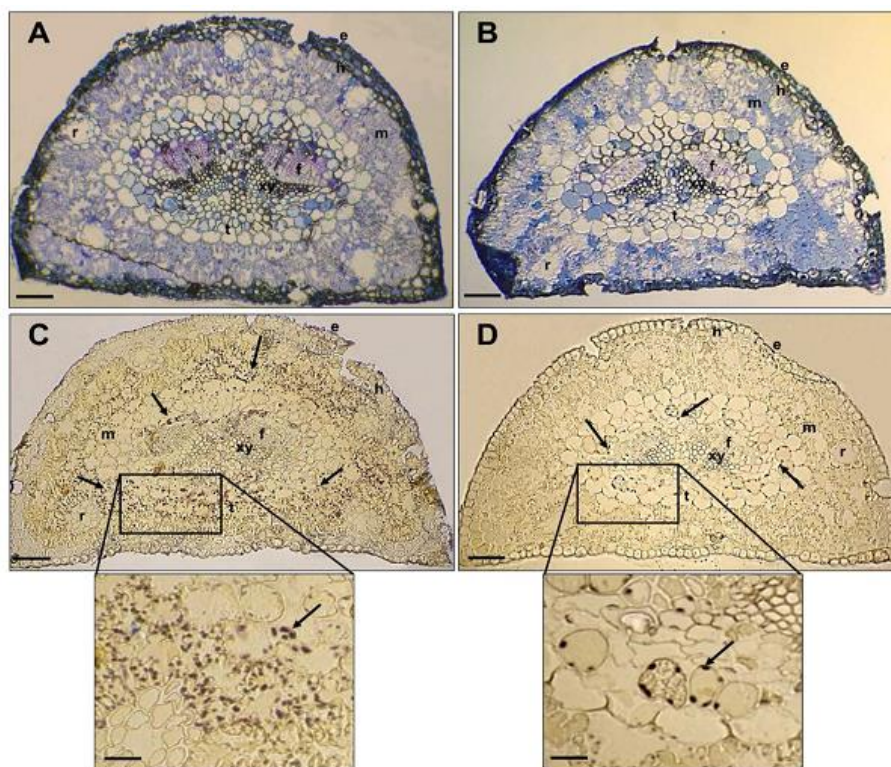


Slika 6. Sjemenske regije alepskog i brucijskog bora
(preuzeto iz Pravilnika o područjima provenijencija svojti šumskog drveća od gospodarskog značaja,
Narodne
novine br. 107/2008)

Alepski bor odlikuje izuzetno brzo širenje na priobalnom području Republike Hrvatske. Osim što mu je pogodovalo nestajanje intenzivnije poljoprivrede, te smanjenje brsta koza i ovaca, njegovom širenju potpomažu česti požari na mediteranskom području. Alepski bor pripada skupini pirofita, odnosno biljaka čije širenje potpomažu požari. Za vrijeme i poslije požara njegovi češeri pucaju i spaljene površine zasiju sjemenom, pa broj po 1 hektaru tla može varirati i do preko milijun jedinki. Takav gusti pokrov onemogućava preživljavanje ostalim vrstama, ali postaju i smetnja jedni drugima, pa i njihova stabla postaju slabije razvijena.

2.1.2. Iglice (listovi)

Iglice alepskog bora odlikuje polukružni oblik, a obavijene su jednoslojnom epidermom lignificiranih stijenki, lumen je reduciran, ograđene jažice, debela kutikula i puči kseromorfnog tipa koje su uvučene u jamice ispod razine epiderme, a raspoređene su u nizovima (slika 7) (Trstenjak i sur. 2020).



Slika 7. Presjeci iglica alepskog bora (prošlosezonske iglice – A i C; ovosezonske iglice – B i D) (preuzeto iz Trstenjak i sur. 2020)

Presjeci (A, B) obojeni su s 0,05% toluidin plavo. Presjeci (C, D) obojeni su Lugolovom otopinom radi otkrivanja raspodjele zrnaca škroba (e - epiderma, h -hipoderma, m - mezofil, xy - ksilem, f - floem, t - transfuzijsko tkivo, r - kanal od smole, Bar = 200 μm , umetanje šipke = 15 μm).

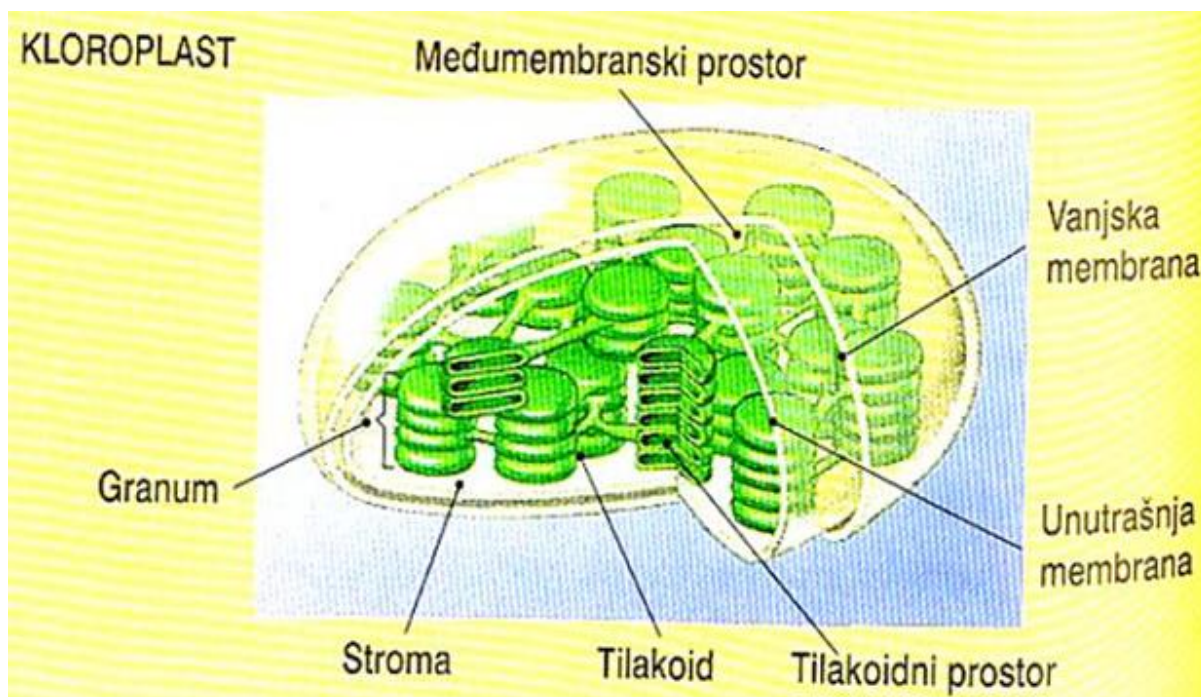
Ispod epiderme je hipoderma koja se sastoji od jednoslojnih sklerenhimskih stanica. Višeslojnost je prisutna na kutevima i daje čvrstoću listu. U sredini iglice su dvije kolateralne žile. Ksilem je okrenut prema gore, a floem prema donjoj strani lista. Žile su okružene staničjem građenim od neživih stanica s dvostruko ograđenim jažicama koje primaju vodu iz ksilema. Asimilati dolaze do floema preko živih parenhimskih stanica. Žile i transfuzijsko staničje obavijeni su jednoslojnom endodermom koje odlikuje staničje zadebljanih, lignificiranih stijenki. Između endoderme i hipoderme je mezofil čije stanice odlikuje nabranost stijenki prema unutra. Tanka celulozna stijenka omogućava veću asimilacijsku površinu. Između stanica nabranog parenhima su shizogeni intercelulari kroz koje prolaze smolni kanali koji se ne granaju, a pružaju se uzduž iglice. Oko smolnih kanala je žljezdani epitel, a obavijaju ga stanice likovnice (Trstenjak i sur. 2020).

Iglice alepskog bora vrlo dobro se prilagođavaju umjerenim dnevnim i sezonskim promjenama, no neke promjene u svom okolišu mogu dovesti do oksidativnog stresa, a u kombinaciji s nekim dodatnim čimbenicima, poput visoke ili niske temperature, može doći i do fotoinhibicije (Murata i sur. 2007).

2.2. Proces fotosinteze

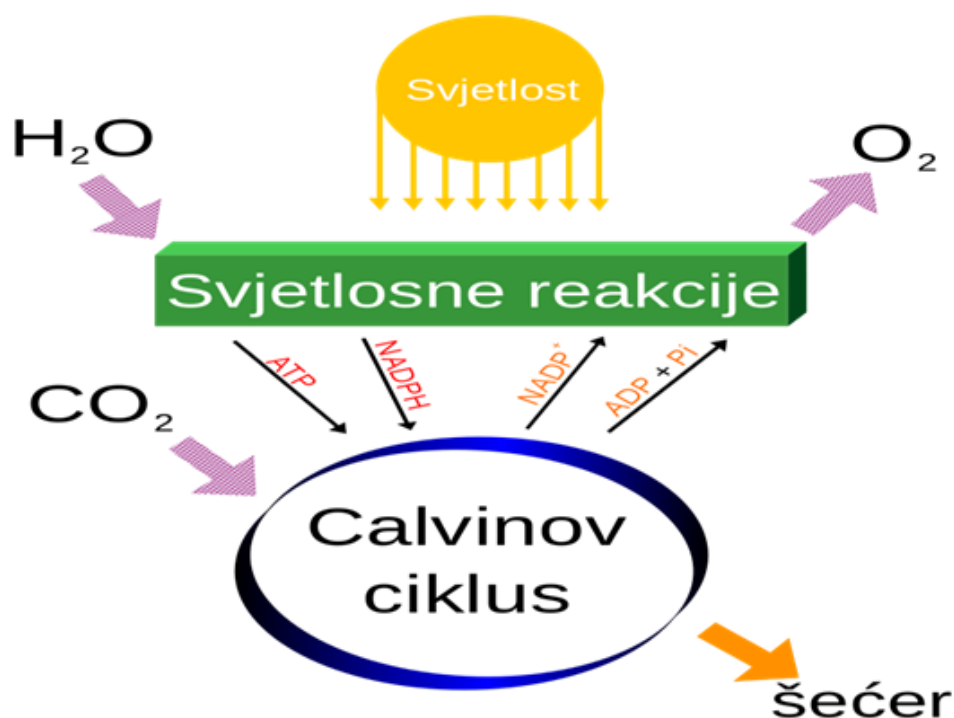
Proces u kojem se energija dobivena iz sunčeve svjetlosti pretvara u kemijsku energiju naziva se fotosinteza. Ona je ujedno i jedini biološki proces u kojem djelovanjem sunčeve svjetlosti anorganske tvari mogu tvoriti organske spojeve. Glavni proizvod fotosinteze su ugljikohidrati koje biljka koristi kao hranu, a nusproizvod je kisik.

Ovako važan proces obavlja se prije svega u biljkama, primarno u listovima, te u nekim algama i cijanobakterijama. Takve tzv. fotoautotrofne biljke u procesu fotosinteze svjetlosnu energiju koriste kako bi sintetizirale organske molekule, odnosno pretvorile sunčevu energiju u kemijsku. Proces fotosinteze odvija se u kloroplastima, fotosintetski aktivnim plastidima, organelima ovalnih oblika, promjera 4-8 μm . Njihov broj u stanicama je varijabilan, obično se u mezofilnoj stanici nalazi od 30 do više od 100 kloroplasta. Ovisno o razvojnoj fazi i utjecaju okoliša, broj i oblik kloroplasta može drastično varirati. Kloroplasti u svojim stanicama sadrže svi zeleni dijelovi biljke, dakle ne samo listovi, nego i zelene stabljike i nedozreli plodovi. Ipak, glavni organi biljaka u fotosintezi su listovi u kojima na 1 mm^2 površine lista dolazi oko 500.000 kloroplasta (Pevalek-Kozlina 2003). Kloroplast (slika 8) je obavijen ovojnicom koju čine dvije membrane. Unutrašnjost kloroplasta se puni stromom, tj. proteinskim matriksom unutar kojeg se nalaze tilakoidi koji nastaju uleknućima unutrašnje membrane, a nakupine tilakoida čine granuume. Na tilakoidnim membranama smješten je čitav niz proteinskih kompleksa povezanih s pigmentima, te drugi spojevi važni za prijenos elektrona u procesu fotosinteze. Iako je dakako najvažnija funkcija kloroplasta fotosinteza, u njima se odvija i sinteza lipida, masnih kiselina i škroba.



Slika 8. Shematski prikaz građe kloroplasta
(preuzeto iz Pevalek-Kozlina 2003)

Primarne (svjetlosne) reakcije odvijaju se u tilakoidnim membranama kloroplasta i u njima se apsorbirana svjetlosna energija koristi za stvaranje adenozin-trifosfata (ATP) i nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfata (NADPH). Pri tome je nužna apsorpcija fotona svjetlosti uz pomoć fotosintetskih pigmenata. To znači da u tilakoidnim membranama oksidira voda, a otpušta se kisik. Sekundarne reakcije ili reakcije neovisne o svjetlosti (poznate i kao reakcije tame, odnosno Calvinov ciklus), odvijaju se u stromi kloroplastima i u njima se energija pohranjena u ATP-u i NADPH koristi za stvaranje šećera iz CO_2 , odnosno događa se redukcija ugljikovog dioksida (slika 9) (Voet i Voet 2004).



Slika 9. Pojednostavljeni prikaz odnosa svjetlosnih reakcija fotosinteze i Calvinovog ciklusa
(preuzeto s <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=7995029>, 2.3.2016.)

Calvinov ciklus, odnosno fotosintetski C₃-redukcijski ciklus ugljika je mehanizam kojim svi fotosintetski eukarioti reduciraju CO₂ do ugljikohidrata, a svi drugi mehanizmi povezani sa CO₂ zapravo su pomoćni ili čak ovisni o njemu. ATP služi kao izvor energije, a NADPH kao izvor elektrona potrebnih za redukciju CO₂.

Intenzitet i produktivnost fotosinteze ovise o brojnim čimbenicima, kao što su: koncentracija fotosintetskih pigmenata u listovima, veličina i položaj listova te trajanje i starost listova.

U mlađim i još nepotpuno razvijenim listovima količina klorofila je ispod optimalne razine, pa je stoga i proces fotosinteze smanjenog intenziteta. Stariji listovi imaju manje fotosintetskih pigmenata ne samo zbog normalnog vegetacijskog procesa, nego i zbog nedostatka nekih kemijskih elemenata poput magnezija, željeza ili dušika. Istraživanja ipak pokazuju da u uvjetima optimalne količine minerala i vode fotosinteza nije izravno određena koncentracijom klorofila, ali to isto ne vrijedi u uvjetima stresa ili tijekom starenja jer dolazi do degradacije kloroplasta (Horak 2015).

Veća površina listova biljke podrazumijeva i povećanu sposobnost upijanja svjetlosti i ugljičnog dioksida iz atmosfere, no u praksi fotosintetski kapacitet nikada nije idealan zbog same građe biljke. Veći listovi mogu smetati listovima u sjeni, te se time i onemogućava optimalni i ravnomjerni fotosintetski proces. Mnoge biljke nastoje apsorpcijske i temperaturene probleme regulirati sukladno trenutnom stanju razine svjetlosti i temperature (Horak 2015).

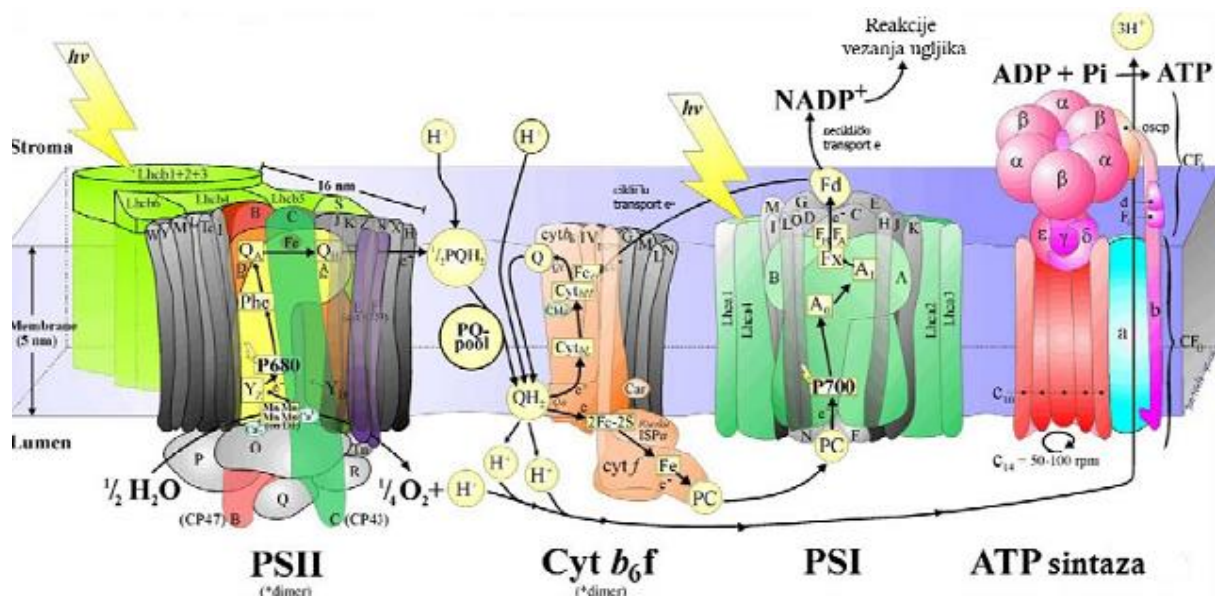
Trajnost i starost listova ovisi o unutrašnjim i vanjskim čimbenicima, no sasvim je jasna pozitivna korelacija između dužine trajanja zelene fotosintetički aktivne lisne površine i fotosintetske produkcije. Starost lisne mase uvjetuje nijansu listova i glatkost površina, stariji su listovi općenito tamnijih nijansi, slabije sjajnosti i hrapavije površine, što znači da mogu upiti više svjetlosti od mladih listova koji značajno više odbijaju svjetlost. Mladi listovi još nemaju potpuno funkcionalan fotosintetski sustav, a to podrazumijeva veću osjetljivost na ekološke čimbenike stresa (Horak 2015).

Veća izloženost svjetlosti mladih listova i podložnost svjetlosnom oštećenju uvjetovani su položajem (vrhovi grana), stoga su ranoj fazi razvoja mladih listova aktivniji mehanizmi zaštite. (Jiang i sur. 2004, Jiang i sur. 2006, Lepeduš i sur. 2011). Iako je kod mladih listova niža fotosintetska učinkovitost, skloniji su većoj fotoinhibiciji i disipaciji koja služi kao mehanizam zaštite od svjetlosnog stresa. (Chen i sur. 2017). S druge strane, na fotosintetski proces osim temperature, utječu i drugi ekološki čimbenici kao što su: intenzitet, spektralni sadržaj i dužina trajanja svjetlosti, koncentracija CO₂ i O₂ u atmosferi te vlažnost. Iako utjecaj svih ovih čimbenika ovisi i o genetici biljaka (npr. radi li se o skiofitima ili heliofitima), povećanjem intenziteta svjetlosti povećava se linearno i produkcija fotosinteze, ali samo do određene granice (svjetlosnog zasićenja) kada njezino daljnje povećanje nema utjecaja osim moguće fotoinhibicije, odnosno dolazi do svojevrsnog zasićenja svjetlošću (Demmig i sur. 1987). Koliko će brzo doći do zasićenja ovisi o vrstama biljaka, primjerice sirak, kukuruz i šećerna repa čak ni pri vrlo intenzivnoj svjetlosti ne dostižu svjetlosno zasićenje jer je njihova prerada CO₂ vrlo djelotvorna (Pevalek-Kozlina 2003). Do određene granice povećanje koncentracije CO₂ povoljno utječe na fotosintezu, kao što i smanjenje koncentracije CO₂ u atmosferi iznad određene visinske granice (nadmorska visina) može kod nekih vrsta izazvati smanjenje fotosintetskih procesa. S druge strane, koncentracija kisika i intenzitet fotosinteze kod određenih biljnih vrsta mogu biti u negativnoj korelaciji.

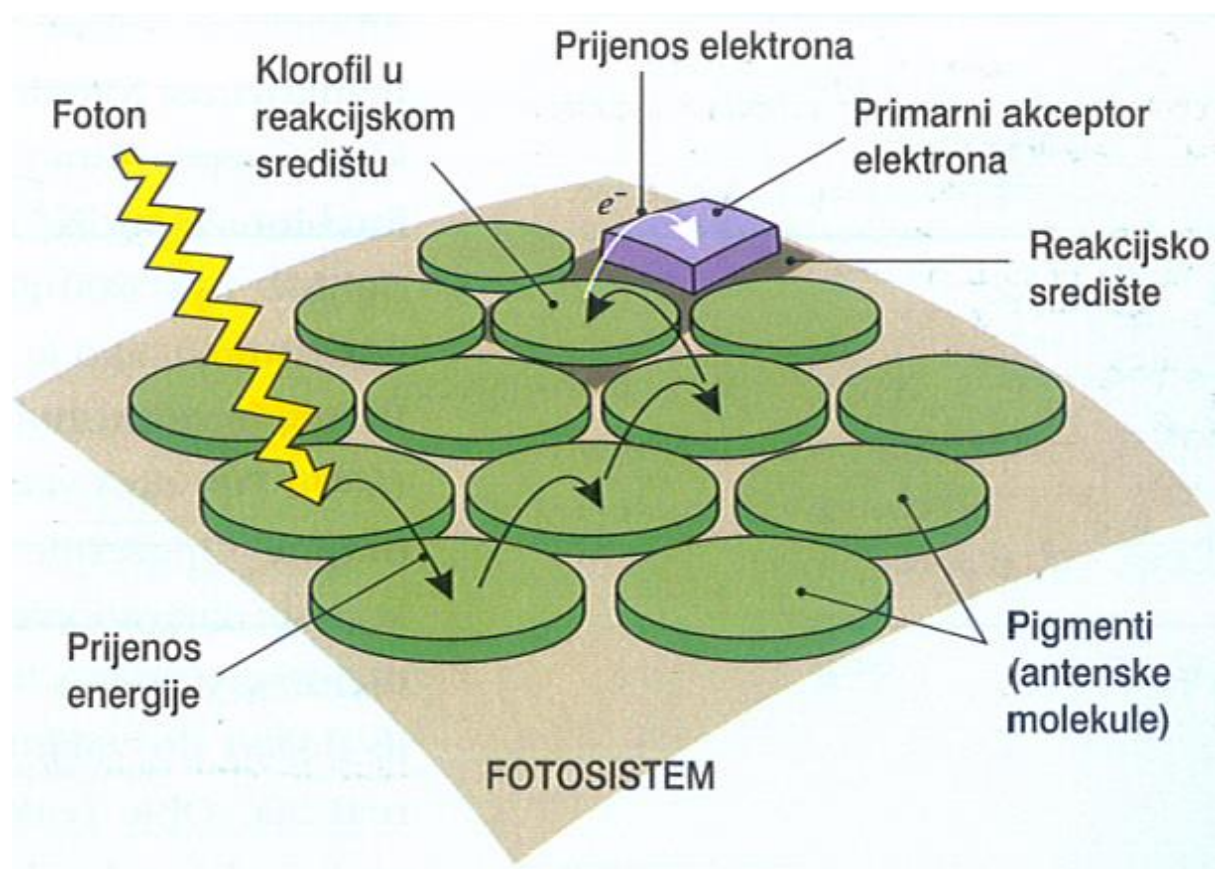
Što se tiče vlažnosti i ovdje su primjetne razlike među nekim skupinama biljaka: tako npr. kserofiti poput kaktusa i agava dobro podnose nisku ili gotovo ništavnu količinu vode spremajući ju u svoje mesnate stabljike.

2.2.1. Proteini fotosintetskog lanca transporta elektrona

U tilakoidnim membranama nalaze se dva tipa fotosustava međusobno povezanih transportnim lancem elektrona, no s različitim reakcijskim središtima i antenskim pigmentima prikazano na slici 11 (Pevalek-Kozlina 2003). Glavnu ulogu u procesu fotosinteze imaju 2 proteinska kompleksa: fotosustav II (PSII), citokrom *b₆f*-kompleks (*cytb₆f*), fotosustav I (PSI) i ATP sintaza (slika 10). Reakcijska središta (RC) PSII, kao i njihovi kompleksi za prikupljanje svjetlosti (LHCII) smješteni su u grana tilakoidima, dok su PSI i ATP sintaza smješteni u stroma tilakoidima te u rubnim dijelovima grana tilakoida koji graniče sa stromom. Kompleks *cyt b₆f* raspodjeljen je uniformno i u stroma i u grana tilakoidima (Toth 2006).



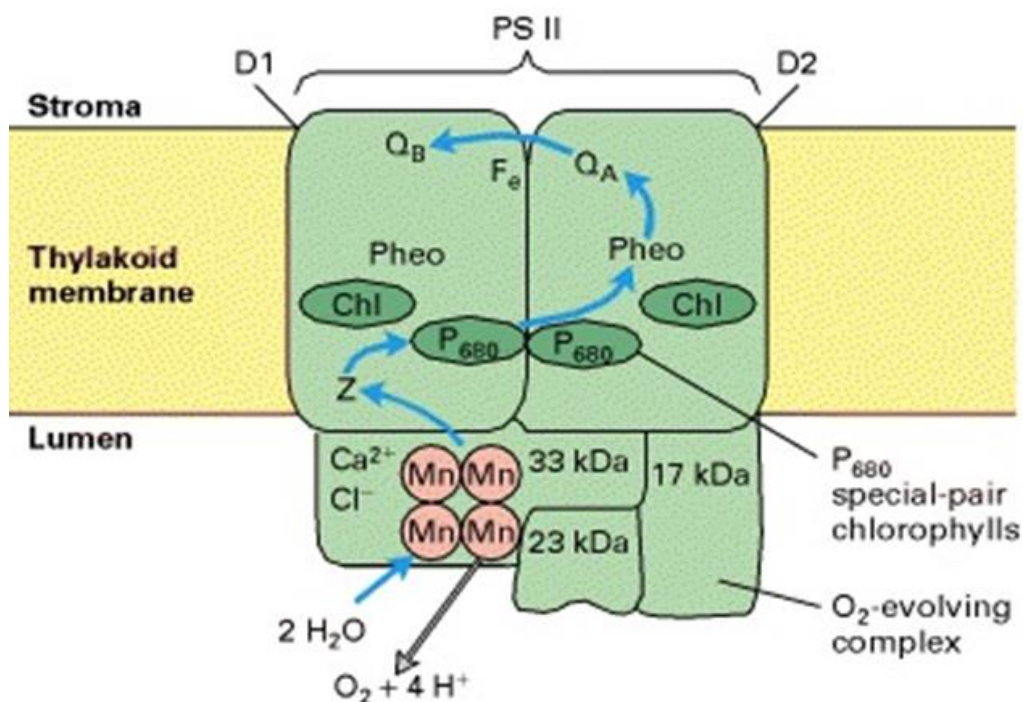
Slika 10. Shematski prikaz strukturne organizacije fotosintetskog lanca transporta elektrona u tilakoidnim membranama kloroplasta
(preuzeto s <http://www.bio.ic.ac.uk/research/nield/downloads.html>, 17.9.2010.)



Slika 11. Shematski prikaz mehanizma apsorpcije i hvatanja fotona u fotosustavu II
(preuzeto iz Pevallek-Kozlina 2003)

Proteinski kompleks PSII građen je od antena kompleksa za prikupljanje svjetlosne energije (LHC, engl. „*light harvesting complex*“) i reakcijskih središta (RC, engl. „*reaction center*“). Antene sadrže više stotina molekula pigmenata, najviše klorofila *a*, a zatim i klorofila *b* i karotenoida. Funkcija antena je apsorpcija fotona i prijenos apsorbiranih fotona do reakcijskih središta PSII (slika 11). Reakcijsko središte PSII sastoji se od oko 25 proteinskih podjedinica, sadrže specijaliziranu molekulu klorofila *a* oznake P₆₈₀, a koja apsorpcijski maksimum postiže pri crvenoj svjetlosti valne duljine 680 nm. Glavninu reakcijskog središta čine proteinske podjedinice D1 i D2 koje se protežu tilakoidnom membranom, a s kojima su kompleksirane četiri molekule klorofila i dvije molekule feofitina (Toth 2006). Fotosustav II ima funkciju voda-plastokinon oksidoreduktaze, budući da povezuje proce oksidacije vode na OEC kompleksu (OEC, eng. „*oxygen evolving center*“) i redukciju plastokinona A (Q_A) (slika 11). OEC kompleks sastoji se od tri proteina (slika 12). Radi se o ekstrinzičnim proteinima 33, 23 i 17 kDa. OEC sadrži četiri iona mangana (Mn), te ione kalcija (Ca²⁺) i klora (Cl⁻) (Porcar i Castell 2008).

Nakon redukcije primarnog akceptora (Q_A) dolazi do redukcije sekundarnog akceptora Q_B koji može primiti dva elektrona i dva protona, prilikom dvostruke redukcije i protonacije. Sekundarni akceptor Q_B difundira u tilakoidnu membranu stvarajući skup molekula plastokinona (PQ- pool) (Keren i sur. 2011). Taj niz redoks reakcija naziva se plastokinonski (Q) ciklus. Negativni naboj koji je nastao primitkom dva elektrona, molekula Q_B²⁻ kompenzira preuzimajući dva protona iz strome (Cardona i sur. 2012). Nastala molekula PQH₂ (Q_B H₂) difundira do *cyt b₆f* kompleksa, gdje se elektron predaje FeS proteinu (Rieskov protein) na akceptorskoj strani kompleksa, te dalje do *cyt f*. Reoksidacijom PQ dva protona se otpuštaju u lumen. Ti protoni doprinose nastanku protonskog gradijenta preko tilakoidne membrane (Osyczka i sur. 2005). Smatra se da je reoksidacija PQH₂ najsporiji korak u lancu transporta elektrona. Prekomjerna količina svjetlosti, neodgovarajuća temperatura, nedostatak vode i sl., uzrokuju tzv. oksidacijski stres (Hideg i sur. 2000).



Slika 12. Pojednostavljeni sematski prikaz fotosustava II

(preuzeto s <https://biology.stackexchange.com/questions/60196/is-the-water-splitting-enzyme-a-component-of-photosystem-ii>, 15.5.2018.)

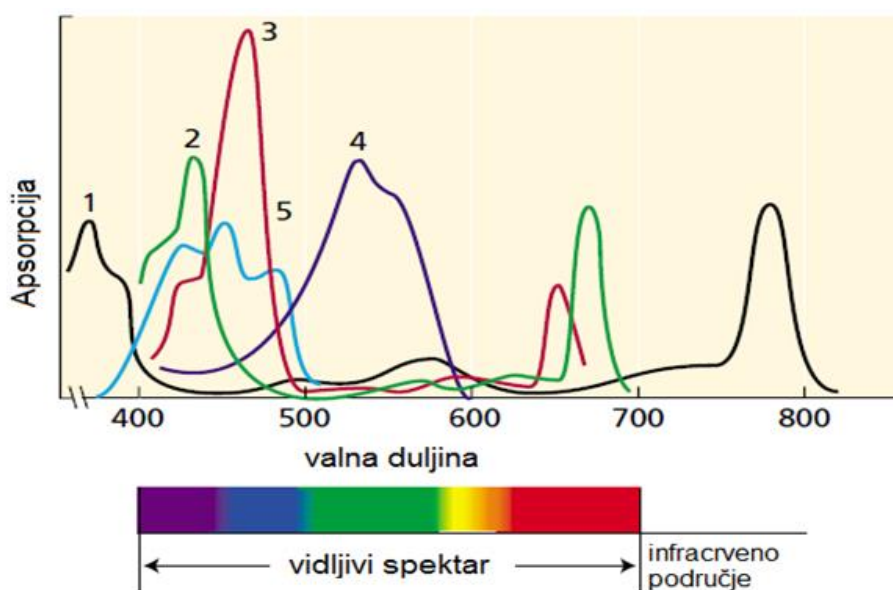
Citokrom *b₆f* (*cyt b₆f*) posreduje u prijenosu elektrona između fotosustava I i fotosustava II. Integralni membranski proteinski kompleks građen je od 3 male i 4 velike podjedinice: *cyt b₆*, *cyt f*, željezo-sumpornog proteina (Riske-ovo FeS središte), podjedinice IV, te 2 hem-*b* molekule (Whitmarsh 1998, Toth 2006).

Fotosustav I (PSI) se sastoji od antena kompleksa za prikupljanje svjetla i reakcijskih središta, a djeluje kao plastocijanin-feredoksin oksidoreduktaza (Amuntus i sur. 2008). PSI je odgovoran za prijenos elektrona sa plastocijanina (PC) na feredoksin (Fd), proteinom s aktivnim mjestom od dva atoma željeza vezanih uz dva atoma sumpora. Nakon niza reakcija, pobuđeni elektron prelazi u enzim feredoksin-NADP⁺ reduktazu, koji reducira NADP⁺ u NADPH. U reakcijskom središtu PSI je specijalizirana molekula klorofila P₇₀₀ koja apsorpcijski maksimum postiže pri tamnocrvenom svjetlu valne duljine 700 nm. S gore spomenutom molekulom P₆₈₀ iz fotosustava II dijeli istu strukturu, no budući da su povezani različitim vrstama proteina, to ih čini različitim u pogledu apsorpcijskog spektra i unutrašnje raspodjele elektrona. Dok u PSII postoji otprilike podjednaka količina klorofila *a* i *b*, u PSI je manje klorofila *b* (Lopez i Barclay 2017, Johnson 2016).

ATP sintaza ključni je enzim za sintezu ATP-a. To je membranski proteinski kompleks (CF₀-CF₁ kompleks), građen od dvije velike podjedinice. ATP sintazu pokreće transmembranski elektrokemijski protonski gradijent (Lopez i Barclay 2017, Johnson 2016).

2.2.2. Fotosintetski pigmenti

Pigmenti (lat. „*pigmentum*“, boja) su tvari koje određuju boje kod živih organizama. To je bilo koja tvar koja apsorbira određenu valnu duljinu svjetlosti. Kod fotosintetskih pigmenata radi se o molekulama koje apsorbiraju svjetlost i to različitih valnih duljina. Oni prenose apsorbiranu svjetlosnu energiju na elektrone koji ulaze u kemijske procese. Za proces fotosinteze najvažniji su klorofil *a*, klorofil *b* i karotenoidi koji služe za apsorpciju fotona i prijenos energije do klorofila *a*. Slika 13 prikazuje apsorpcijske spektre nekih fotosintetskih pigmenata.



Slika 13. Apsorpcijski spektri fotosintetskih pigmenata: 1. bakterioklorofila *a*; 2. klorofila *a*; 3. klorofila *b*; 4. fikoeritobilina; 5. β -karotena
(preuzeto i prilagođeno prema Zeiger i Taiz 2002)

Kod većine zelenih biljaka klorofil *a* je glavni fotoreceptor u kloroplastu. Apsorbira svjetlost na dvije valne duljine, 420 i 670 nm, odnosno u prvom slučaju u području plave, a u drugom u području crvene svjetlosti, dok većinu ostale radijacije propusti. Klorofil *a* odlikuje porfirinska struktura plavozelene boje. Sustav se sastoji od četiri pirolska prstena s ionom magnezija Mg^{2+} u sredini. Ioni magnezija povezani su u prsten. Klorofil *a* najvažniji je za fotosintetski proces obzirom da se nalazi u reakcijskim središtima oba fotosustava, te ima temeljnu ulogu u pretvorbi svjetlosne u kemijsku energiju (Pevalek-Kozlina 2003).

Klorofil *b*, pigment žutozelene boje može količinski biti prisutan i do trećine koncentracije klorofila *a*, važan je za učinkovitu apsorpciju svjetlosti valnih duljina 450, 500 i 642 nm. Za razliku od klorofila *a* koji na pirolskom prstenu ima metilnu, klorofil *b* ima aldehidnu skupinu (Heldt 1997).

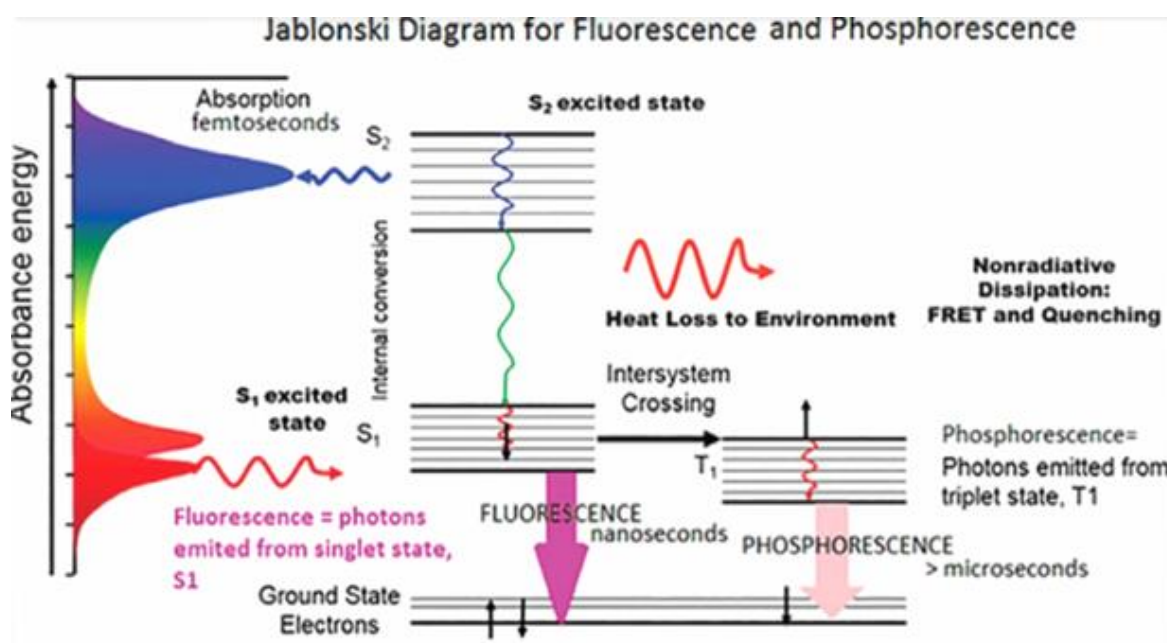
Karotenoidi su ugljikovodici od 8 molekula izoprena, a dijele se na karotene i ksantofile. Poznato je oko 80 karotenoida, a svi su karakteristični po rasponu boja od žute preko narančaste, pa do crvene. Iako su prisutni u svim fotosintetskim biljkama, najveće koncentracije se nalaze u listovima zelenih biljaka, a u velikim se količinama nalaze se npr. u korijenu mrkve, marelici i rajčici i upravo su oni zaslužni za promjene boje lišća u jesen. Svakako su najpoznatiji β -karoten (provitamin vitamina A), zatim γ -karoten i likopen (Jiang i sur. 2004).

Obzirom na učinkovitost apsorpcije svjetla valnih duljina između 380 i 550 nm, karotenoidi „proširuju“ spektar boja koje pokreću fotosintezu, iako je učinkovitost prijenosa energije s njih obično manja nego s klorofila na klorofil. Kod većine biljnih vrsta slabo prenose energije, no vrlo učinkovito štite fotosintetsku membranu jer „gase“ pobuđeno stanje klorofila u slučaju dotoka prevelike količine energije. Stoga će nedostatak karotenoida dovesti do toga da previše svjetla negativno utječe na proteine i membrane.

Ksantofili su derivati karotena koji sadrže kisik. Žute su ili smeđkaste boje i njima pripadaju lutein i fukoksantin. Lutein u kloroplastima listova apsorbira sunčevu energiju valnih duljina 400-500 nm, te je dalje prenosi preko klorofila u nastavku fotosintetskog procesa, a usput kao i drugi karotenoidi, štiti strukture kloroplasta tako što višak apsorbirane energije oslobađa kao toplinu (Jiang i sur. 2004).

2.3. Fluorescencija klorofila *a*

Oba se fotosustava sastoje od antena i reakcijskih središta, pri čemu ključnu ulogu imaju pigmenti koji se mogu predstaviti kao svojevrzne „antene“. Apsorpcija svjetla između plavog i crvenog dijela spektra potiče prijelaz klorofila u nestabilno stanje u trajanju 10^{-8} sekundi (Chen i sur. 2017, Keren i sur. 2011, Toth 2006). Kada se krene vraćati u svoje normalno, nepobuđeno stanje, otpusti foton. Tijekom fluorescencije dolazi do ponovnog re-emitiranja apsorbirane svjetlosti, ali uz različitu valnu duljinu. Od ukupne apsorbirane Sunčeve energije na fluorescenciju otpada tek 2-10% i ona se očituje kao crvena svjetlost valne duljine 695 nm (slika 14) (Porcar-Castell 2008). Iz pobuđene molekule klorofila se izbacuje elektron bogat energijom i molekula postaje ionizirana. Izbačeni elektron mogu prihvatiti akceptor ili se može vratiti u molekulu klorofila nakon nekoliko redoks reakcija. Kada apsorbirana svjetlosna energija stigne do reakcijskog središta fotosustava II (PSII), koristi se u tri usporedna procesa. U prvom procesu apsorbirana energija koristi se u fotokemijskim procesima, u drugom dio energije otpušta se nefotokemijski u toplinskom obliku, a u trećem dio energije se rasipa u obliku fluorescencije (Muller i sur. 2001, Foyer i Shigeoka 2011). Pri optimalnoj količini svjetlosti većina apsorbirane energije koristi se u fotokemijskim procesima. Ako je fotokemijski kapacitet premašen, veći dio energije će se otpustiti u toplinskom obliku.

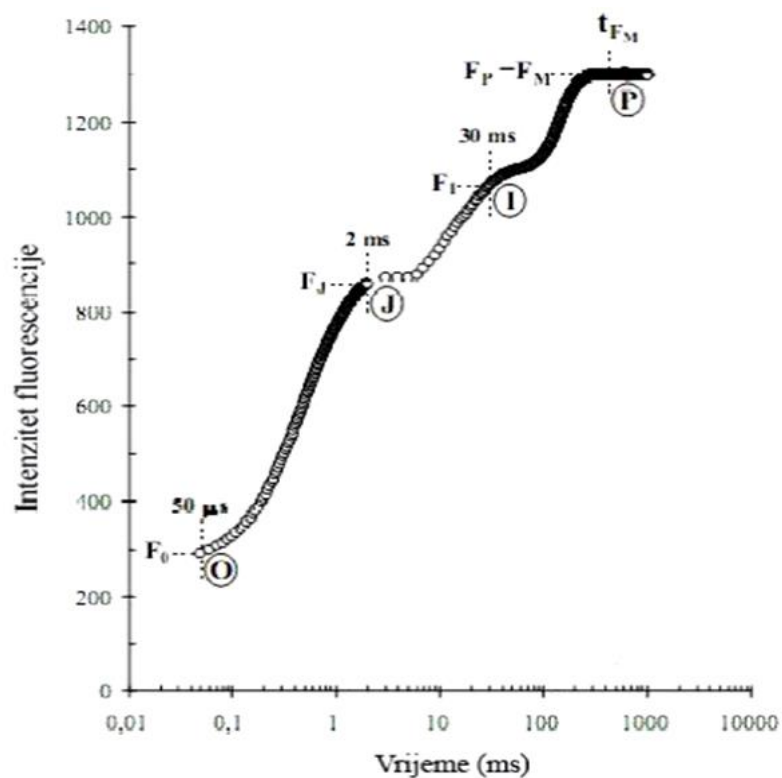


Slika 14. Shematski dijagram fluorescencije i fosforescencije klorofila
(preuzeto s <http://horiba.com>, Jablonski 1933)

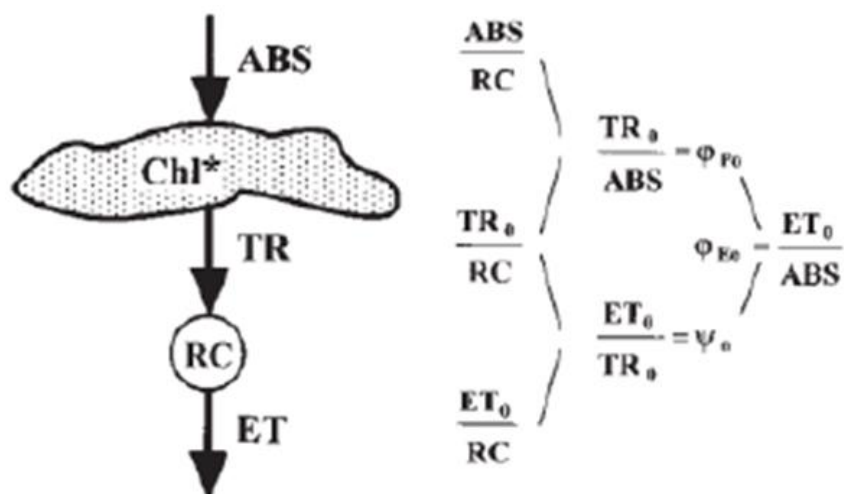
Pojavu fluorescencije moguće je promatrati na nekoliko načina. Kvalitativnom analizom može se pomoću samog promatranja fluorescencije procijeniti boja i jakost sekundarne emisije. Kvantitativna analiza podrazumijeva mjerenje pomoću posebnih uređaja koji se zovu fluorometri. Jedan od postupaka kojima se pokušavaju bolje razumjeti fotosintetski procesi je i mjerenje fluorescencije klorofila *a*, kojim se može utvrditi kako se energija raspodijelila unutar fotosustava, a istovremeno pruža podatke o funkcioniranju fotosintetskog aparata.

Fluorescencija klorofila *a* daje podatke o fotosustavu II, upravo onom koji je najpodložniji oštećenjima, a koji na sobnoj temperaturi ima 90%-tni udio u ukupnoj fluorescenciji klorofila. Kompleksi fotosustava I slabo fluoresciraju, no još nije dokazano zašto. Sama metoda se temelji na izlaganju listova dovoljno jakim svjetlosnom podražaju koji dovodi do potpune redukcije vezanog plastokinona (Q_A).

Istraživanja pokazuju da svi fotosintetski materijali već nakon 1 sekunde reagiraju na intenzivnu svjetlost i to tako da dolazi do porasta fluorescencije u nekoliko faza (slika 15). Iako se mogu uočiti i neke druge faze, najznačajnije su sljedeće: O (fluorescencija je minimalna), J (nakon otprilike 2ms), I (nakon cca 30 ms) te faza P, kada je fluorescencija dosegla maksimum. OJIP krivulja grafički prikazuje polifazni porast fluorescencije klorofila *a*, a temelji se na teoriji protoka energije u tilakoidnim biomembranama (slika 16). Pojednostavljeni model toka energije u fotosintetskom aparatu od apsorpcije fotona (ABS) do toka elektrona (ET), prikazan je na slici 16. (Strasser i sur. 2000). Do rasta fluorescencije dolazi zbog nakupljanja reduciranog oblika plastokinona (Q_A) što dovodi do zatvaranja reakcijskih središta u fotosustavu II. Kako bi se ovi podatci mogli kvantificirati i zatim analizirati, koristi se tzv. JIP test koji omogućava izračun niza fotosintetskih parametara koji daju informacije o funkcioniranju fotosintetskog aparata *in vivo* (Strasser i sur. 2000, Strasser i sur. 2004).



Slika 15. Tipični OJIP porast fluorescencije klorofila *a* *in vivo* na logaritamskoj vremenskoj skali (preuzeto iz Strasser i sur. 2004)



Slika 16. Pojednostavljeni model toka energije u fotosustavu II (preuzeto iz Strasser i sur. 2000)

2.4. Prethodna istraživanja stresa u drvenastih vrsta i fotoinhibicija

Općenito, istraživanja abiotskog stresa na drvenastim vrstama ima znatno manje nego li istovrsnih istraživanja na zeljastim biljkama, pogotovo kada je riječ o vrstama važnim za poljoprivredu. Istraživanja utjecaja okolišnih stresora na iglice četinjača dosegla su svoj vrhunac 80-ih i 90-ih godina prošlog stoljeća, pri čemu su primarno u fokusu bili aeropolucija, nedostatak vode (suša) i poremećaji mineralne ishrane, a zatim i biotski ekološki čimbenici. Spomenuta istraživanja obuhvaćala su pretežno vrste rodova *Picea*, *Pinus* i *Abies*, a metodološki su bila vrlo raznovrsna, od kvantitativnih analiza kemijskih i biokemijskih parametara stresa (poput koncentracije kemijskih elemenata, koncentracije fotosintetskih pigmenata, polifenola, neenzimskih antioksidansa, aktivnosti antioksidacijskih enzima (superoksid-dismutaza, katalaza, preoksidaza, glutathion-reduktaza...), do kvalitativnih mikroskopskih istraživanja (analiziranje histoloških promjena građe iglica, histokemijska lokalizacija pojedinih supstancija poput polifenola, kaloze, škrobado ultrastrukturnih promjena u organizaciji plastida, te finih mikroskopskih promjena na površini iglica poput promjena u građi epikutikularnog voska i u izgledu puči) (Bačić i sur. 1999, Fink 1999, Lepeduš i Cesar 2004).

Ova istraživanja su, osim primjene imala i značaj bazičnih istraživanja, budući da su njihovi rezultati značajno doprinijeli poznavanju građe i funkcije iglica četinjača tijekom njihovog razvoja. Pri tome se fotosintetski aparat, koji je lociran u kloroplastima iglica pokazao kao jedan od neosjetljivijih dijelova stanice na djelovanje različitih vrsta stresora, a time i jedno od najznačajnijih mjesta regulacije tolerancije na stres. Kao ključna komponenta u regulaciji tolerancije na stres nametnuo se fotosustav II (veliki multiproteinski kompleks, građen od oko 25 polipeptida, smješten u grana-tilakoidima, koji ima funkciju voda-plastokinon oksidoreduktaze).

Fotoinhibicija je moguća i u odsutnosti svih drugih stresnih čimbenika uslijed prevelike količine svjetla i povišene temperature. Pri tome se usporava, čak i zaustavlja fotosinteza, a to dovodi do mogućeg oštećenja fotosintetskog sustava (Perl-Treves i Perl 2002, Takahashi i Murata 2008). Istraživanja utjecaja povišenih temperatura i prevelike količine svjetlosti pokazuju da biljke razvijaju različitu prilagodbu obzirom na starost listova (Lepeduš i sur. 2011, Mlinarić i sur. 2016). Općenito, u uvjetima opisanog okolišnog stresa mlađi listovi pokazuju pojačanu akumulaciju fotosintetskih pigmenata, posebno karotenoida koji imaju zaštitnu ulogu, dok stariji listovi reagiraju smanjenjem sadržaja klorofila, te na taj način prilagođavaju apsorpciju svjetlosti trenutno fotosintetskom kapacitetu. Nadalje, prilagodbe na uvjete visokih temperatura i svjetlosti regulirane su akumulacijom glavnih fotosintetskih proteina, poput proteina D1, citokroma *f*, te Rubisco-a. Kod mlađih listova pokazana je slabija akumulacija ovih proteina, što je posebno izraženo tijekom oporavka od fotoinhibicije u noćnim satima, zbog čega je smanjenje fotosintetske učinkovitosti kod njih jače izraženo nego li u starijih listova.

Dodatno opterećenje na fotosintetski aparat kod priobalnih mediteranskih vrsta kao što je alepski bor, ima i povišeni salinitet, što dodatno snižava fotosintetsku učinkovitost (Morales i sur. 2008). Predloženo istraživanje utjecaja povišene količine svjetlosti i povišene temperature na iglice alepskog bora tijekom ljeta najčešće je kombinirano s utjecajem solnog stresa, budući da je riječ o stablima koja rastu uz samo obalu. Veliki broj istraživanja pokazao je da mehanizmi djelovanja solnog stresa na fotosintetski aparat mogu imati osmotski i ionski utjecaj, te mogu značajno narušiti funkcioniranje fotosinteze na različitim razinama, što se poglavito odražava na promjene u molekularnoj organizaciji i funkciji fotosustava II (Jajoo 2014).

Biljke se mogu prilagoditi različitim situacijama, pa tako i onoj kada su izložene prekomjernoj količini svjetlosti. Ona može uzrokovati blokiranje ili pak zaustavljanje fotosintetskog procesa (Perl-Treves i Perl 2002, Takahashi i Murata 2008). Ova pojava uobičajena je za razdoblja u sredini dana kada dolazi do određene stagnacije u fotosintetskoj aktivnosti, a što se tiče godišnjih doba, češća je ljeti za vrijeme sušnih razdoblja i zimi u razdoblju zimske dormancije.

Reakcije na povećanu ili smanjenu količinu svjetlosti razlikuju se ovisno o njihovoj prilagođenosti na količinu svjetlosti. Biljke prilagođene sjeni, npr. mahovine i paprati, teže će podnijeti uvjete pojačanog osvjetljenja i vrlo često će doći do fotoinhibicije. Nakon nekog vremena takve biljke mogu pojačati vlastiti fotosintetski kapacitet. Biljke prilagođene visokom intenzitetu svjetlosti, kao npr. kaktusi i tipično mediteransko bilje, lakše se prilagođavaju promjenama u intenzitetu svjetlosti i vrlo će se lako prilagoditi njezinom smanjenju, te znatno će bolje iskoristiti takvo slabije osvjetljenje za fotosintetske reakcije (Long i sur.1994).

Različiti su načini prilagodbe biljaka na stres zbog jakog osvjetljenja: savijanjem nadzemnih organa, zakretanjem lista od izvora svjetlosti, povećanjem količine pigmenata koji ih mogu zaštititi (kao npr. karoten, lutein i dr.) i kretanjem kloroplasta u asimilacijskom tkivu (Long i sur. 1994).

Smatra se da je protein D1 primarno mjesto fotoinhibicije, a kapacitet njegove izmjene (eng. „turnover“) ključni je fiziološki uvjet razvoja tolerancije i oporavka. Ključni fiziološki uvjet za stvaranje otpornosti i/ili tolerancije na fotoinhibiciju je kapacitet izmjene proteina D1 što uključuje proteolitičku degradaciju D1 proteina, sintezu prekursora pre-D1, ugrađivanje novo sintetiziranog prekursora u tilakoidnu membranu nakon čega slijedi sklapanje ostalih proteina PSII, završno sklapanje D1 proteina obradom C-terminalnog kraja, te konačno sklapanje RC-a. Kako bi došlo do oporavka od fotoinhibicije, ključan je korak upravo *de novo* sintetiza ovog proteina. Koja se može dogoditi već i za vrijeme uvjeta koji uzrokuju fotoinhibiciju, no oporavak dostiže svoj maksimum kada se biljka ponovo nađe u za njoj optimalnim uvjetima (Keren i Krieger-Liszkay 2011).

Malo je dostupnih istraživanja o fotoinhibiciji u šumskim područjima ili u nasadima, no jasno je da je u takvim situacijama manje ili veće zbijenosti drveća, biljkama ionako dostupna manja količina svjetlosti, čak i kada je ona maksimalna. U istraživanju listova šest različitih kišnih šuma utvrđena je najveća fotoinhibicija kod mladih listova, ali mladi listovi se i najbrže oporave zahvaljujući povećanoj koncentraciji α -karotena i zeaksantina (Krause i sur. 1995).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Agroekološki uvjeti

Fotosintetska učinkovitost ovosezonskih i prošlosezonskih iglica alepskog bora istraživana je u mjestu Primošten, Republika Hrvatska, geografske širine 43°36'25"N i dužine 15°55'12"E. Istraživanje dnevnih promjena razine učinkovitosti fotosustava II provodilo se u razdoblju 2 godine, u dva istovjetna razdoblja (druga polovica lipnja) 2015. i 2016. godine. Klimatski uvjeti bili su identični tijekom lipnja obje navedene godine, 2015. godine bilo je ukupno 24, a 2016. godine 26 sunčanih dana. Temperatura u vrijeme jutarnjih mjerenja (8.00 – 10.00 h) iznosila je $19,4 \pm 2$ °C, a osvjetljenje (PPFD) $100 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Tijekom popodnevni mjerenja (13.00 – 15.00 h) temperatura je iznosila $32,5 \pm 1$ °C, a osvjetljenje (PPFD) $1.900 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Temperatura i osvjetljenje određene su instrumentom Quantitherm (Hansatech, UK) a mjerenja su vršena u visini dijela krošnje s kojih su uzorkovane iglice, sa strane koja je bila direktno izložena sunčevoj svjetlosti u popodnevnim satima.

3.2. Priprema uzorka i analiza sadržaja kemijskih elemenata

Kvantitativna analiza kemijskih elemenata obuhvaćala je određivanje sadržaja Ca, Mg, K, Na, Cu, Fe, Mn, Zn, Ni, Pb, Cd, P u ovosezonskim i prošlosezonskim iglicama.

Priprema uzorka za analizu:

Za potrebe analize načinjen je skupni uzorak od deset odabranih stabala, osušeni na 105 °C tijekom 24 sata. Osušeni biljni uzorci su usitnjeni u fini prašak ultra-centrifugalnim mlinom za pripremu uzoraka bez rezidua teških metala (Retsch ZM 200, Haan, Germany).

Biljni uzorci su razoreni mokrim postupkom, digestijom s 10 ml 5:1 smjese HNO₃ i H₂O₂ na 180 °C tijekom 60 minuta u mikrovalnoj pećnici (CEM Mars 6, Matthews, NC, USA) prema Matusiewicz i sur. (1989) i Kingstone i Jassie (1986).

Određivanje koncentracije Ca, Mg, K, Na, Cu, Fe, Mn, Zn, Ni, Pb, Cd i P:

Koncentracije makro i mikroelemenata i štetnih teških metala u otopinama digestiranih biljnih uzoraka određivane su pomoću induktivno spregnute plazme (ICP-OES PerkinElmer Optima 2100 DV, Waltham, MA, USA) tehnikom optičke emisijske spektrometrije (Bazeyad i sur. 2019, Conti i sur. 2018). Svaka serija uzoraka biljaka na ICP analizirana je uz internu kontrolu plazme i uz referentni materijal (Rice flour, IRMM - 804, Sample No. 0533, European Commission, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium) koji su pripremljeni na isti način kao i ostali uzorci biljaka. Svi uzorci su analizirani u triplicatu.

Određivanje koncentracije ukupnog N:

Sadržaj dušika u biljnim uzorcima određen je Kjeldahlovom metodom (AOAC 1984) nakon digestije (Behr Distillation Unit S3, behrotest®) mljevenog suhog biljnog materijala sa sumpornom kiselinom (Digest block system K-437, Buchi Corporation, New Castle, USA). Svaki uzorak analiziran je u 3 ponavljanja.

3.3. Mjerenje polifaznog porasta fluorescencije klorofila *a* i JIP test

Za uzorkovanje je korišteno deset stabala alepskog bora. Sa svakog odabranog stabla mjereno je deset nasumično odabranih iglica iz donjeg dijela krošnje. Istraživanje je provedeno metodom polifaznog porasta fluorescencije klorofila *a*. Prije mjerenja je sav biljni materijal bio prilagođen na uvjete tame tijekom 30 minuta. Korišten je instrument *Plant Efficiency Analyzer* (Handy PEA, Hansatech, Velika Britanija) (slika 17). Puls crvene saturacijske svjetlosti (maks. apsorpcije 650 nm, 3000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) inducira polifazni rast fluorescencije klorofila *a* (slika 15). Instrument omogućava kvantitativno praćenje promjena fluorescencije klorofila *a* već nakon 50 μs nakon osvjetljavanja i bilježi promjene unutar 1 sekunde (svakih 10 μs tijekom prve 2 ms a nakon toga svake ms do pune sekunde). Izmjerene vrijednosti intenziteta fluorescencije nakon 50 μs (F_0), 150 μs , 300 μs , 2ms (F_J), 30 ms (F_I), maksimalnom intenzitetu fluorescencije (F_m), vremenu potrebnom za postizanje maksimalnog intenziteta te površini iznad OJIP-krivulje (AREA) koriste se za izračun fotosintetskih parametara koji opisuju raspodjelu toka (fluksa) energije unutar PSII, tzv. JIP test (Tablica 1) (Strasser i sur. 2004).



Slika 17. Instrument *Handy PEA* - *Plant efficiency analyzer*

U tablici 1. prikazani su parametri JIP-testa korištenih u ovom istraživanju uz opis i jednadžbu prema kojoj se dobivaju.

Tablica 1. Parametri dobiveni mjerenjem polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* i parametri OJIP testa.

Parametar	Opis	Jednadžba
F_0	intenzitet fluorescencije nakon 50 μ s (O stupanj)	
F_{300}	intenzitet fluorescencije nakon 300 μ s	
F_J	intenzitet fluorescencije nakon 2 μ s (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	$S_m \times [(dV/dt)_0] / V_J$
RC/CS_0	gustoća aktivnih reakcijskih središta	$F_v/F_m \times (V_J/M_0) \times ABS/CS_0$
TR_0/ABS	maksimalni kvantni prinos fotosustava II	$[1 - (F_0/F_m)] = F_v/F_m$
ET_0/ABS	kvantni prinos elektronskog transporta	$1 - (F_0/F_m)$
ET_0/TR_0	učinkovitost kojom uhvaćeni („trapped“) eksciton omogućava prijenos elektrona u elektron-transportnom lancu dalje od Q_A^-	$(1 - V_J)$
ABS/RC	apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu	$M_0 \times (1/V_J) \times [1/(F_v/F_m)]$
TR_0/RC	protok uhvaćenih fotona po aktivnom reakcijskom središtu	$M_0 \times (1/V_J)$
ET_0/RC	elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu	$M_0 \times (1/V_J) \times (1 - V_J)$
DI_0/RC	rasipanje po aktivnom reakcijskom središtu	$(ABS/RC) - (TR_0/RC)$
ABS/CS	apsorpcija po pobuđenoj površini	$ABS/CS_0 - F_0$
TR_0/CS	protok uhvaćenih fotona po pobuđenoj površini	$[1 - (F_0/F_m)] \times F_0$
ET_0/CS_0	elektronski transport po pobuđenoj površini	$[1 - (F_0/F_m)] \times (1 - V_J) \times F_0$
DI_0/SC_0	rasipanje po pobuđenoj površini	$(ABS/CS_0) - (TR_0/CS_0)$
PI_{ABS}	indeks fotosinteze učinkovitosti	$(RC/ABS) \times (TR_0/DI_0) \times [ET_0/(TR_0 - ET_0)]$
RC/ACS	omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta i koncentracije antena klorofila	$(RC/TR_0) \times (TR_0/ABS) = [(F_J - F_0) / 4(F_{300\mu s} - F_0)] \times (F_v/F_m)$
TR_0/DI_0	omjer protok uhvaćenih fotona i rasipanja energije	(F_v/F_0)
$ET_0/(TR_0 - ET_0)$	transport elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A	$(F_m - F_0) / (F_J/F_0)$

3.4. Spektrofometrijsko određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenta

Kako bi se odredila koncentracija fotosintetskih pigmenta, tkivo iglice alepskog bora je prvo usitnjeno u tekućem dušiku uz dodatak magnezijevog hidrogenkarbonata (MgHCO_3) sve dok se nije dobio fini prah. Zatim je 0,05 g tkiva prebačeno u tubice, nakon čega je u njih dodan 1ml acetona. Pigmenti su 15 minuta ekstrahirani na ledu, a zatim centrifugirani 10 minuta pri 15.000 g na + 4 °C. Supernatant je prebačen u staklenu kivetu. Bilo je potrebno napraviti više re-ekstrakcija kako bi talog potpuno izgubio boju. Za svaki su uzorak spojeni svi supernatanti i izmjereni njihov ukupni volumen. Korištenjem spektrofotometra (SPECORD® 40, Analytik Jena, Njemačka) izmjerene su koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida mjerenjem apsorbancije na tri valne duljine: 470 nm, 644,8 nm i 661,6 nm. Za izračun su korišteni ekstinkcijski koeficijenti prema Lichtenthaleru 1987 (tablica 2).

Tablica 2. Ekstinkcijski koeficijenti prema Lichtenthaleru 1987

Koeficijent	Opis	Jednadžba
V	ukupni volumen ekstrakta fotosintetskih pigmenta, izražen u ml	
M	masa uzorka, izražena u gramima	
A_{661,6}	apsorbancija na valnoj duljini 661,6 nm	
A_{644,8}	apsorbancija na valnoj duljini 644,8 nm	
A₄₇₀	apsorbancija na valnoj duljini 470 nm	
Chl <i>a</i>	koncentracija klorofila <i>a</i> u mg/g mase svježe tvari uzorka	$(11,24 \times A_{661,6} - 2,04 \times A_{644,8}) \times V / m \times 10^3$
Chl <i>b</i>	koncentracija klorofila <i>b</i> u mg/g mase svježe tvari uzorka	$(20,13 \times A_{644,8} - 4,19 \times A_{661,6}) \times V / m \times 10^3$
Chl <i>a+b</i>	koncentracija ukupnog klorofila u mg/g mase svježe tvari uzorka	$(7,05 \times A_{661,6} - 18,09 \times A_{644,8}) \times V / m \times 10^3$
Car	koncentracija karotenoida u mg/g mase svježe tvari uzorka	$[10^3 \times A_{470} - 1,9 \times (11,24 \times A_{661,6} - 2,04 \times A_{644,8}) - 63,14 \times (20,13 \times A_{644,8} - 4,19 \times A_{661,6})] \times V / 214 \times m \times 10^3$

3.5. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je u programu StatSoft Inc. STATISTICA, verzija 8.0 (2007.). Usporedba značajnosti razlika određivanih parametara između ovosezonskih i prošlosezonskih iglica obuhvatila je slijedeće metode: Studentov t-test, analiza varijance (ANOVA, eng. “*Analysis of Variance*”), *post hoc* statistički test značajnosti utjecaja primjenjenih tretmana, LSD test (eng. “*Least Significant Difference*”). Razina značajnosti je 0,05 ($p \leq 0,05$).

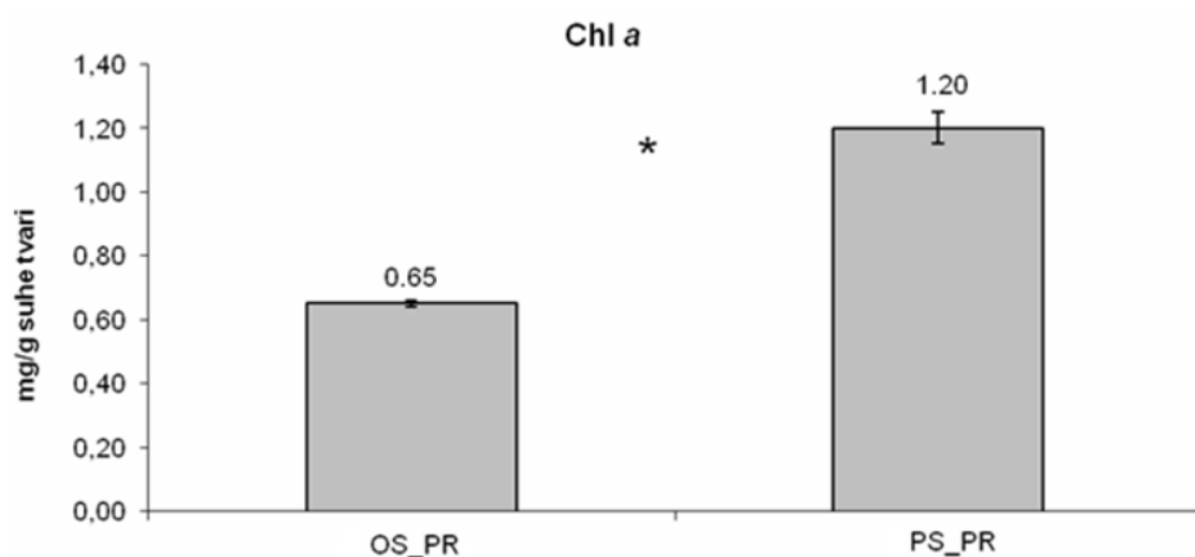
4. REZULTATI

4.1. Koncentracija fotosintetskih pigmenata

4.1.1. Koncentracija klorofila *a*

Srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracije klorofila *a* (Chl *a*) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora prikazane su na dijagramu. Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama iznosila je $0,65 \pm 0,01$ mg/g suhe tvari dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice iznosila $1,20 \pm 0,05$ mg/g suhe tvari.

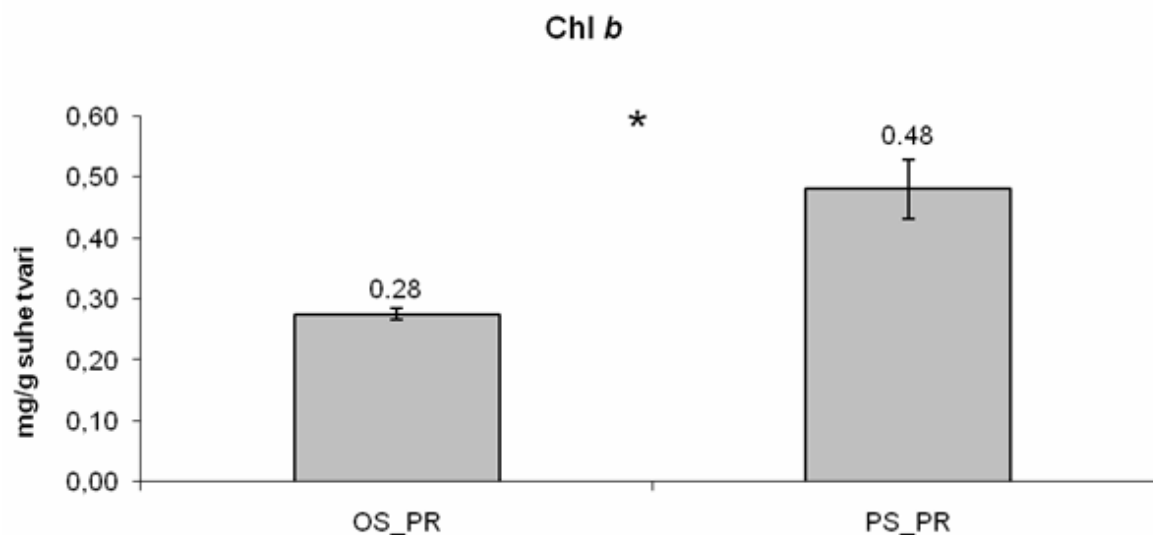
Prema Studentovom t-testu razlika je bila statistički značajna na razini značajnosti od 5% ($p < 0,05$). Oznaka (*) označava statistički značajnu razliku prema Studentovom t-testu, $p < 0,05$ (slika 18).



Slika 18. Srednja vrijednost i standardna devijacija koncentracije klorofila *a* (Chl *a*) (mg/g suhe tvari) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora

4.1.2. Koncentracija klorofila *b*

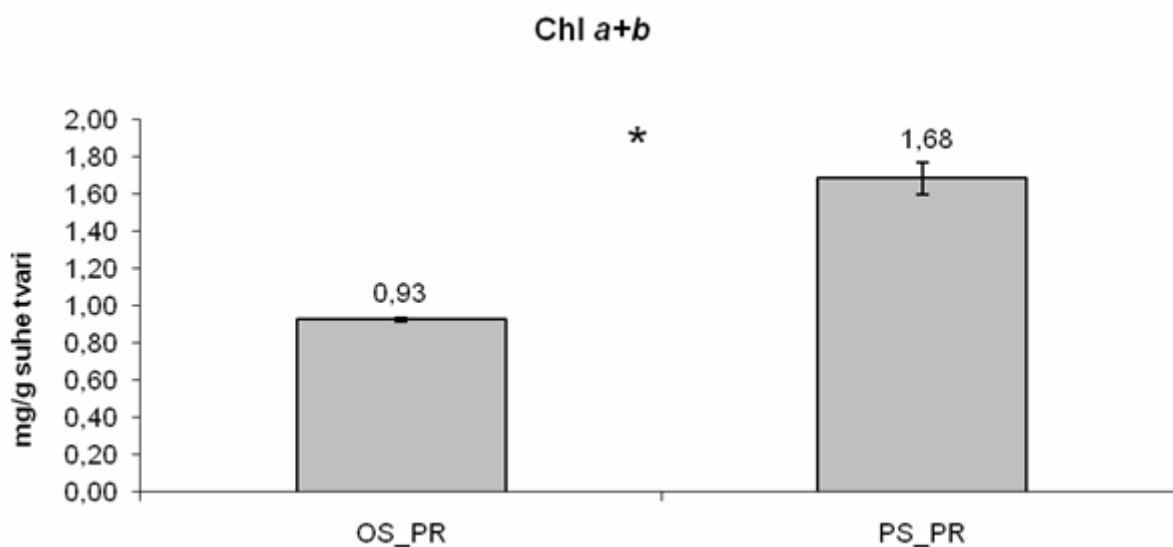
Srednja vrijednost i standardna devijacija koncentracije klorofila *b* (Chl *b*) u ovosezonskim iglicama iznosila je $0,28 \pm 0,01$ mg/g suhe tvari dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice iznosila $0,48 \pm 0,05$ mg/g suhe tvari. Prema Studentovom t-testu razlika je bila statistički značajna na razini značajnosti od 5% ($p < 0,05$). Oznaka (*) označava statistički značajnu razliku prema Studentovom t-testu, $p < 0,05$ (slika 19).



Slika 19. Srednja vrijednost i standardna devijacija koncentracije klorofila *b* (Chl *b*) (mg/g suhe tvari) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora

4.1.3. Koncentracija ukupnih klorofila

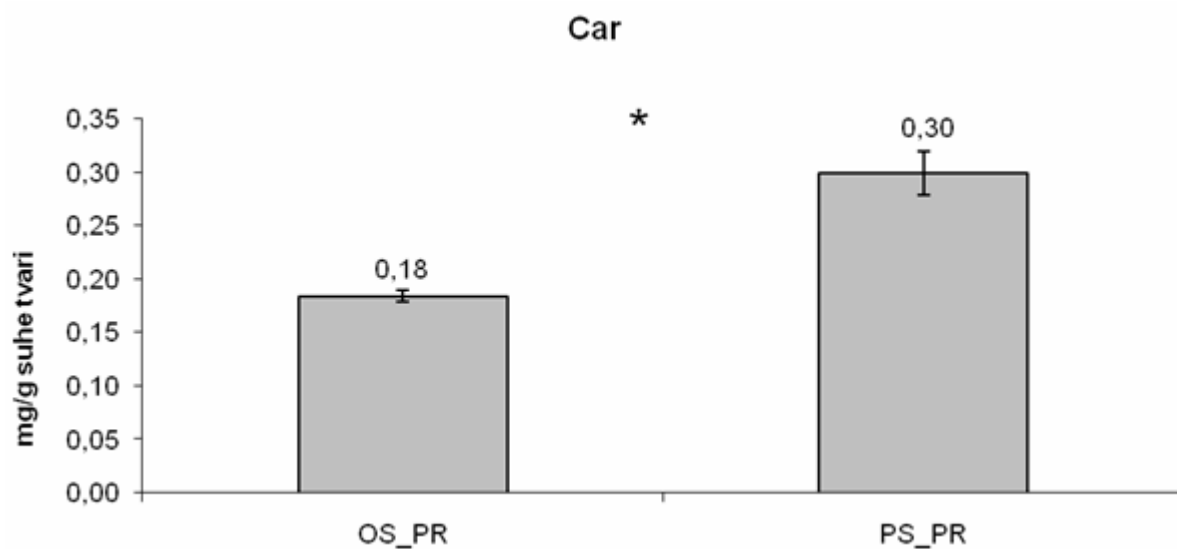
Srednje vrijednost i standardna devijacija koncentracije ukupnih klorofila (Chl *a+b*) u ovosezonskim u iglicama iznosila je $0,93 \pm 0,01$ mg/g suhe tvari, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice iznosila $1,68 \pm 0,09$ mg/g suhe tvari. Prema Studentovom t-testu razlika je bila statistički značajna na razini značajnosti od 5% ($p < 0,05$). Oznaka (*) označava statistički značajnu razliku prema Studentovom t-testu, $p < 0,05$ (slika 20).



Slika 20. Srednja vrijednost i standardna devijacija koncentracije ukupnih klorofila (Chl *a+b*) (mg/g suhe tvari) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora

4.1.4. Koncentracija ukupnih karotenoida

Srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracije ukupnih karotenoida (Car) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora prikazane su na slici 21. Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama iznosila je $0,19 \pm 0,01$ mg/g suhe tvari dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice iznosila $0,30 \pm 0,02$ mg/g suhe tvari. Prema Studentovom t-testu razlika je bila statistički značajna na razini značajnosti od 5% ($p < 0,05$). Oznaka (*) označava statistički značajnu razliku prema Studentovom t-testu, $p < 0,05$ (slika 21).

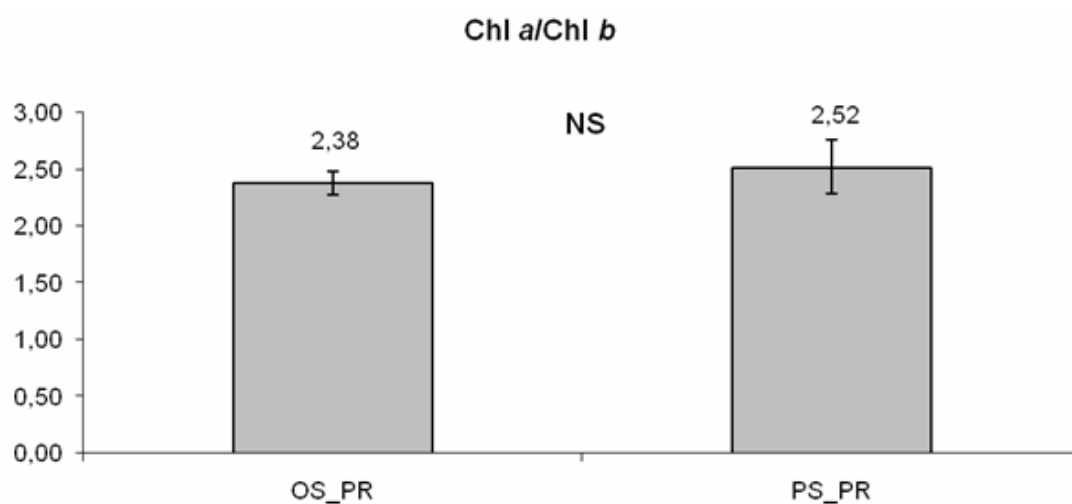


Slika 21. Srednja vrijednost i standardna devijacija koncentracije ukupnih karotenoida (Car) (mg/g suhe tvari) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora

4.2. Omjeri koncentracija fotosintetskih pigmenata

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

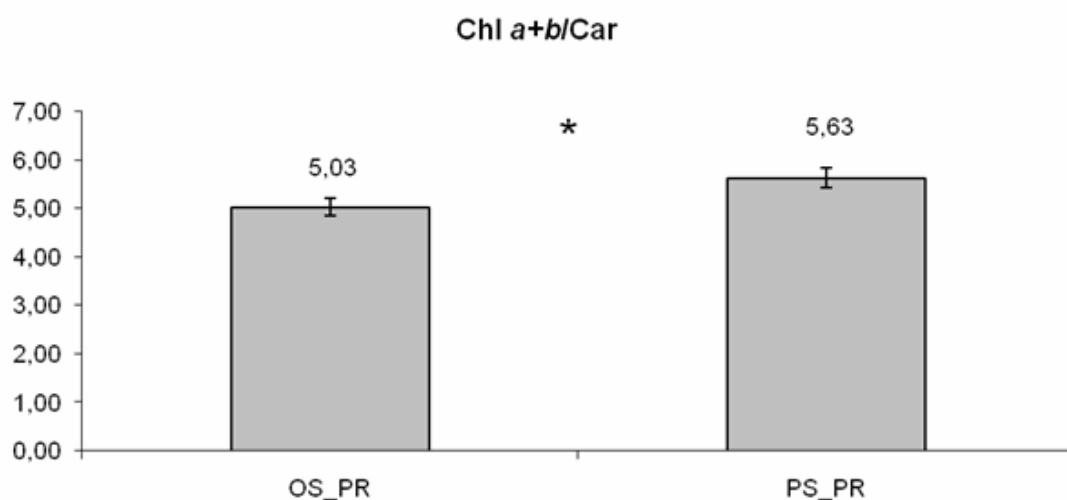
Srednje vrijednosti i standardne devijacije omjera koncentracije klorofila *a* i klorofila *b* (Chl *a*/Chl *b*) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora prikazane su na slici 22. Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama iznosila je $2,38 \pm 0,10$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice iznosila $2,52 \pm 0,24$. Prema Studentovom t-testu razlika nije bila statistički značajna na razini značajnosti od 5% ($p > 0,05$) Oznaka NS - nije signifikantno ($p > 0,05$) (slika 22).



Slika 2211. Srednja vrijednost i standardna devijacija omjera koncentracije klorofila *a* i klorofila *b* (Chl *a*/Chl *b*) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora

4.2.2. Omjer koncentracija ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida

Srednje vrijednosti i standardne devijacije omjera koncentracije ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida ($\text{Chl } a+b/\text{Car}$) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora prikazane su na slici 23. Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama iznosila je $5,03 \pm 0,18$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice iznosila $5,63 \pm 0,21$. Prema Studentovom t-testu razlika je bila statistički značajna na razini značajnosti od 5% ($p > 0,05$). Oznaka (*) označava statistički značajnu razliku prema Studentovom t-testu, $p < 0,05$ (slika 23).

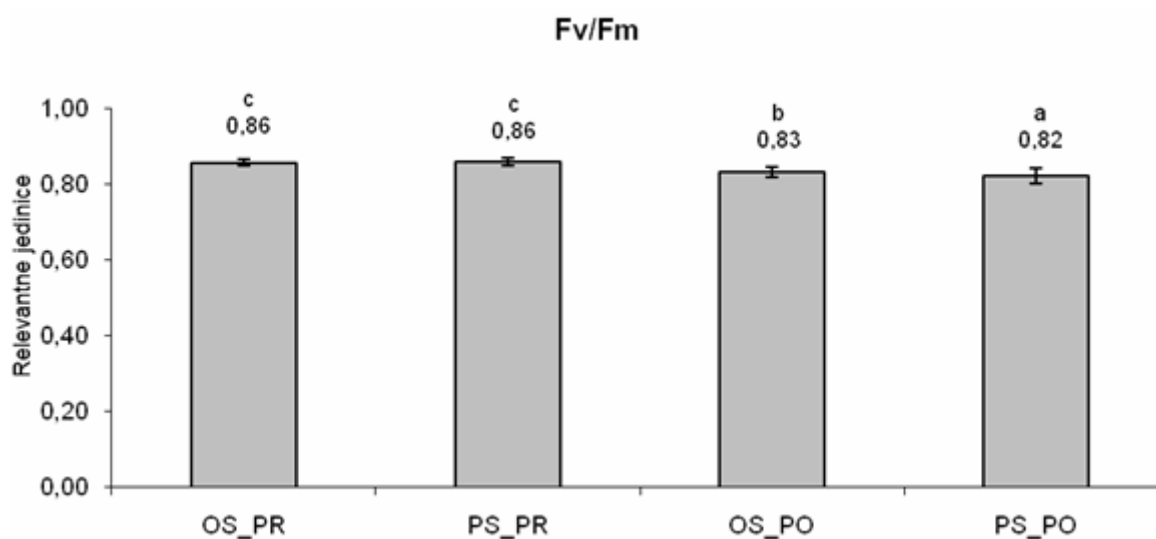


Slika 23. Srednja vrijednost i standardna devijacija omjera koncentracije ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida ($\text{Chl } a+b/\text{Car}$) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora

4.3. Fluorescencija klorofila *a* i JIP test

4.3.1. Maksimalni prinos kvanta fotosustava II

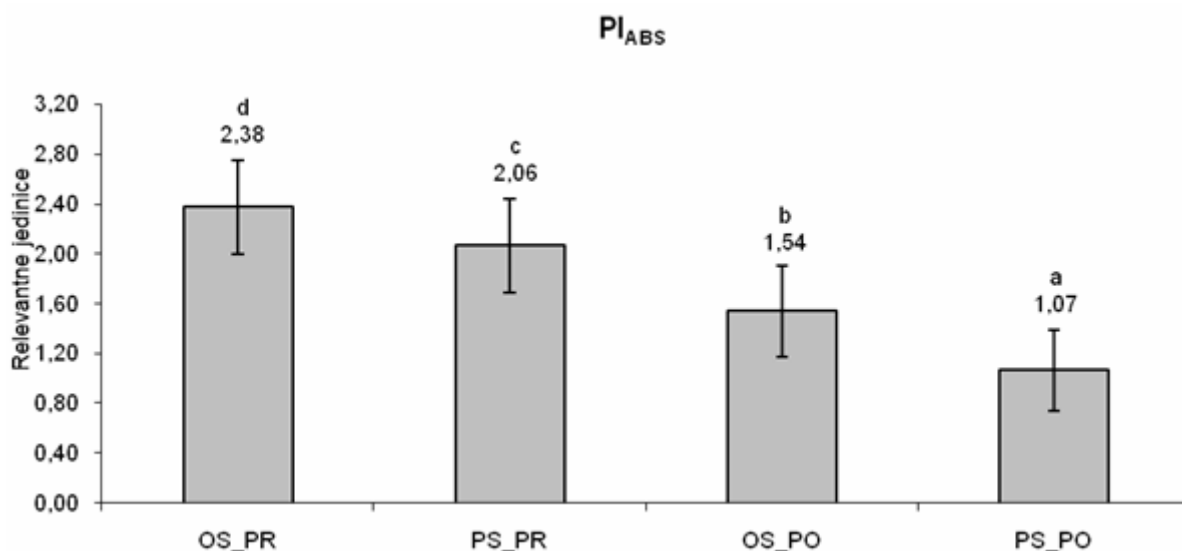
Srednje vrijednosti (izražene u relativnim jedinicama) i standardne devijacije maksimalnog prinosa kvanta fotosustava II (Fv/Fm) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora prikazane su na slici 24. Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u prijedpodnevnim satima (OS_PR) iznosila je $0,86 \pm 0,01$, kao i srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u prijedpodnevnim satima (PS_PR): $0,86 \pm 0,01$. Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u poslijepodnevnim satima (OS_PO) iznosila je $0,83 \pm 0,02$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u poslijepodnevnim satima (PS_PO) iznosila $0,82 \pm 0,02$. Budući da je LSD vrijednost bila vrlo niska (0,0047), smanjenje vrijednosti parametra Fv/Fm u poslijepodnevnim satima bilo je statistički značajna za obje generacije iglica na razini značajnosti od 5% ($p > 0,05$). Razlike nisu bile statistički značajne između OS i PS iglica u ne-stresnim uvjetima (prijepodnevi sati). Rezultati označeni različitim slovima (a, b, c) međusobno se statistički značajno razlikuju prema LSD testu na razini značajnosti od 5% ($p < 0,05$) (slika 24).



Slika 24. Srednje vrijednosti i standardne devijacije maksimalnog prinosa kvanta fotosustava II (Fv/Fm) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora u prijedpodnevnim (PR) i poslijepodnevnim satima (PO)

4.3.2. Indeks fotosintetske učinkovitosti

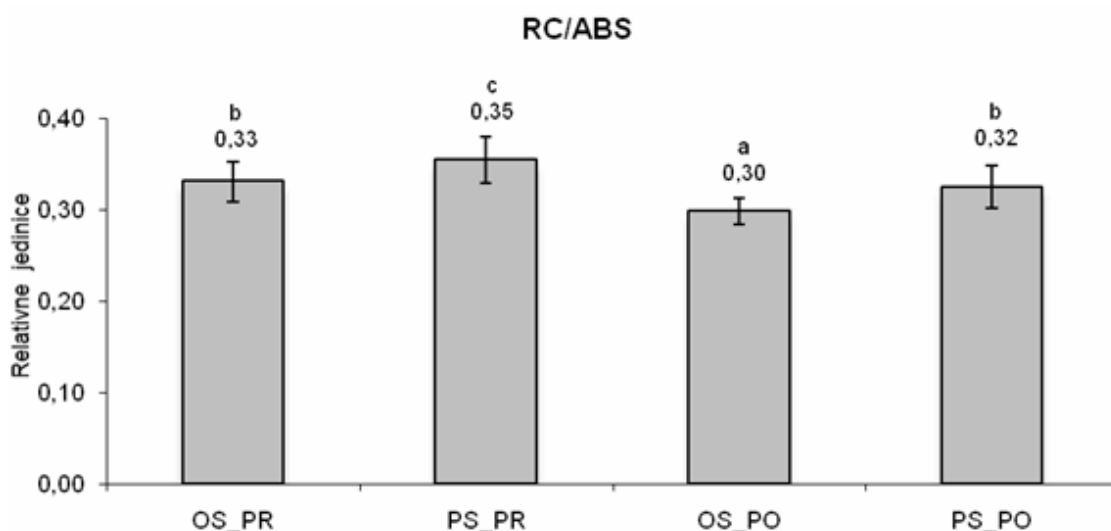
Srednje vrijednosti (izražene u relativnim jedinicama) i standardne devijacije indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora prikazane su na slici 25. Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u prijedpodnevnim satima (OS_PR) iznosila je $2,38 \pm 0,38$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u prijedpodnevnim satima (PS_PR) iznosila $2,06 \pm 0,38$. Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u poslijepodnevnim satima (OS_PO) iznosila je $1,54 \pm 0,36$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u poslijepodnevnim satima (PS_PO) iznosila $1,07 \pm 0,32$. Prema LSD testu, smanjenje vrijednosti parametra PI_{ABS} u poslijepodnevnim satima bilo je statistički značajno za obje generacije iglica na razini značajnosti od 5% ($p > 0,05$). Također razlike su bile statistički značajne između OS i PS iglica u ne-stresnim uvjetima (prijepodnevni sati). Rezultati označeni različitim slovnom oznakama (a, b, c, d) međusobno se statistički značajno razlikuju prema LSD testu na razini značajnosti od 5% ($p < 0,05$) (slika 25).



Slika 25. Srednje vrijednosti i standardne devijacije indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora u prijedpodnevnim (PR) i poslijepodnevnim satima (PO)

4.3.3. Omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta PSII i klorofila u antenama PSII

Srednje vrijednosti (izražene u relativnim jedinicama) i standardne devijacije omjera koncentracije klorofila reakcijskih središta PSII i koncentracije klorofila u antenama PSII (RC/ABS) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora prikazane su na slici 26. Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u prijepodnevnim satima (OS_PR) iznosila je $0,33 \pm 0,02$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u prijepodnevnim satima (PS_PR) iznosila $0,35 \pm 0,03$. Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u poslijepodnevnim satima (OS_PO) iznosila je $0,30 \pm 0,01$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u poslijepodnevnim satima (PS_PO) iznosila $0,32 \pm 0,02$. LSD vrijednost bila je 0,0007. Pad vrijednosti parametra RC/ABS u poslijepodnevnim satima bio je statistički značajan za obje generacije iglica na razini značajnosti od 5% ($p > 0,05$). Rezultati označeni različitim slovima (a, b, c) međusobno se statistički značajno razlikuju prema LSD testu na razini značajnosti od 5% ($p < 0,05$) (slika 26).

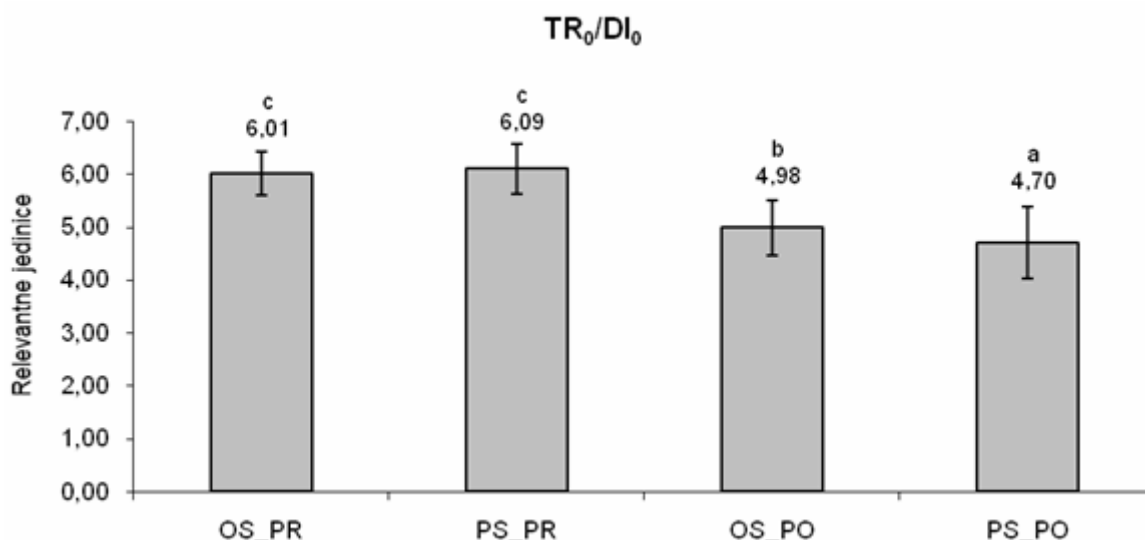


Slika 26. Srednje vrijednosti i standardne devijacije omjera koncentracije klorofila reakcijskih središta PSII i koncentracije klorofila u antenama PSII (RC/ABS) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora u prijepodnevnim (PR) i poslijepodnevnim satima (PO)

4.3.4. Omjer hvatanja ekscitona i disipacije pobudne energije

Srednje vrijednosti (izražene u relativnim jedinicama) i standardne devijacije omjera hvatanja ekscitona i disipacije pobudne energije (TR_0/DI_0) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora prikazane su na slici 27.

Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u prijedodnevni satima (OS_PR) iznosila je $6,01 \pm 0,41$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u prijedodnevni satima (PS_PR) iznosila $6,09 \pm 0,48$. Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u poslijepodnevni satima (OS_PO) iznosila je $4,98 \pm 0,53$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u poslijepodnevni satima (PS_PO) iznosila $4,70 \pm 0,67$. Prema LSD testu, smanjenje vrijednosti parametra TR_0/DI_0 u poslijepodnevni satima bilo je statistički značajno za obje generacije iglica, na razini značajnosti od 5% ($p > 0,05$). Razlike između OS i PS iglica u ne-stresnim uvjetima (prijedodnevni sati) nisu bile statistički značajne. Rezultati označeni različitim slovima (a, b, c) međusobno se statistički značajno razlikuju prema LSD testu na razini značajnosti od 5% ($p < 0,05$) (slika 27).



Slika 27. Srednje vrijednosti i standardne devijacije omjera hvatanja ekscitona i disipacije pobudne energije (TR_0/DI_0) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora u prijedodnevni (PR) i poslijepodnevni satima (PO)

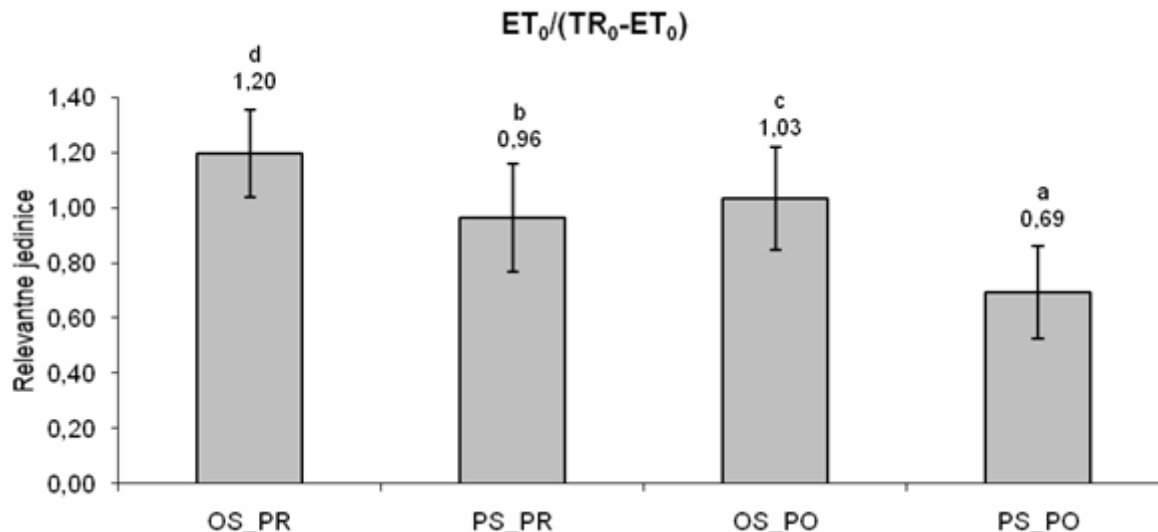
4.3.5. Prijenos elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A

Srednje vrijednosti (izražene u relativnim jedinicama) i standardne devijacije prijenosa elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A ($ET_0/(TR_0-ET_0)$) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora prikazane na slici 28.

Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u prijedpodnevnim satima (OS_PR) iznosila je $1,20 \pm 0,16$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u prijedpodnevnim satima (PS_PR) iznosila $0,96 \pm 0,20$.

Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u poslijepodnevnim satima (OS_PO) iznosila je $1,03 \pm 0,19$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u poslijepodnevnim satima (PS_PO) iznosila $0,70 \pm 0,17$.

Prema LSD testu, smanjenje vrijednosti parametra $ET_0/(TR_0-ET_0)$ u poslijepodnevnim satima bila je statistički značajna za obje generacije iglica, na razini značajnosti od 5% ($p > 0,05$). Također, razlike između OS i PS iglica u ne-stresnim uvjetima (prijepodnevni sati) bile su statistički značajne. Rezultati označeni različitim slovnim oznakama (a, b, c, d) međusobno se statistički značajno razlikuju prema LSD testu na razini značajnosti od 5% ($p < 0,05$) (slika 28).



Slika 28. Srednje vrijednosti i standardne devijacije transporta elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A ($ET_0/(TR_0-ET_0)$) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora u prijedpodnevnim (PR) i poslijepodnevnim satima (PO)

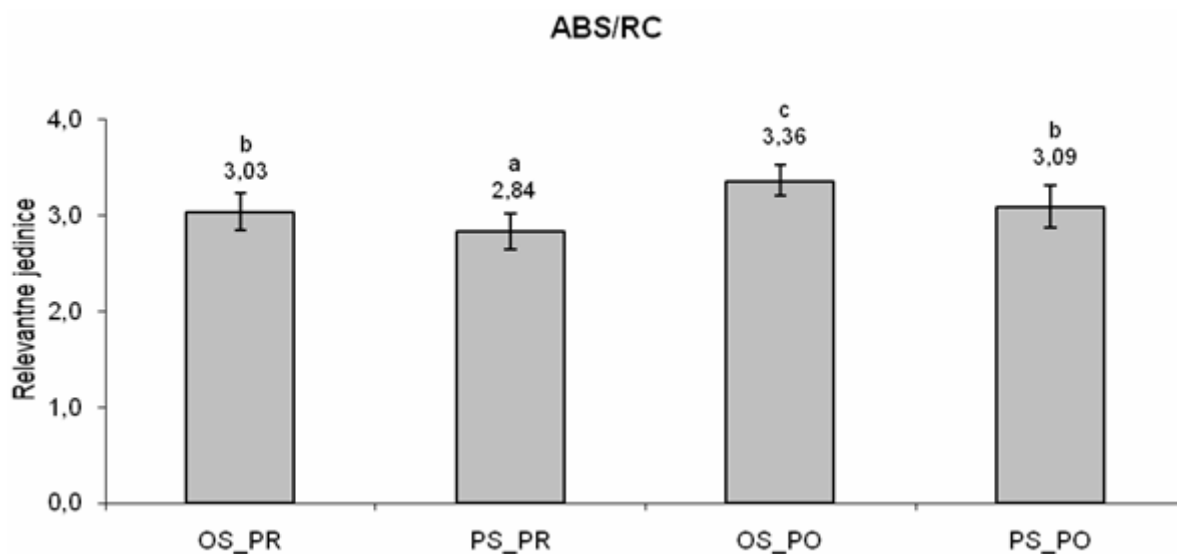
4.3.6. Apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu PSII

Srednje vrijednosti (izražene u relativnim jedinicama) i standardne devijacije apsorpcije po aktivnom reakcijskom središtu PSII (ABS/RC) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora prikazane su na slici 29.

Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u prijedpodnevnim satima (OS_PR) iznosila je $3,03 \pm 0,16$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u prijedpodnevnim satima (PS_PR) iznosila $2,84 \pm 0,20$.

Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u poslijepodnevnim satima (OS_PO) iznosila je $3,36 \pm 0,19$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u poslijepodnevnim satima (PS_PO) iznosila $3,09 \pm 0,17$.

Prema LSD testu, povišenje vrijednosti parametra ABS/RC u poslijepodnevnim satima bila je statistički značajna za obje generacije iglica, na razini značajnosti od 5% ($p > 0,05$). Također razlike između OS i PS iglica u ne-stresnim uvjetima (prijepodnevni sati) su bile statistički značajne. Rezultati označeni različitim slovnim oznakama (a, b, c) međusobno se statistički značajno razlikuju prema LSD testu na razini značajnosti od 5% ($p < 0,05$) (slika 29).



Slika 29. Srednje vrijednosti i standardne devijacije apsorpcije po aktivnom reakcijskom središtu PSII (ABS/RC) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora u prijedpodnevnim (PR) i poslijepodnevnim satima (PO)

4.3.7. Hvatanje ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu PSII

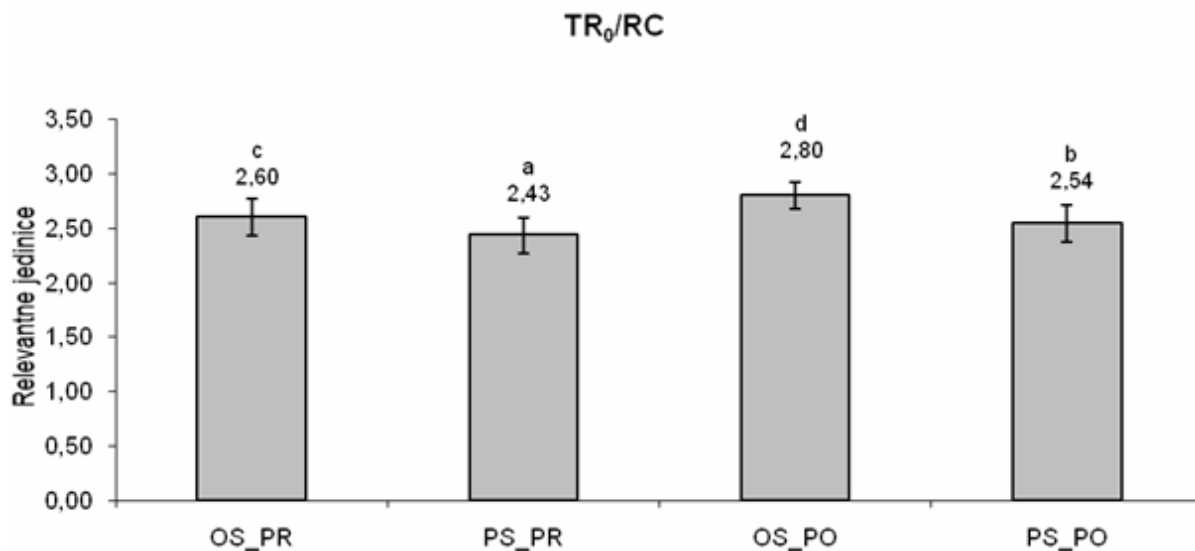
Srednje vrijednosti (izražene u relativnim jedinicama) i standardne devijacije hvatanja ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu PSII (TR_0/RC) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora prikazane su na slici 30.

Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u prijedodnevni satima (OS_PR) iznosila je $2,60 \pm 0,17$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u prijedodnevni satima (PS_PR) iznosila $2,43 \pm 0,17$.

Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u poslijepodnevni satima (OS_PO) iznosila je $2,80 \pm 0,12$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u poslijepodnevni satima (PS_PO) iznosila $2,54 \pm 0,17$.

Prema LSD testu, povišenje vrijednosti parametra TR_0/RC u poslijepodnevni satima bila je statistički značajna za obje generacije iglica, na razini značajnosti od 5% ($p > 0,05$). Također razlike između OS i PS iglica u ne-stresni uvjeti (prijepodnevni sati) bile su statistički značajne.

Rezultati označeni različiti slovni oznakama (a, b, c, d) međusobno se statistički značajno razlikuju prema LSD testu na razini značajnosti od 5% ($p < 0,05$) (slika 30).



Slika 30. Srednje vrijednosti i standardne devijacije hvatanja ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu PSII (TR_0/RC) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora u prijedodnevni (PR) i poslijepodnevni satima (PO)

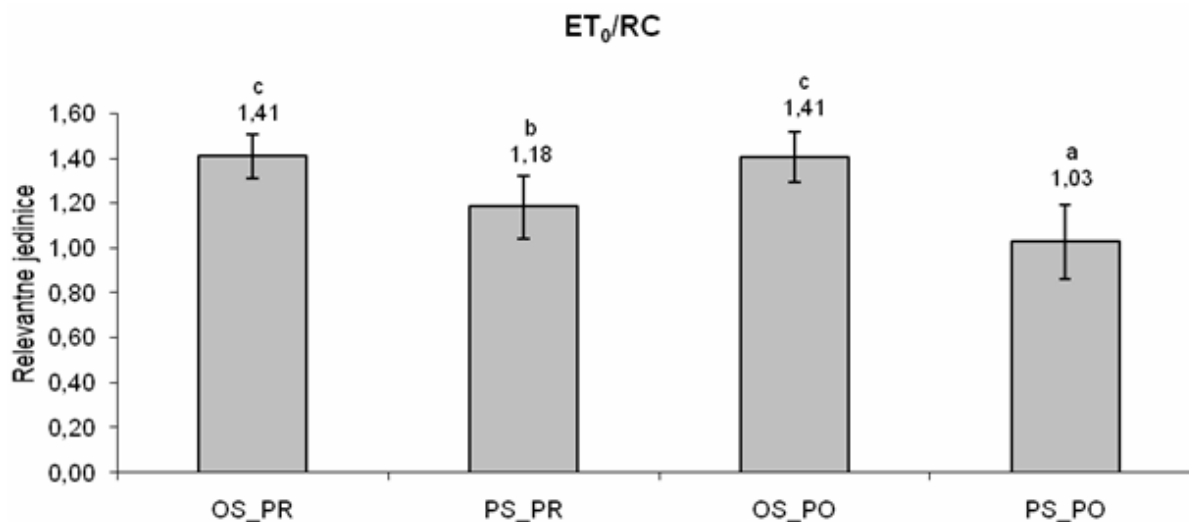
4.3.8. Prijenos elektrona po aktivnom reakcijskom središtu PSII

Srednje vrijednosti (izražene u relativnim jedinicama) i standardne devijacije prijenosa elektrona po aktivnom reakcijskom središtu PSII (ET_0/RC) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora prikazane su na slici 31.

Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u prijedodnevni satima (OS_PR) iznosila je $1,41 \pm 0,10$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u prijedodnevni satima (PS_PR) iznosila $1,18 \pm 0,14$.

Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u poslijepodnevni satima (OS_PO) iznosila je $1,41 \pm 0,11$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u poslijepodnevni satima (PS_PO) iznosila $1,03 \pm 0,16$. Prema LSD testu, smanjenje vrijednosti parametra ET_0/RC u poslijepodnevni satima bila je statistički značajna samo za prošlosezonske iglice (PS), na razini značajnosti od 5% ($p > 0,05$), dok ovosezonske iglice (OS) nisu pokazale promjenu vrijednosti ovog parametra u poslijepodnevni satima.

Razlike između OS i PS iglica u ne-stresnim uvjetima (prijedodnevni sati) bile su statistički značajne. Rezultati označeni različitim slovnim oznakama (a, b, c) međusobno se statistički značajno razlikuju prema LSD testu na razini značajnosti od 5% ($p < 0,05$) (slika 31).



Slika 31. Srednje vrijednosti i standardne devijacije prijenosa elektrona po aktivnom reakcijskom središtu PSII (ET_0/RC) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora u prijedodnevni (PR) i poslijepodnevni satima (PO)

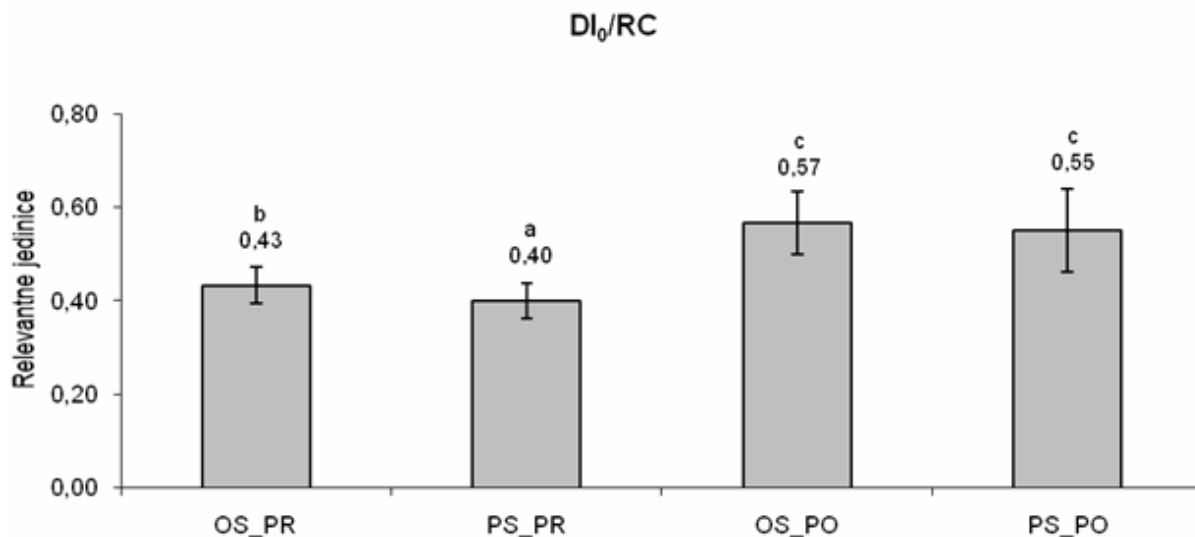
4.3.9. Disipacija pobudne energije po aktivnom reakcijskom središtu PSII

Srednje vrijednosti (izražene u relativnim jedinicama) i standardne devijacije disipacije pobudne energije po aktivnom reakcijskom središtu PSII (DI_0/RC) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora prikazane su na slici 32.

Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u prijedpodnevnim satima (OS_PR) iznosila je $0,43 \pm 0,04$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u prijedpodnevnim satima (PS_PR) iznosila $0,40 \pm 0,04$.

Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u poslijepodnevnim satima (OS_PO) iznosila je $0,57 \pm 0,07$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u poslijepodnevnim satima (PS_PO) iznosila $0,55 \pm 0,09$. Prema LSD testu, porast vrijednosti parametra DI_0/RC u poslijepodnevnim satima bila je statistički značajna za obje generacije iglica, na razini značajnosti od 5% ($p > 0,05$). Razlike između OS i PS iglica u ne-stresnim uvjetima (prijepodnevni sati) bile su statistički značajne.

Rezultati označeni različitim slovnim oznakama (a, b, c) međusobno se statistički značajno razlikuju prema LSD testu na razini značajnosti od 5% ($p < 0,05$) (slika 32).



Slika 32. Srednje vrijednosti i standardne devijacije disipacije pobudne energije po aktivnom reakcijskom središtu PSII (DI_0/RC) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora u prijedpodnevnim (PR) i poslijepodnevnim satima (PO)

4.3.10. Gustoća aktivnih reakcijskih središta PSII

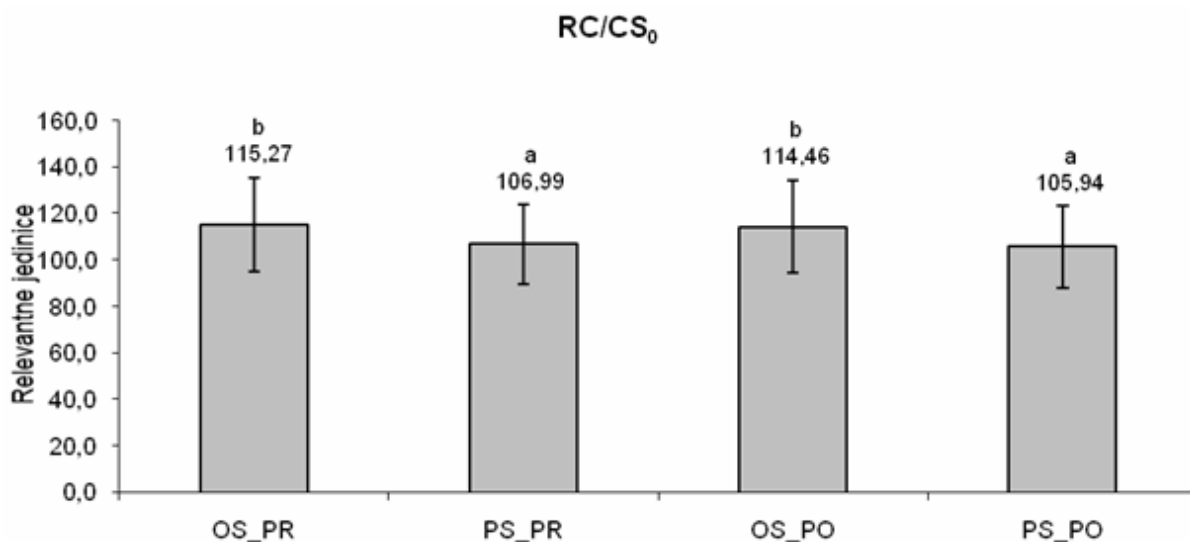
Srednje vrijednosti (izražene u relativnim jedinicama) i standardne devijacije gustoće aktivnih reakcijskih središtu PSII (RC/CS_0) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora prikazane su na slici 33.

Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u prijedpodnevnim satima (OS_PR) iznosila je $115,27 \pm 20,28$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u prijedpodnevnim satima (PS_PR) iznosila $106,99 \pm 17,22$.

Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u poslijepodnevnim satima (OS_PO) iznosila je $114,46 \pm 19,96$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u poslijepodnevnim satima (PS_PO) iznosila $105,94 \pm 17,75$.

Prema LSD testu, razlike između OS i PS iglica u ne-stresnim uvjetima (prijepodnevni sati) bile su statistički značajne na razini značajnosti od 5% ($p > 0,05$). Niti jedna generacija iglica nije pokazala statistički značajne promjene ovog parametra u stresnim uvjetima (poslijepodnevni sati).

Rezultati označeni različitim slovnim oznakama (a, b) međusobno se statistički značajno razlikuju prema LSD testu na razini značajnosti od 5% ($p < 0,05$) (slika 33).



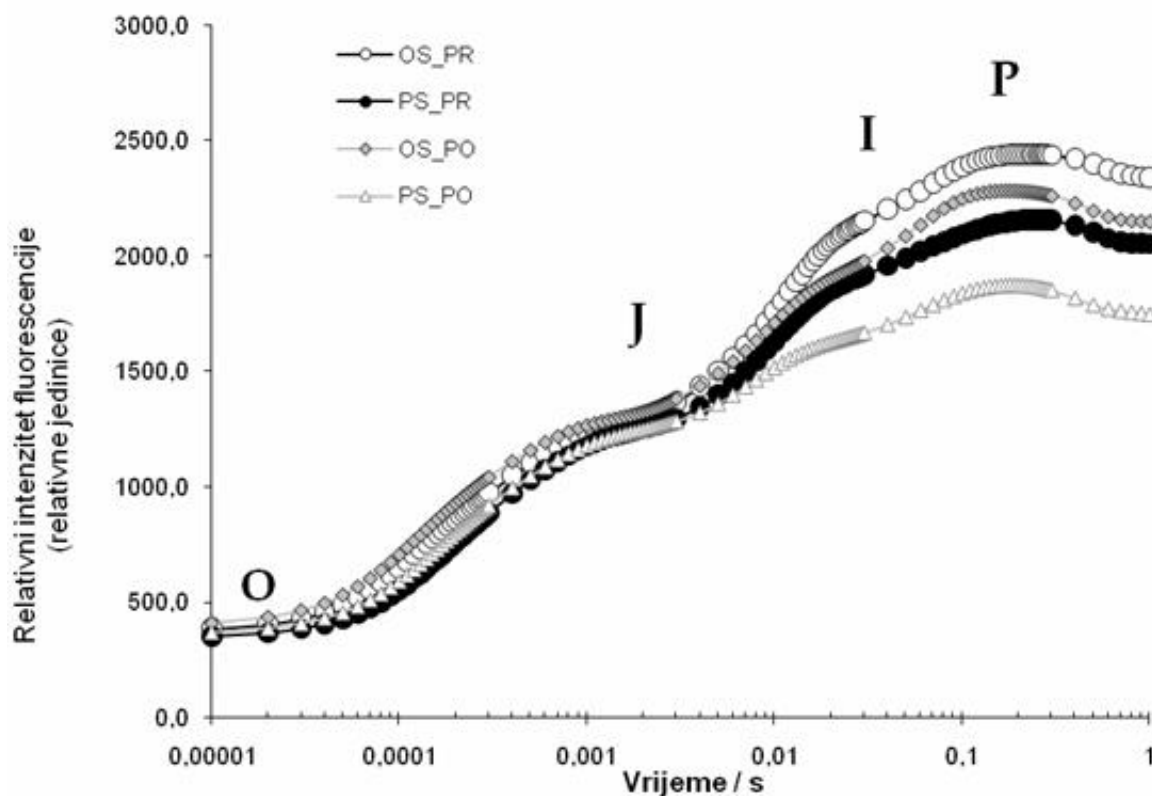
Slika 33. Srednje vrijednosti i standardne devijacije gustoće aktivnih reakcijskih središta PSII (RC/CS_0) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora u prijedpodnevnim (PR) i poslijepodnevnim satima (PO)

4.3.11. OJIP porast fluorescencije klorofila *a*

Nativne krivulje porasta intenziteta fluorescencije klorofila *a* (OJIP krivulje) prikazane su na slici 34. Porast intenziteta fluorescencije prikazan je na logaritamskoj skali vremena.

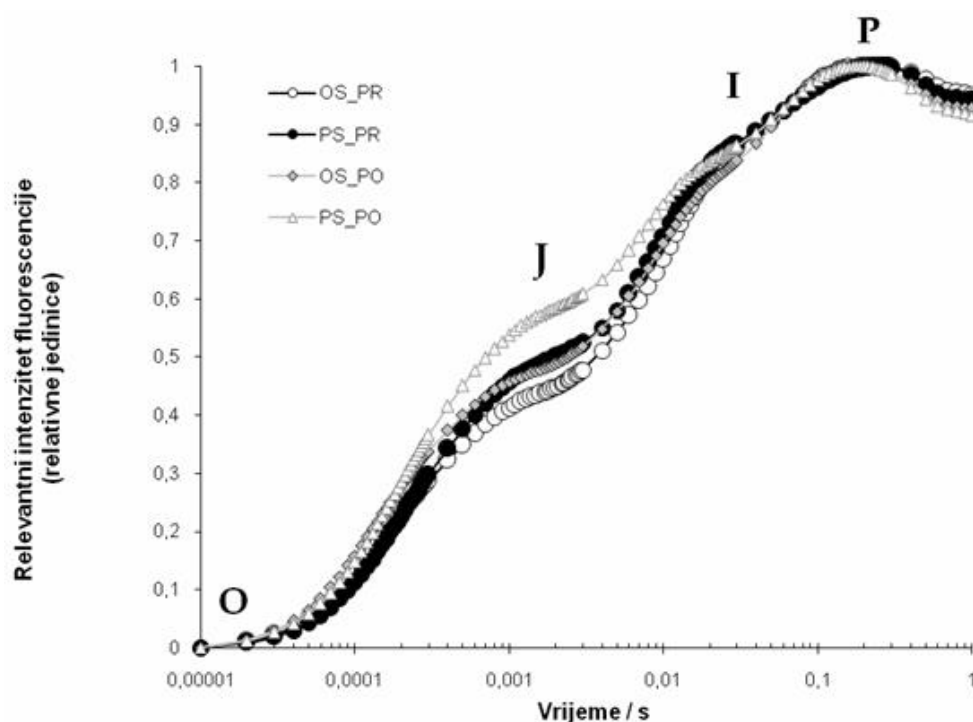
Svaka kategorija iglica (OS_PR, PS_PR, OS_PO i PS_PO) pokazuje tipičan oblik OJIP krivulje s jasno vidljivim J-stupnjem (nakon 2 ms) i I-stupnjem (nakon 30 ms). Intenzitet fluorescencije u O-stupnju (F_0 - na 50 μ s) je sličan za sve kategorije iglica, dok je intenzitet fluorescencije u P-stupnju (F_m - nakon 1 s) pokazao različite vrijednosti. Da bi se oblik OJIP krivulja mogao relevantno uspoređivati u svim tipičnim stupnjevima, potrebno je učiniti O-P normalizaciju.

Prikazane su nativne OJIP krivulje koje čine prosjek od 100 mjerenja. Na slici su označeni standardni koraci porasta intenziteta fluorescencije: O-stupanj (F_0 - nakon 50 μ s), J- stupanj (nakon 2 ms), I - stupanj (nakon 30 ms), te P- stupanj (F_m - nakon 1s) (slika 34).



Slika 34. Porast intenziteta fluorescencije klorofila *a* na logaritamskoj skali vremena na ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim iglicama (PS) alepskog bora u prijedpodnevnim satima (PR) i poslijepodnevnim satima (PO)

O-P normalizirane krivulje su prikazane na slici 35. Na normaliziranim krivuljama najuočljiviji je porast intenziteta fluorescencije u J-stupnju, i to posebno u PS_PO iglicama u odnosu na PS_PR iglice. Također, vidljiv je i porast intenziteta fluorescencije u J-stupnju u OS_PO u odnosu na OS_PR iglice. Vrijednosti intenziteta fluorescencije u I-stupnju nisu pokazala velika međusobna odstupanja. Prikazane O-P normalizirane OJIP krivulje čine prosjek od 100 mjerenja. Na slici su označeni standardni koraci porasta intenziteta fluorescencije: O-stupanj (F_0 - nakon $50 \mu s$), J- stupanj (nakon 2 ms), I- stupanj (nakon 30 ms), te P- stupanj (F_m - nakon 1 s) (slika 35).



Slika 35. O-P normalizirani porast intenziteta fluorescencije klorofila *a* na logaritamskoj skali vremena na ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim iglicama (PS) alepskog bora u prijepodnevnim satima (PR) i poslijepodnevnim satima (PO)

4.3.12. Varijabilna fluorescencija u J-stupnju

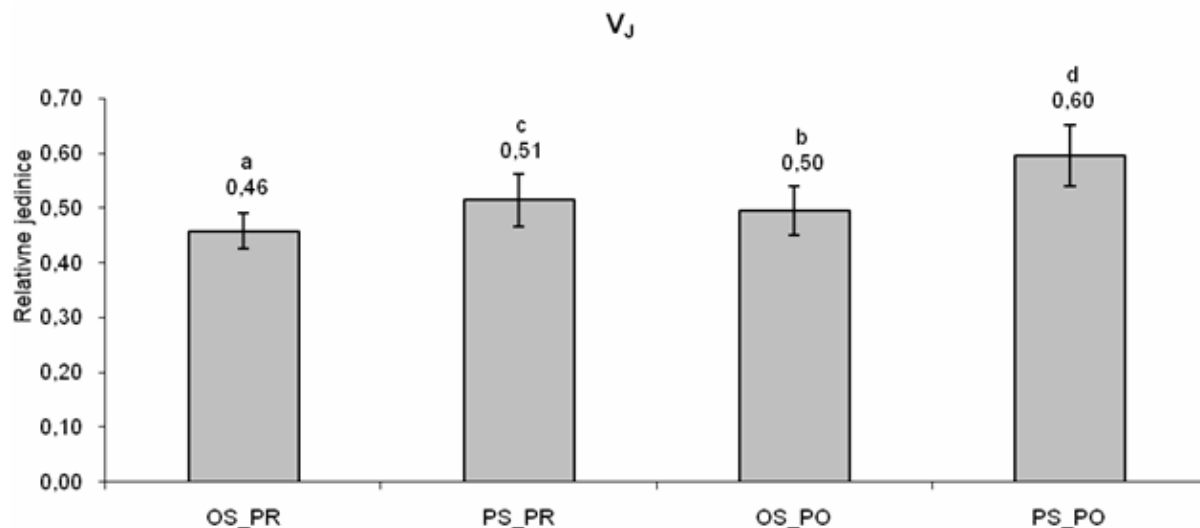
Srednje vrijednosti (izražene u relativnim jedinicama) i standardne devijacije varijabilne fluorescencije klorofila *a* u J-stupnju (nakon 2 ms) (V_J) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora prikazane na slici 36.

Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u prijedpodnevnim satima (OS_PR) iznosila je $0,46 \pm 0,03$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u prijedpodnevnim satima (PS_PR) iznosila $0,51 \pm 0,05$.

Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u poslijepodnevnim satima (OS_PO) iznosila je $0,50 \pm 0,04$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u poslijepodnevnim satima (PS_PO) iznosila $0,60 \pm 0,06$. LSD vrijednost iznosila je 0,0148.

Porast vrijednosti parametra V_J u poslijepodnevnim satima bila je statistički značajna za obje generacije iglica, na razini značajnosti od 5% ($p > 0,05$). Razlike između OS i PS iglica u nestresnim uvjetima (prijepodnevni sati) također su bile statistički značajne.

Prikazane O-P normalizirane OJIP krivulje koje čine prosjek od 100 mjerenja. Rezultati označeni različitim slovnim oznakama (a, b, c, d) međusobno se statistički značajno razlikuju prema LSD testu na razini značajnosti od 5% ($p < 0,05$) (slika 36).



Slika 36. Srednje vrijednosti i standardne devijacije varijabilne fluorescencije klorofila *a* u J-stupnju (nakon 2 ms) (V_J) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora u prijedpodnevnim (PR) i poslijepodnevnim satima (PO)

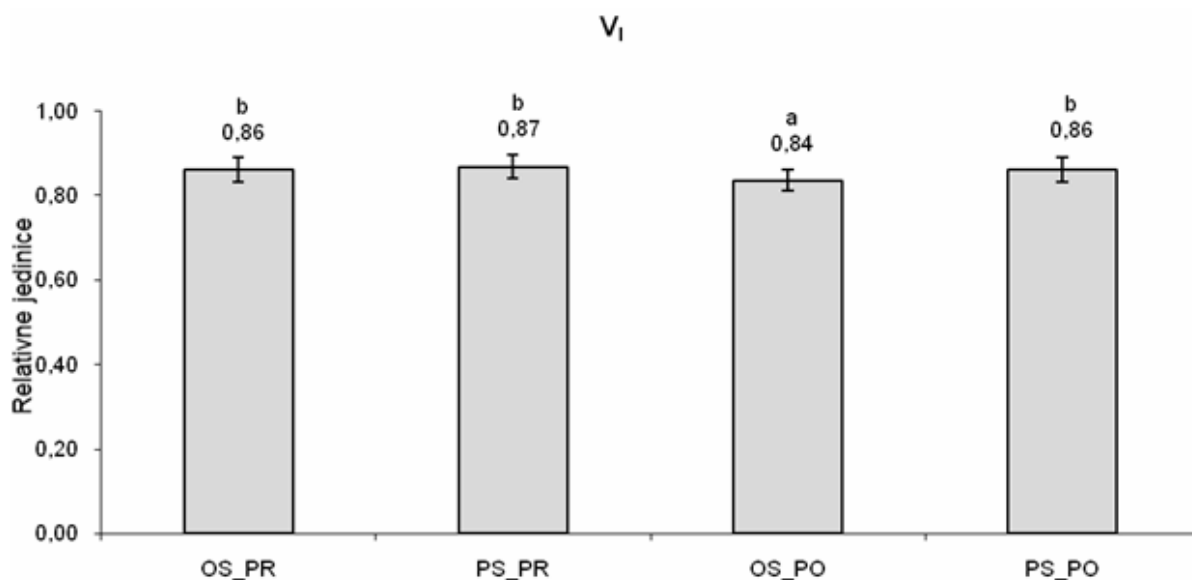
4.3.13. Varijabilna fluorescencija u I-stupnju

Srednje vrijednosti (izražene u relativnim jedinicama) i standardne devijacije varijabilne fluorescencije klorofila *a* u I-stupnju (nakon 30 ms) (V_I) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora prikazane su na slici 37.

Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u prijedpodnevnim satima (OS_PR) iznosila je $0,86 \pm 0,03$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u prijedpodnevnim satima (PS_PR) iznosila $0,87 \pm 0,03$.

Srednja vrijednost u ovosezonskim iglicama u poslijepodnevnim satima (OS_PO) iznosila je $0,84 \pm 0,02$, dok je srednja vrijednost za prošlosezonske iglice u poslijepodnevnim satima (PS_PO) iznosila $0,86 \pm 0,03$.

Prema LSD testu, smanjenje vrijednosti parametra V_I u poslijepodnevnim satima u OS iglicama, iako vrlo malenog iznosa, bilo je statistički značajan na razini značajnosti od 5% ($p > 0,05$), dok PS iglice nisu pokazale statistički značajnu promjenu u poslijepodnevnim satima. Razlika između OS i PS iglica u ne-stresnim uvjetima (prijepodnevni sati) nije bila statistički značajna. Rezultati označeni različitim slovnim oznakama (a, b) međusobno se statistički značajno razlikuju prema LSD testu na razini značajnosti od 5% ($p < 0,05$) (slika 37).



Slika 37. Srednje vrijednosti i standardne devijacije varijabilne fluorescencije klorofila *a* u I-stupnju (nakon 2 ms) (V_I) u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora u prijedpodnevnim (PR) i poslijepodnevnim satima (PO)

4.4. Sadržaj kemijskih elemenata

Srednje vrijednosti i standardne devijacije sadržaja kemijskih elemenata (Ca, Mg, K, P, Na, Cu, Fe, Mn, Zn, Ni, Pb i Cd) u ovosezonskim prošlosezonskim iglicama alepskog bora prikazane su u tablici 3. Udio ukupnog dušika (N) u ovosezonskim iglicama iznosio je $0,91 \pm 0,02\%$, a u prošlosezonskim iglicama $0,98 \pm 0,06\%$. Ova razlika nije bila statistički značajna.

Sadržaj kalcija (Ca) u ovosezonskim iglicama iznosio je $3.673,70 \pm 41,16$ mg/kg suhe tvari, a u prošlosezonskim iglicama $7.936,95 \pm 33,46$ mg/kg suhe tvari, što se pokazalo statistički značajnom razlikom.

Sadržaj magnezija (Mg) u ovosezonskim iglicama iznosio je $1.240,11 \pm 20,03$ mg/kg suhe tvari, a u prošlosezonskim iglicama $2.148,97 \pm 10,75$ mg/kg suhe tvari, što je statistički značajna razlika.

Sadržaj kalija (K) u ovosezonskim iglicama iznosio je $8.017,41 \pm 23,69$ mg/kg suhe tvari a u prošlosezonskim iglicama $3.531,11 \pm 20,67$ mg/kg suhe tvari, što se pokazalo statistički značajnom razlikom.

Sadržaj natrija (Na) u ovosezonskim iglicama iznosio je $3.52,58 \pm 38,45$ mg/kg suhe tvari, a u prošlosezonskim iglicama $1.344,38 \pm 29,20$ mg/kg suhe tvari, što je statistički značajna razlika.

Sadržaj bakra (Cu) u ovosezonskim iglicama iznosio je $4,21 \pm 0,05$ mg/kg suhe tvari, a u prošlosezonskim iglicama $2,77 \pm 0,04$ mg/kg suhe tvari, što se pokazalo statistički značajnom razlikom.

Sadržaj željeza (Fe) u ovosezonskim iglicama iznosio je $32,54 \pm 0,34$ mg/kg suhe tvari, a u prošlosezonskim iglicama $138,17 \pm 6,11$ mg/kg suhe tvari, što je statistički značajna razlika.

Sadržaj mangana (Mn) u ovosezonskim iglicama iznosio je $25,01 \pm 0,48$ mg/kg suhe tvari, a u prošlosezonskim iglicama $50,29 \pm 1,49$ mg/kg suhe tvari, što se pokazalo statistički značajnom razlikom.

Sadržaj cinka (Zn) u ovosezonskim iglicama iznosio je $27,13 \pm 0,36$ mg/kg suhe tvari, a u prošlosezonskim iglicama $16,24 \pm 0,18$ mg/kg suhe tvari, što je statistički značajna razlika.

Sadržaj nikla (Ni) u ovosezonskim iglicama iznosio je $0,14 \pm 0,02$ mg/kg suhe tvari, a u prošlosezonskim iglicama $0,24 \pm 0,04$ mg/kg suhe tvari, što se nije pokazalo statistički značajnom razlikom.

Sadržaj olova (Pb) u ovosezonskim iglicama bio je ispod razine detekcije metode ($< 0,10$ mg/kg suhe tvari), a u prošlosezonskim iglicama iznosio je $0,21 \pm 0,04$ mg/kg suhe tvari.

Sadržaj kadmija (Cd) u ovosezonskim iglicama iznosio je $0,04 \pm 0,01$ mg/kg suhe tvari, a u prošlosezonskim iglicama $0,08 \pm 0,01$ mg/kg suhe tvari, što se pokazalo statistički značajnom razlikom.

Sadržaj fosfora (P) u ovosezonskim iglicama iznosio je $1.139,00 \pm 17,06$ mg/kg suhe tvari, a u prošlosezonskim iglicama $719,43 \pm 12,68$ mg/kg suhe tvari, što je statistički značajna razlika.

Tablica 3. Srednje vrijednosti i standardne devijacije sadržaja kemijskih elemenata (Ca, Mg, K, Na, Cu, Fe, Mn, Zn, Ni, Pb, Cd i P) u ovosezonskim i prošlosezonskim iglicama alepskog bora

KEMIJSKI ELEMENT	OVOSEZONSKE IGLICE	PROŠLOSEZONSKE IGLICE	t	p(t)
Ukupni N (%)	$0,91 \pm 0,02$	$0,98 \pm 0,06$	1,917	NS
Ca (mg/kg)	$3.673,70 \pm 41,16$	$7.936,95 \pm 33,46$	139,207	$p < 0,05$
Mg (mg/kg)	$1.240,11 \pm 20,03$	$2.148,97 \pm 10,75$	69,249	$p < 0,05$
K (mg/kg)	$8.017,41 \pm 23,69$	$3.531,11 \pm 20,67$	247,154	$p < 0,05$
P (mg/kg)	$1.139,00 \pm 17,06$	$719,43 \pm 12,68$	34,188	$p < 0,05$
Na (mg/kg)	$352,58 \pm 38,45$	$1.344,38 \pm 29,20$	35,580	$p < 0,05$
Cu (mg/kg)	$4,21 \pm 0,05$	$2,77 \pm 0,04$	38,952	$p < 0,05$
Fe (mg/kg)	$32,54 \pm 0,34$	$138,17 \pm 6,11$	29,898	$p < 0,05$
Mn (mg/kg)	$25,01 \pm 0,48$	$50,29 \pm 1,49$	27,971	$p < 0,05$
Zn (mg/kg)	$27,13 \pm 0,36$	$16,24 \pm 0,18$	46,863	$p < 0,05$
Ni (mg/kg)	$0,14 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,04$	3,873	NS
Pb (mg/kg)	< LD	$0,21 \pm 0,04$	-	-
Cd (mg/kg)	$0,04 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$	4,899	$p < 0,05$

Statistička značajnost razlika prikazana je na razini značajnosti od 5% prema Studentovom t-testu, $p < 0,05$ - statistički značajna razlika, NS - nesignifikantna razlika.

5. RASPRAVA

Nepovoljni okolišni uvjeti mogu biti ne samo ograničavajući čimbenik biljnog rasta i razvoja, već mogu dovesti i do ozbiljnijih oštećenja na različitim razinama biološkog funkcioniranja biljaka. Objekt ovog istraživanja bile su ovosezonske i prošlosezonske iglice alepskog bora čije se prirodne i sadene sastojine učestalo mogu naći u obalnom području Jadranskog mora gdje se uzgaja u parkovima i nasadima, te se koristi u svrhu pošumljavanja degradiranog krša budući da razgradnjom njegovih iglica nastaje humus i šumsko tlo. Tijekom ljetnih mjeseci iglice alepskog bora izložene su utjecaju solnog stresa uz periodično povišene količine svjetlosti i temperature u poslijepodnevnim satima što može dovesti do fotoinhibicije, te posljedično tome i do oštećenja fotosintetskog aparata. Ukoliko kombinacija toplinskog, svjetlosnog i solnog stresa prijeđe određenu granicu tolerancije, a intenzitet i trajanje ovih stresora postanu ekstremni, postoji vrlo velika vjerojatnost za značajnije ogoljenje krošnje. Dosadašnja istraživanja fotosintetske učinkovitosti iglica alepskog bora ukazala su na mogućnost da je tolerancija OS i PS iglica, zbog različitih regulacijskih mehanizama procesa fotosinteze, različita na kombinacije toplinskog, svjetlosnog i solnog stresa. U tom kontekstu, fiziološke razlike između ovosezonskih i prošlosezonskih iglica alepskog bora istražene su određivanjem koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida, te određivanjem sadržaja kemijskih elemenata (Ca, Mg, K, Na, Cu, Fe, Mn, Zn, Ni, Pb, Cd i P).

Mjerenjem fluorescencije klorofila *a* metodom indukcije OJIP krivulje i JIP-testom, istražene su promjene učinkovitosti fotosustava II (PSII) i kvantitativne promjene regulacijskih mehanizama *in vivo* u iglicama različite starosti u ne-stresnim uvjetima (8-10 h) i u uvjetima svjetlosnog, temperaturnog stresa (13-15 h).

Istraživanja utjecaja okolišnih stresora na iglice četinjača dosegla su svoj vrhunac 80-ih i 90-ih godina prošlog stoljeća, pri čemu su u središtu istraživanja bili aeropolucija, nedostatak vode (suša) i poremećaji mineralne ishrane, a zatim i biotski ekološki čimbenici. Spomenuta istraživanja obuhvaćala su pretežno vrste rodova *Picea*, *Pinus* i *Abies*, a metodološki su bila vrlo raznovrsna, od kvantitativnih analiza kemijskih i biokemijskih parametara stresa (poput koncentracije kemijskih elemenata, fotosintetskih pigmenata, polifenola, neenzimskih antioksidansa, aktivnosti antioksidacijskih enzima kao što su superoksid-dismutaza, katalaza, preoksidaza, glutation-reduktaza, itd.), preko kvalitativnih mikroskopskih istraživanja (analiza histoloških promjena građe iglica, histokemijska lokalizacija pojedinih tvari poput polifenola, kaloze, škroba, itd.), do ultrastrukturnih promjena u organizaciji plastida, te finih mikroskopskih promjena na površini iglica poput promjena u građi epikutikularnog voska i u izgledu puči (Bačić i sur. 1999, Lepeduš i Cesar 2004).

Ova istraživanja su osim primjene imala i značaj bazičnih istraživanja, budući da su njihovi rezultati značajno doprinijeli poznavanju građe i funkcije iglica četinjača tijekom njihovog razvoja. Pri tome se fotosintetski aparat, koji je lociran u kloroplastima iglica pokazao kao jedan od neosjetljivijih dijelova stanice na djelovanje različitih vrsta stresora, a time i jedno od najznačajnijih mjesta regulacije tolerancije na stres. Kao ključna komponenta u regulaciji tolerancije na stres nametnuo se fotosustav II (veliki multiproteinski kompleks, građen od oko 25 polipeptida, smješten u grana-tilakoidima, koji ima funkciju voda-plastokinon oksidoreduktaze (Barber i sur. 2006).

Glavna uloga klorofila i karotenoida u procesu fotosinteze je prikupljanje fotona svjetlosti i transfer energije unutar fotosustava. Prikupljanje svjetlosne energije i potrošnja kemijskih ekvivalenata (ATP i NADPH) u fotosintezi moraju biti usklađeni na različitim razinama da bi se održali uvjeti homeostaze. Jedan od predloženih mehanizama za održavanje ovakvih uvjeta je i prilagodba koja se temelji na regulaciji biosinteze i razgradnje molekula klorofila. Biosinteza klorofila može se podijeliti u nekoliko faza (Taiz i Zeiger 1998). Biosinteza klorofila kreće od glutaminske kiseline koja se prevodi u 5-aminolevulinsku kiselinu (ALA). U narednoj fazi se dvije molekule 5-aminolevulinske kiseline kondenziraju, pri čemu nastaje porfobilinogen (PBG), a od njega pirolni prsten. U slijedećoj fazi dolazi do formiranja porfirinskog prstena, točnije protoporfirina IX. Ovaj dio biosintetskog puta je identičan za biosintezu klorofila i hema. Umetanjem magnezijevog atoma u strukturu protoporfirina IX i formiranja petog prstena (prsten E), nastaje protoklorofilid *a*. Enzim protoklorofilid-oksido-reduktaza reducira protoklorofilid *a* u klorofilid *a*. Tijek biosinteze klorofila vrlo je sličan kod različitih skupina fotosintetskih organizama. Najuočljivija razlika upravo je korak u kojem se protoklorofilid reducira u klorofilid, koji se kod cijanobakterija, alga, briofita, pteridofita i golosjemenjača može odvijati u tami, dok se u kritosjemenjača odvija isključivo na svjetlosti (Reinbothe i sur. 2010). Posljednja faza u biosintezi klorofila jest vezanje fitolnog repa na klorofilid *a* čime nastaje klorofil *a*. Ova reakcija katalizirana je enzimom klorofil-sintetaza. Iz klorofila *a* djelovanjem specifične oksigenaze izravno nastaje klorofil *b* (von Wettstein i sur. 1995, Suzuki i sur. 1997). Reakcija je reverzibilna, djelovanjem enzima klorofil *b* - reduktaze, klorofil *b* može izravno prijeći nazad u klorofil *a* (Suzuki i sur. 1997, Tanaka i sur. 1998). Smatra se da je ovaj mehanizam prilagodba na različite stresne uvjete okoliša u kojima je potrebno prilagođavati koncentraciju oba tipa klorofila trenutnim zahtjevima.

Nadalje, za proces biosinteze klorofila veliku važnost imaju određeni kemijski elementi, tj. njihova dostupnost. Istraživanja na različitim biljnim vrstama pokazala su da se nedostatak pojedinih elemenata (dušik, fosfor, kalij, kalcij, sumpor i magnezij) negativno odražava na biosintezu klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida. Osim toga, nedostatak ovih kemijskih elementata narušava karakterističnu ultrastrukturu kloroplasta u listovima, što se očituje u većoj brojnosti plastoglobula, krupnijim škrobnim zrnima, poremećajima u strukturi (izgledu i rasporedu) tilakoidnog sustava. Ovakve promijene u strukturi tkiva, stanica i pojedinačnih organela vrlo se uspješno koriste kao dijagnostički alat u istraživanjima utjecaja okoliša na biljke (Fink 1999).

Istraživanja sadržaja kemijskih elemenata u iglicama četinjača općenito se provode zbog nekoliko različitih razloga – utjecaj klimatskih promjena, antropogeno zagađenje te upotreba iglica, ali i drugih dijelova četinjača u farmaceutskoj industriji. Istraživanje provedeno u Francuskoj pokazalo je da je vodni režim u smislu lokalnog čimbenika važniji od općih klimatskih karakteristika kad je u pitanju rast i razmnožavanje alepskog bora (Vennetier i sur. 2018).

Ovo je od posebnog značaja u mediteranskom području, zbog sve češćih i intenzivnijih sušnih razdoblja. Istraživanja sadržaja teških metala u iglicama alepskog bora provedena u Jordanu pokazala su značajan utjecaj industrije na povišenje sadržaja teških metala u iglicama, što ih čini potencijalno dobrim bioindikatorom za monitoring ovakvih zagađenja u suhim klimatskim područjima (Al-Alawi i Mandiwana 2007).

Istraživanja sadržaja kemijskih elemenata u iglicama različitih vrsta borova (*Pinus* sp.) pokazuju varijabilnost kako između različitih vrsta roda *Pinus* tako i između vrijednosti za pojedinu vrstu na različitim lokacijama (Cindrić i sur. 2018, Zeiner i sur. 2018, Vennetier i sur. 2018, Zeiner i Juranović Cindrić 2021). U iscrpnom istraživanju sadržaja kemijskih elemenata u iglicama alepskog bora u Hrvatskoj, na području jadranske obale pokazane su regionalne razlike u sadržaju 21-og kemijskog elementa na 12 lokacija (Zeiner i sur. 2019). Također, isti autori pokazali su kako sadržaj kemijskih elemenata u iglicama alepskog bora ne ovisi isključivo o korijenovom sustavu već je u velikoj mjeri uvjetovano i unosom direktno putem suhe i vlažne precipitacije na iglice. Sadržaj kemijskih elemenata u prošlosezonskim iglicama alepskog bora u ovom istraživanju (Tablica 3) u skladu su s podacima prikazanim u istraživanju spomenutih autora, u odnosu na prosječne vrijednosti sadržaja kemijskih elemenata na svim istraživanim lokacijama, a posebno u odnosu na vrijednosti izmjerene na lokaciji Vodice koja je najbliža lokaciji korištenoj u ovom istraživanju (Primošten). S obzirom na navedeno, može se zaključiti kako je mineralna ishrana iglica alepskog bora korištenih u ovom istraživanju bila u granicama normalnih vrijednosti, zbog čega će u daljnoj raspravi biti dan naglasak na usporedbu sadržaja kemijskih elemenata bitnih za proces fotosinteze, između ovosezonskih i prošlosezonskih iglica.

Iz podataka tablice 3 vidljivo je da je sadržaj magnezija bio značajno povišen u PS iglicama u odnosu na OS iglice, što je u skladu s izmjerenim koncentracijama klorofila i ukupnih karotenoida (slike 18-21). Magnezij je sastavni dio molekule klorofila, a osim toga u biljci dolazi i kao sastavni dio različitih enzima (peptidaze, dehidrogenaze, karboksilaze, dekarboksilaze i dr.) (Vukadinović i Lončarić 1998). Nedostatak magnezija može dovesti do kloroze i do promjena u anatomske građi iglica četinjača koje se očituju u distorziji stanica floema (Fink 1999, Lepeduš i Cesar 2004). Slično magneziju, sadržaj kalcija, željeza i mangana također je bio povišen u PS iglicama (Tablica 3). Željezo je također izuzetno važno za proces fotosinteze, budući da je neophodno za biosintezu klorofila *a*. Također, željezo ulazi u sadržaj Citokrom *b6f* kompleksa i čini njegov ključni dio (Fe-S centri) za prijenos elektrona s plastokinona na plastocijanin. Također (Fe-S centri) ulaze u sadržaj feredoksina (Vukadinović i Lončarić 1998). To je mali protein strome (11 kDa), topiv u vodi, koji sadrži dva Fe-S klastera, a uloga mu je primanje elektrona s plastocijanina koje prenosi elektrone na NADP⁺ pomoću enzima feredoksin-NADP⁺ reduktaze (FNR) (Taiz i Zeiger 1998). Osim toga, željezo je i dio različitih prostetskih skupina ta je kao takvo važno za aktivnost različitih enzima (npr. peroksidaze, katalaze, itd.). Mangan je također izuzetno važan u procesu fotosinteze. Dolazi kao dio kompleksa koji ima funkciju fotolize vode (OEC, eng. „*Oxygen-Evolving Complex*“). U središte OEC kompleksa nalazi se nakupina od četiri Mn-iona koji prihvataju četiri ekscitona s antena-kompleksa PS II pri čemu manganski klaster prelazi s osnovnog (S₀) u četiri različita oksidacijska stanja, označena kao i S₁-S₄ (Kok i sur. 1970).

Kao i u slučaju željeza, mangan je sastavni dio mnogih enzima, značajan je za fiksaciju dušika, te nedostatak ovog mikroelementa može dovesti do pojave kloroze u biljkama (Vukadinović i Lončarić 1998).

Prethodna istraživanja elongacije iglica četinjača i razvoja njihove glavne uloge (kompetentna fotosinteza) pokazala su povezanost promjena u metabolizmu ugljikohidrata (razgradnja škroba tijekom elongacije mladih iglica) (Egger i Hammp 1996). Kod porasta razine klorofila i karotenoida, te razvojem tilakoidnog sustava u kloroplastima, dolazi do fluktuacije razine ukupnih klorofila i omjera klorofila *a* i klorofila *b* u ovosezonskim i prošlosezonskim iglicama alepskog bora, pri čemu dolazi do sniženja koncentracije ovih pigmenata u ljetnim mjesecima (Lepeduš i sur. 2003, Elvira i sur. 1998, Senser i sur. 1975). Gotovo dvostruko više razine klorofila *a*, klorofila *b*, te ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida (slike 18-21) u prošlosezonskim iglicama u odnosu na ovosezonske iglice, u skladu su s njihovim rezultatima kao i prethodno opisanim odnosima i fluktuacijama fotosintetskih pigmenata tijekom razvoja iglica smreke (Lepeduš i sur. 2008). Pri tome valja istaknuti kako je u ovom radu dokazano da je omjer koncentracija klorofila *a* i klorofila *b*, kao i omjer ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida bio praktički 1:1 između ovosezonskih i prošlosezonskih iglica (slike 22 i 23), slično kao i u spomenutim istraživanjima.

Iz opisanog se može zaključiti kako je kod različitih vrsta četinjača dinamika akumulacije fotosintetskih pigmenata vrlo slična tijekom elongacije i razvoja iglica. Razlog za ovakav obrazac akumulacije fotosintetskih pigmenata je najvjerojatnije prilagodba jakom osvjetljenju kojemu su iglice izložene tijekom ljetnih mjeseci (lipanj), a koja se temelji na regulaciji biosinteze i razgradnje molekula pigmenata. Prethodna istraživanja koja podržavaju ovu hipotezu pokazala su da je niža koncentracija klorofila u mladim listovima, u odnosu na razvijene listove, povezana s akumulacijom esencijalnih fotosintetskih proteina, kao i s povišenjem razine aktivnosti askorbat-peroksidaze (APX), jednog od ključnih antioksidacijskih enzima u kloroplastima (Lepeduš i sur. 2011, Mlinarić i sur. 2017).

Vrijednost omjera klorofila *a* i klorofila *b* je vrlo važna za održavanje fiziološke funkcije iglica, budući da su razine ovih pigmenata vrlo usko povezane s akumulacijom proteina za prikupljanje svjetlosti u PSII (LHCII proteini), te su na taj način izravno uključeni u regulaciju primarne fotokemije PSII (Mathis i Burkey 1989, Tanaka i Tanaka 2000, Sato i sur. 2015). Vrijednosti maksimalnog prinosa kvanta PSII (Fv/Fm) u ovosezonskim i prošlosezonskim iglicama alepskog bora (slika 24) bile su identične (0,86 rel. j.) što je bila indicacija da obje generacije iglica imaju potpuno razvijen i funkcionalan fotosustav II (Schreiber i sur. 1994).

Budući da primarna fotokemija fotosustava II ovisi isključivo o procesima apsorpcije svjetlosti i hvatanja ekscitona, može se zaključiti kako se ti procesi odvijaju u punom opsegu u mladim ovosezonskim iglicama. Međutim, vrijednosti indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) bile su značajno niže u prošlosezonskim iglicama (2,06 rel. j.) nego u ovosezonskim iglicama (2,38 rel. j.) (slika 25).

Ovaj rezultat bio je potpuno neočekivan jer su prethodna istraživanja fotosintetske učinkovitosti različitih vrsta pokazale da mladi listovi koji su još u fazi elongacije, uz niže razine fotosintetskih pigmenata, imaju i slabiju fotosintetsku učinkovitost (Lepeduš i sur. 2011, Katanić i sur. 2012, Mlinarić i sur. 2016).

Parametar PI_{ABS} se smatra boljim indikatorom vitalnosti biljaka u odnosu na parametar F_v/F_m , s obzirom da su u njegov izračun, uz procese apsorpcije pobudne svjetlosti i hvatanja ekscitona, uključeni i procesi usmjeravanja uhvaćenih ekscitona u lanac transporta elektrona te rasipanja suviška pobudne svjetlosne energije u obliku topline (Tsimilli-Michael i sur. 2000, van Heerden i sur. 2007).

Usporedba komponenata (RC/ABS , $ET_0/(TR_0-ET_0)$ i TR_0/DI_0) indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) pokazala je razlike između ovosezonskih i prošlosezonskih iglica (slika 25). Najveća razlika pokazala se za parametar transporta elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A ($ET_0/(TR_0-ET_0)$), dok je za parametar RC/ABS razlika bila vrlo mala, ali signifikantna, a za parametar TR_0/DI_0 nije bilo signifikantne razlike.

Iz navedenog se može zaključiti da ovosezonske iglice posjeduju bolju sposobnost usmjeravanja uhvaćene pobudne energije u lanac transporta elektrona. Objašnjenje ovog fenomena moguće je dobiti analizom oblika OJIP krivulja (slike 34 i 35).

Kad se biljni materijal koji je prilagođen uvjetima tame osvjetli saturacijskom svjetlošću, dolazi do indukcije polifaznog porasta fluorescencije klorofila *a*, tzv. OJIP krivulje (Strasser i Strasser 1995). Usporedbom oblika O-P normaliziranih OJIP krivulje, te izračunom varijabilne fluorescencije na J-stupnju (nakon 2 ms) (V_J) i I-stupnju (nakon 30 ms) (V_I), moguće je zaključivati o procesima prijenosa elektrona na razini plastokinona u PSII. Normalizirane krivulje pokazale su razlike u O-J koraku između ovosezonskih i prošlosezonskih iglica (slika 35), te povišene vrijednosti parametra V_J (slika 36) u prošlosezonskim iglicama. Porast fluorescencije na J-stupnju i posljedične vrijednosti parametra V_J ukazuje na akumulaciju reduciranih oblika plastokinona (Q_A^- , $Q_A^-Q_B$ i $Q_A^-Q_B^-$) koji nastaju uslijed ograničene re-oksidacije Q_A^- (Strasser i sur. 2004). Budući da nije bilo razlike u obliku OJIP krivulja u J-I i I-P koracima, niti je bilo statistički značajne razlike u vrijednostima parametra V_I između ovosezonskih i prošlosezonskih iglica, može se zaključiti da niže vrijednosti parametra ($ET_0/(TR_0-ET_0)$) nisu bile uzrokovane niti akumulacijom Q_B^- -ne-reducirajućih aktivnih središta PSII ($Q_A^-Q_{B2}^-$), niti redukcijom prijenosnika elektrona na akceptorskoj strani fotosustava I (PSI) (Govindjee 2004, Kalaji i sur. 2017).

Iako usporedba gustoće aktivnih reakcijskih središta PSII (RC/CS_0) između ovosezonskih i prošlosezonskih iglica nije pokazala statistički značajne razlike (slika 33), razlika se pokazala u specifičnim protocima energije po aktivnom reakcijskom središtu (slike 29-32).

Parametri ABS/RC, TR_0/RC i DI_0/RC pokazali su povišene vrijednosti u ovosezonskim iglicama u odnosu na prošlosezonske, dok u parametru ET_0/RC nije bilo razlike. Ovakav obrazac dinamike specifičnih protoka energije (povišena apsorpcija i hvatanje ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu) u skladu je s opisanom porastom fluorescencije na J-stupnju (slika 35) i vrijednosti parametra V_J (slika 36). Obzirom da parametar ABS/RC opisuje ukupnu apsorpciju svjetlosti od strane molekula klorofila svih reakcijskih središta podijeljenu s brojem aktivnih reakcijskih središta u smislu sposobnosti redukcije Q_A , vrijednost ovog parametra je izravno ovisna o omjeru aktivnih i neaktivnih reakcijskih središta, tj. prelasku određenog broja reakcijskih središta u Q_A -nereducirajuća aktivna središta (Mehta i sur. 2010a,b). Takva reakcijska središta PSII imaju sposobnost učinkovite apsorpcije pobudne svjetlosti, ali ne mogu reducirati Q_A zbog čega dolazi do povišene disipacije suviška apsorbirane pobudne svjetlosti (DI_0/RC) (slika 32), (Strasser i sur. 2004, Yusuf i sur. 2010).

Čak i kada nema drugih stresnih čimbenika, velika količina svjetlosti u kombinaciji s povišenom temperaturom tijekom ljetnih dana može dovesti do fotoinhibicije. To je proces u kojem dolazi do usporavanja ili potpunog zaustavljanja procesa fotosinteze što može dovesti do oštećenja fotosintetskog aparata, a za posljedicu najčešće ima smanjenje prinosa kvanta svjetlosti i fotokemijske aktivnosti fotosustava II, oštećenja ili smanjenja sadržaja fotosintetskih pigmenata i proteina, te oštećenja biomembrana (Perl-Treves i Perl 2002, Takahashi i Murata 2008). Istraživanja utjecaja povišenih temperatura i suviška svjetlosti na fotosintetski aparat drvenastih vrsta pokazala su različite strategije prilagodbe s obzirom na starost listova (Lepeduš i sur. 2011, Mlinarić i sur. 2016).

Općenito, u uvjetima opisanog okolišnog stresa mlađi listovi pokazuju pojačanu akumulaciju fotosintetskih pigmenata, posebno karotenoida koji imaju zaštitnu ulogu, dok stariji listovi reagiraju smanjenjem sadržaja klorofila, te na taj način prilagođavaju apsorpciju svjetlosti trenutnom fotosintetskom kapacitetu. Nadalje, prilagodbe na uvjete visokih temperatura i svjetlosti regulirane su akumulacijom glavnih fotosintetskih proteina, poput proteina D1, citokroma f , te Rubisco-a. Kod mlađih listova pokazana je slabija akumulacija ovih proteina što je posebno izraženo tijekom oporavka od fotoinhibicije u noćnim satima, a zbog čega je smanjenje fotosintetske učinkovitosti kod njih više izraženo nego kod starijih listova. Dodatno opterećenje na fotosintetski aparat kod priobalnih mediteranskih vrsta kao što je alepski bor, ima i povišeni salinitet što dodatno snižava fotosintetsku učinkovitost (Morales i sur. 2008). Veliki broj istraživanja pokazao je da mehanizmi djelovanja solnog stresa na fotosintetski aparat mogu imati osmotski i ionski utjecaj, te mogu značajno narušiti funkcioniranje fotosinteze na različitim razinama, što se poglavito odražava na promjene u molekularnoj organizaciji i funkciji fotosustava II (Jajoo 2014).

Obzirom da je utjecaj povišene količine svjetlosti i povišene temperature na iglice alepskog bora tijekom ljeta najčešće u kombinaciji s utjecajem solnog stresa, jer je riječ o stablima koja rastu uz samu obalu, ovo istraživanje je obuhvatilo analizu učinkovitosti fotosinteze tijekom stresnih uvjeta u poslijepodnevnim satima (13-15h), kako bi se razjasnili regulacijski mehanizmi fotosinteze na razini protoka energije u PSII.

Statistički značajno sniženje vrijednosti maksimalnog prinosa kvanta PSII (F_v/F_m) (slika 24) za 3,49% u ovosezonskim i za 4,66% u prošlosezonskim iglicama u poslijepodnevnim satima pokazuje da je u stresnim uvjetima primarna fotokemija PSII zadržala svoju punu funkcionalnost u obje kategorije iglica (vrijednosti više od 0,75 relevantnih jedinica) (Bolhar-Nordenkamp i sur. 1989). Vrijednosti indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) (slika 25) pokazale su postotno znatno veće smanjenje vrijednosti u poslijepodnevnim satima u odnosu na parametar F_v/F_m , za 35,30% u ovosezonskim i za čak 48,06% u prošlosezonskim iglicama.

Ovi podaci upućuju na zaključak da su prošlosezonske iglice znatno osjetljivije na stresne uvjete tijekom poslijepodnevni sati. Parametar koji je pokazao najveću razliku u stresnim u odnosu na ne-stresne uvjete bio je prijenos elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A ($ET_0/(TR_0-ET_0)$) (slika 28). U ovosezonskim iglicama vrijednosti ovog parametra bile su snižene za 14,17%, dok su u prošlosezonskim iglicama bile snižene za 28,12% u poslijepodnevnim satima. Ovi rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjima koja su pokazala da su snižene vrijednosti indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) bile velikim dijelom uzrokovane sniženom stopom prijenosa elektrona u uvjetima visokog saliniteta (Mehta i sur. 2010a,b, Kalaji i sur. 2011). Također, vrijednosti parametra prijenosa elektrona po aktivnom reakcijskom središtu PSII (ET_0/RC) (slika 31), pokazale su sličan trend u prošlosezonskim iglicama gdje su vrijednosti ovog parametra bile snižene za 12,71% u poslijepodnevnim satima. U ovosezonskim iglicama nije došlo do sniženja vrijednosti parametra ET_0/RC u poslijepodnevnim satima, što pokazuje kako su prošlosezonske iglice značajno osjetljivije na inhibiciju prijenosa elektrona u fotosintetskom aparatu u uvjetima stresa. Analizom vrijednosti sadržaja natrija (Tablica 3) vidljivo je da nakupljanje natrija u iglicama alepskog bora tijekom jedne godine (sezone) značajno utječe na stres, budući da su ovosezonske iglice sadržavale svega 26,23% natrija u odnosu na sadržaj izmjeran u prošlosezonskim iglicama. Gotovo 4 puta veća koncentracija natrija u prošlosezonskim iglicama u odnosu na ovosezonske iglice vrlo je vjerojatno bila dodatni stresni čimbenik (uz povišenu temperaturu i količinu svjetlosti u poslijepodnevnim satima) koji je značajno pridonio sniženju stope prijenosa elektrona u kloroplastima, a samim tim i sniženju indeksa fotosintetske učinkovitosti.

Analizom oblika O-P normaliziranih OJIP krivulja (slike 34 i 35) može se uočiti kako u stresnim uvjetima dolazi do porasta varijabilne fluorescencije na J-stupnju (nakon 2 ms), ali ne i u I-stupnju (nakon 30 ms) i to u obje kategorije iglica. Izračunom varijabilne fluorescencije na J-stupnju (V_J) (slika 36.) i I-stupnju (V_I) (slika 37), kvantitativno je potvrđeno da je porast varijabilne fluorescencije na J-stupnju u poslijepodnevnim satima bio statistički značajan i u ovosezonskim (8,00%) i u prošlosezonskim (16,67%) iglicama. Promjena varijabilne fluorescencije na I-stupnju, iako znatno manje vidljiva, bila je statistički signifikantna samo u ovosezonskim iglicama (za 2,33% u poslijepodnevnim satima).

Iz ovih podataka je vidljivo kako je veća osjetljivost prošlosezonskih iglica u odnosu na ovosezonske, na stresne uvjete u poslijepodnevnim satima uzrokovana regulacijom prijenosa elektrona na razini plastokinona, točnije uslijed ograničene re-oksidacije Q_A^- (Strasser i sur. 2004). Rana istraživanja utjecaja povišene temperature i osvjetljenja na kloroplaste intaktnih listova viših biljaka pokazala su povezanost sniženja stope fiksacije CO_2 i porasta fluorescencije klorofila *a* (Schreiber i Berry 1977). Navedeni autori su ovaj fenomen povezali prvenstveno s ireverzibilnom denaturacijom fotosintetskih proteina (prvenstveno Calvin-Benson-ovog ciklusa), budući da su nakon oporavka prinosi fluorescencije bili uspješno oporavljeni. Isti autori su pokazali da povišeni intenzitet svjetlosti tijekom toplinskog stresa ima zaštitnu ulogu od oštećenja tilakoidnih membrana. U njihovom istraživanju povišeni intenzitet svjetlosti omogućio je zadržavanje pune fotosintetske učinkovitosti pri povišenoj temperaturi koja je u uzorcima prilagođenim tami uzrokovala pad fotosintetske učinkovitosti na 50% vrijednosti. Pregled novijih istraživanja pokazuje da su glavna mjesta djelovanja toplinskog stresa u biljaka OEC kompleks PSII, fiksacija CO_2 i produkcija ATP-a (Allakhverdiev i sur. 2008, Kalaji i sur. 2016). Također, pokazano je da umjereni toplinski stres neće uzrokovati veća oštećenja PSI u tilakoidnim membranama. Tek nakon prelaska određene kritične temperature oštećenje je ireverzibilno uslijed inhibicije mehanizama popravka PSII, prvenstveno oporavka vezanog uz D1 protein. Za djelovanje toplinskog stresa na PSII karakteristična je pojava tzv. K-stupnja (na 300 μs) za kojeg se misli da nastaje uslijed inaktivacije OEC kompleksa zbog deplecije iona mangana i nemogućnosti prijenosa elektrona između feofitina i primarnog akceptora (Q_A), (Strasser i sur. 2000, Lazar 2006).

Kombinirani utjecaj jakog osvjetljenja i povišenih temperatura na listove različite starosti istražen je kod različitih drvenastih vrsta (Krause i sur. 1995, Mlinarić i sur. 2016). Rezultati prethodnih istraživanja su pokazali da su mladi listovi više podložni fotoinhibiciji temeljenoj na parametru F_v/F_m . Fotoinhibitorno djelovanje kombinacije spomenutih stresora na PSII u listovima smokve (*Ficus Carica* L.) uzrokovalo je različite mehanizme tolerancije na ovaj tip stresa (Mlinarić i sur. 2017). Razvijeni listovi pokazali su stabilnu akumulaciju LHC proteina što se reflektiralo kao pojava negativne L-vrpce koja indicira dobru povezanost antena, te bržu razgradnju D1 proteina od mladih listova. Razvijeni listovi su imali bolju akumulaciju D1 proteina tijekom noći što im je omogućilo brži oporavak u odnosu na mlade listove.

Sadržaj natrija bio je oko četiri puta viši u PS iglicama u odnosu na OS iglice (Tablica 3), što indicira mogućnost uzrokovanja solnog stresa uslijed izloženosti PS iglica tijekom dužeg vremenskog razdoblja (rujan - lipanj iduće godine). Povišeni salinitet djeluje trojako na biljke: smanjenjem vodnog potencijala, narušavanjem ionske homeostaze, te uzrokovanjem toksičnosti (Mbarki i sur. 2018). Zbog toga su pogođeni različiti biljni organi kao i različiti biološki procesi poput klijanja, razvoja korijena, plodnosti, parametri koji utječu na biljnu biomasu (npr. visina biljke, razvoj listova, itd.), te posebice proces fotosinteze. Ovakvo djelovanje se uvelike reflektira na rast i razvoj biljaka budući da povišeni salinitet mijenja sposobnost primanja vode i nutrijenata, te na taj način uzrokuje metaboličke promjene vidljive kroz poremećaje hormonske ravnoteže, izmjene plinova i produkciju reaktivnih kisikovih jedinki. Utjecaj povišenog saliniteta na biološke procese u biljkama uzrokuje tri vrste biološkog odgovora.

Fiziološki odgovor obuhvaća procese kao što su gubitak turgora i osmotska prilagodba, smanjenje koncentracije CO_2 u tkivu zbog zatvaranja puči, te snižavanje vrijednosti neto-fotosinteze što dovodi do usporenog rasta biljke. Biokemijski odgovor na povišeni salinitet vidljiv je kroz akumulaciju različitih metabolita (npr. prolin, glutation, malondialdehid, glicin betain, itd.), sniženu aktivnost enzima RubisCO, te povišene aktivnosti antioksidacijskih enzima (npr. superoksid-dismutaze, katalaze, askorbat-peroksidaze, itd.). Molekularna razina biološkog odgovora na povišeni salinitet očituje se u promijenjenoj ekspresiji gena koji kodiraju proteine odgovorne za toleranciju na solni stres, te gena uključenih u biosintezu apscizinske kiseline (ABA). Utjecaj povišenog saliniteta na proces fotosinteze istraživan je na velikom broju biljnih vrsta (Misra i sur. 2001, Debez i sur. 2008, Kachout i sur. 2012, Benzarti i sur. 2012, Pompeiano i sur. 2016, Stefanov i sur. 2016, Sun i sur. 2016, Jia i sur. 2016, Kan i sur. 2017, Kalaji i sur. 2018).

Visoki salinitet uzrokuje snižavanje vrijednosti neto fotosinteze što je uzrokovano sniženim ili potpuno blokiranim prijenosom elektrona. Također, utjecaj osmotskog i ionskog učinka solnog stresa različit je u odnosu na fotosintetski aparat (Jajoo 2014).

Osmotski učinak dovodi do dehidracije, što za posljedicu ima zatvaranje puči i snižavanje koncentracije CO_2 u tkivu, ultraskruturane promijene u kloroplastima, te inaktivaciju elektronskog transporta koja je obično reverzibilna. Ionski učinak solnog stresa adresiran je pretežno na fotosustav II (PSII), a vidljiv je kroz strukturnu reorganizaciju PSII koja za posljedicu ima oštećenja OEC kompleksa (inhibicija prijenosa elektrona na donorskoj strani PSII), promjene u heterogenosti antena PSII (adaptivni mehanizam koji uključuje različitu zastupljenost α , β - i γ -centara), promijene u heterogenosti reducirajuće strane PSII (zastupljenost Q_B -reducirajućih i Q_B -ne-reducirajućih reakcijskih središta PSII) te inhibiciju aktivnosti enzima Calvin-Bensonov-og ciklusa. Također toksični učinak visokog saliniteta, sinergistički djelujući sa svjetlosnim i temperaturnim stresom, vidljiv je u povišenoj koncentraciji reaktivnih kisikovih jedinki (ROS, eng. „*Reactive Oxygen Species*“) koji mogu ireverzibilno oštetiti fotosintetske proteine, te onemogućiti popravak istih. Istraživanja provedena na ječmu pokazala su kako je OEC-kompleks jedno od najosjetljivijih mjesta djelovanja solnog stresa. Došlo je do sniženja vrijednosti parametra Fv/F_0 (isto što i TR_0/DI_0) koja je proporcionalna aktivnosti OEC-kompleksa, odnosno njegovoj funkcionalnoj sposobnosti prijenosa elektrona na donorskoj strani PSII (Kalaji i sur. 2011). Idenični rezultati dobiveni su i na pšenici (Mehta i sur. 2010b).

U uvjetima povišenog stresa (poslijepodnevni sati) vrijednosti parametra TR_0/DI_0 bile su snižene za 17,14% u OS iglicama te za 22,82% u PS iglicama u odnosu na vrijednosti TR_0/DI_0 u istoj kategoriji iglica u jutarnjim satima (slika 27). Također, uočeno je da u uvjetima visokog saliniteta rastu vrijednosti parametara ABS/RC , TR_0/RC i DI_0/RC (Mehta i sur. 2010a,b), što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja (slike 29, 30 i 32). Analizom polifaznog porasta fluorescencije klorofila *a* (O-P normaliziranih OJIP krivulja), pokazalo se da slično kao kod usporedbe OS i PS iglica u jutarnjim satima, postoje razlike u O-J koraku između OS iglica u stresnim i ne-stresnim uvjetima kao i kod PS-iglica kod kojih je porast fluorescencije u J-koraku bio izraženiji (slika 35).

Promjene oblika O-P normaliziranih OJIP krivulja bile su u skladu s povišenim vrijednosti parametra V_J (slika 36) u stresnim uvjetima u odnosu na ne-stresne uvjete i to u obje kategorije iglica.

Također, nije utvrđen porast varijabilne fluorescencije u I-stupnju niti porast vrijednosti parametra V_I . Ovi rezultati upućuju na to da kombinirani stres u poslijepodnevnim satima uključuje inhibiciju elektronskog transporta elektrona dalje od primarnog akceptora uslijed ograničene re-oksidacije Q_A^- te posljedičnu akumulacije reduciranih oblika plastokinona (Q_A^- , $Q_A^-Q_B$ and $Q_A^-Q_B^-$) (Strasser i sur. 2004). Ovaj fenomen snažnije je bio izražen u PS-iglicama u odnosu na OS-iglice, što je vidljivo iz vrijednosti parametra prijenosa elektrona po aktivnom reakcijskom središtu PSII (ET_0/RC) (slika 31), a koji je bio značajno snižen u stresnim uvjetima samo kod PS-iglica, dok kod OS-iglica vrijednosti u prijedpodnevnim i poslijepodnevnim satima nisu bile signifikantno različite. Za razliku od podataka prezentiranih u istraživanjima (Mehta i sur. 2010a,b) gdje su autori pokazali kako povišene vrijednosti specifičnih protoka energije (ABS/RC , TR_0/RC i DI_0/RC) rezultiraju smanjenjem gustoće aktivnih reakcijskih središta PSII (RC/CS_0) u ovom istraživanju to nije bio slučaj (slika 33). Iako postoji signifikantna razlika između OS i PS iglica u vrijednostima parametra RC/CS_0 , nije bilo razlike u vrijednostima ovog parametra između stresnih i ne-stresnih uvjeta za obje kategorije iglica. Ovaj fenomen mogao bi se objasniti različitim intenzitetima stresa u spomenutim istraživanjima. Porast vrijednosti parametara ABS/RC , TR_0/RC i DI_0/RC u istraživanjima (Mehta i sur. 2010 a,b) bio je višestruk u odnosu na kontrolne biljke, dok je u ovom istraživanju razlika u vrijednostima spomenutih parametara bila znatno niža (8-11% za ABS/RC , 4-8% za TR_0/RC , te 32-37% za DI_0/RC), što je nedvojbeno bio značajno manji stres u odnosu na stres induciran u usporednom istraživanju (Mehta i sur. 2010a,b), te kao takav nije bio dostatan za redukciju gustoće aktivnih reakcijskih središta PSII (RC/CS_0) u iglicama alepskog bora.

Sukladno navedenom, može se ustvrditi kako PS iglice u odnosu na OS iglice pokazuju veći stupanj fotoinhibicije u poslijepodnevnim satima, za koje je karakteristična povišena temperatura i povišena razina osvjetljenja. Iako dosadašnja istraživanja fotosintetskih mehanizama u prilagodbi ovakvog tipa okolišnog stresa pokazuju da stariji, potpuno razvijeni listovi značajno bolje podnose opisane stresne uvjete, ovo istraživanje pokazalo je suprotan rezultat. Obzirom da se radi o biljkama alepskog bora koje rastu uz obalu gdje su neprestano izložene solnom stresu, najvjerojatnije objašnjenje jest da se gomilanje natrijevog klorida u PS iglicama (Tablica 3) odrazilo na sniženje njihove sposobnosti učinkovitog prijenosa elektrona u fotosintetskom aparatu u opisanim stresnim uvjetima.

6. ZAKLJUČCI

Provedenim istraživanjem sukladno definiranim ciljevima i hipotezama rada, može se zaključiti da je analiza fotosintetske učinkovitosti, koncentracija fotosintetskih pigmenata (klorofila i karotenoida), te sadržaja kemijskih elemenata u ovosezonskim (OS) i prošlosezonskim (PS) iglicama alepskog bora pokazala značajne razlike u velikom broju istraživanih parametara u ovim razvojnim stadijima:

Vrijednosti koncentracija klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida bile su značajno povišene (skoro dvostruko više) u prošlosezonskim u odnosu na ovosezonske iglice što je u skladu s postavljenim hipotezama i dosadašnjim literaturnim navodima.

- Vrijednosti koncentracija klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida bile su značajno povišene u prošlosezonskim u odnosu na ovosezonske iglice što je u skladu s postavljenim hipotezama i dosadašnjim literaturnim navodima iz čega se može zaključiti da akumulacija fotosintetskih pigmenata tijekom razvoja iglica alepskog bora ima sličan obrazac kao i u ostalim vrstama do sada istraživanih četinjača.
- Omjer vrijednosti koncentracija klorofila *a* i klorofila *b*, kao i ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida bio je otprilike 1:1 u ovosezonskim i u prošlosezonskim iglicama, što navodi na zaključak da je akumulacija fotosintetskih pigmenata u mladim iglicama bila regulirana na način da mlade iglice mogu kompetentno obavljati fotosintetski proces na razini primarne fotokemije. Ovaj zaključak je potkrijepljen vrijednostima maksimalnog prinosa kvanta PSII (Fv/Fm) koje su bile identične (0,86 rel. j.) u ovosezonskim i prošlosezonskim iglicama, a indicirale su potpuno razvijen i funkcionalan fotosustav II (PSII).
- Kvantitativna analiza kemijskih elemenata pokazala je da sadržaj magnezija, kalcija, željeza i mangana bio značajno povišen u prošlosezonskim iglicama u odnosu na ovosezonske iglice, što je u skladu s izmjerenim koncentracijama klorofila i ukupnih karotenoida te fotosintetskom učinkovitošću, budući da su to elementi koji su izrazito značajni za izgradnju i funkcioniranje fotosintetskog aparata.
- Vrijednosti indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) bile su značajno niže u prošlosezonskim nego u ovosezonskim iglicama, što nije u skladu s očekivanjima temeljenim na literaturnim navodima prethodnih istraživanja fotosintetske učinkovitosti iglica. Štoviše, rezultat ovog istraživanja je prvi ovakav nalaz vezan za fotosintetsku učinkovitost četinjača, a upućuje na zaključak da prošlosezonske iglice slabije fotosintetiziraju uslijed mogućeg okolišnog stresa kojem su bile izložene tijekom prve sezone razvoja.

Provedeno istraživanje koncentracije klorofila i karotenoida, sadržaja kemijskih elemenata i fotosintetske učinkovitosti, pokazalo je razlike u mehanizmima regulacije fotosinteze između ovosezonskih i prošlosezonskih iglica alepskog bora izloženih kombiniranom toplinskom, svjetlosnom i solnom stresu.

Kako bi se testirala pretpostavka po kojoj prošlosezonske iglice usprkos funkcionalnom fotosustavu II i značajno višem sadržaju klorofila i karotenoida u odnosu na ovosezonske iglice imaju slabiju učinkovitost fotosinteze (PI_{ABS}) od ovosezonskih iglica uslijed okolišnog stresa, provedena je komparativna analiza fotosintetske učinkovitosti u ne-stresnim uvjetima (8-10h), te u uvjetima svjetlosnog i temperaturnog stresa (13-15h). Također, provedena je i kvantitativna analiza sadržaja natrija koja je nedvojbeno pokazala utjecaj solnog stresa na prošlosezonske iglice budući da je akumulacija natrija bila oko 4 puta veća u odnosu na ovosezonske iglice. Rezultati dobiveni metodom indukcije OJIP krivulja i JIP-testom pokazali su značajnu razliku u mehanizmima fotosintetske regulacije između ovosezonskih i prošlosezonskih iglica, te upućuju na slijedeće zaključke koji podupiru definirane hipoteze:

- Iako su vrijednosti maksimalnog prinosa kvanta PSII (F_v/F_m) bile nešto niže u obje kategorije iglica u stresnim uvjetima, još uvijek su bile više od vrijednosti koja se smatra graničnom za funkcionalnost fotosustava II (PSII). Iz ovog se može zaključiti da slabija tolerancija prošlosezonskih iglica na stresne uvjete nije bila uzrokovana oštećenjem procesa primarne fotokemije fotosustava II (PSII).
- Vrijednosti indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) u prošlosezonskim iglicama pokazale su postotno znatno sniženje u stresnim uvjetima u odnosu na ovosezonske iglice. S obzirom da je indeks fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) parametar koji uz procese apsorpcije pobudne svjetlosti i hvatanja ekscitona (primarna fotokemija PSII), uključuje i procese usmjeravanja uhvaćenih ekscitona u lanac transporta elektrona, te rasipanja suviška pobudne svjetlosne energije u obliku topline. Iz ovih rezultata može se zaključiti da je slabija tolerancija prošlosezonskih iglica na opisane stresne uvjete bila regulirana na razini lanca za prijenos elektrona u kloroplastima.
- Komponenta indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI_{ABS}) koja je pokazala najveću razliku u stresnim u odnosu na ne-stresne uvjete bio je prijenos elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A ($ET_0/(TR_0-ET_0)$). Nadalje, vrijednosti parametra prijenosa elektrona po aktivnom reakcijskom središtu PSII (ET_0/RC) koji je bio značajno snižen u stresnim uvjetima samo kod prošlosezonskih iglica, dok kod ovosezonskih iglica vrijednosti u prijedpodnevnim i poslijepodnevnim satima nisu bile značajno različite, potvrđuje tvrdnju iz prethodnog zaključka da je lanac prijenosa elektrona dalje od primarnog akceptora Q_A bio najviše inhibiran u opisanim stresnim uvjetima.
- Analiza oblika O-P normaliziranih OJIP krivulja i izračun varijabilne fluorescencije na J-stupnju (V_J) pokazali su porast varijabilne fluorescencije na J-stupnju u stresnim uvjetima i to u obje kategorije iglica. Ovi podaci upućuju na zaključak da tijekom stresnih uvjeta u poslijepodnevnim satima dolazilo do akumulacije reduciranih oblika plastokinona (Q_A^- , $Q_A^-Q_B$ i $Q_A^-Q_B^-$). Također, porast varijabilne fluorescencije na J-stupnju (V_J) bio je jače izražen kod prošlosezonskih u odnosu na ovosezonske iglice, što upućuje na zaključak da su prošlosezonske iglice znatno osjetljivije na inhibiciju prijenosa stresnih uvjeta tijekom poslijepodnevni sati u odnosu na ovosezonske iglice uslijed ograničene re-oksidacije Q_A^- .

- Analiza oblika O-P normaliziranih OJIP krivulja također je pokazala da nije bilo razlike u obliku OJIP krivulja u J-I i I-P koracima, niti je bilo porasta u vrijednostima parametra V_L . Ovo upućuje na zaključak da izraženije sniženje vrijednosti parametra $(ET_0/(TR_0 - ET_0))$ u prošlosezonskim iglicama nije bilo uzrokovano niti akumulacijom Q_B -ne-reducirajućih aktivnih središta PSII ($Q_A^-Q_{B2}^-$) niti redukcijom prijenosnika elektrona na akceptorskoj strani fotosustava I (PSI).
- Parametri ABS/RC, TR_0/RC i ET_0/RC pokazali su nešto povišene vrijednosti u ovosezonskim iglicama u odnosu na prošlosezonske iglice i u stresnim i u ne-stresnim uvjetima, dok je porast vrijednosti parametra DI_0/RC bio vrlo sličan u stresnim uvjetima u obje kategorije iglica. Ovakav obrazac dinamike specifičnih protoka energije (povišena apsorpcija i hvatanje ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu) u skladu je s opisanim porastom fluorescencije na J-stupnju i vrijednosti parametra V_L , zbog čega dolazi do povišene disipacije suviška apsorbirane pobudne svjetlosti (DI_0/RC). Iz ovog se može zaključiti da je mehanizam nefotokemijskog gašenja fluorescencije klorofila *a* u obje kategorije iglica bio dostatna prilagodba za očuvanje primarne fotokemije PSII, što potvrđuju i vrijednosti parametra gustoće aktivnih reakcijskih središta PSII (RC/CS_0) koji nisu bili sniženi u stresnim uvjetima.

Zaključno, u radu je potvrđena hipoteza (H1) da prošlosezonske iglice usprkos funkcionalnom fotosustavu II (PSII) i značajno višem sadržaju klorofila i karotenoida u odnosu na ovosezonske iglice, imaju slabiju učinkovitost fotosinteze od ovosezonskih iglica u uvjetima opisanog okolišnog stresa. Također dokazano je da je tolerancija iglica različite starosti na stresne uvjete regulirana na razini lanca za prijenos elektrona u kloroplastima dalje od primarnog akceptora Q_A (hipoteza H2).

7. LITERATURA

Allakhverdiev SI, Klimov VV, Nagata T, Nixon P, Shen J-R (ur). 2008. Recent perspectives of photosystem II: structure, function and dynamics. *Photosynth Res* 98(1-3):1-700pp.

Al-Alawi MM, Mandiwana KL. 2007. The use of Aleppo pine needles as a bio-monitor of heavy metals in the atmosphere. *J Hazard Mater* 148:43-46

Amuntus A, Drory O, Nelson N 2008. A glimpse into the atomic structure of plant photosystem I. Photosynthetic protein complexes. Weinheim, Germany. Wiley - Blackwell Verlag GmbH&Co, 15-16pp.

AOAC. 1984. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Inc., USA.

Barber J, Nield J, Morris EP, Zheleva D, Hankamer B. 2006. The structure, function and dynamics of photosystem two. *Physiol Plant* 100:817-827.

Bačić T, Lynch AH, Cutler D. 1999. Reactions to cement factory dust contamination by *Pinus halepensis* needles. *Environ Exp Bot* 41(2):155-166.

Benzarti M, Ben Rejeb K, Debez A, Messedi D, Abdelly C. 2012. Photosynthetic activity and leaf antioxidative responses of *Atriplex portulacoides* subjected to extreme salinity. *Acta Physiol Plant* 34(5):1679-1688.

Bolhar-Nordenkamp HR, Long SP, Baker NR, Oquist G, Schreiber U, Lechner EG. 1989. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Funct Ecol* 3(4):497-514.

Cardona T, Sedoud A, Cox N, Rutherford AW. 2012. Charge separation in photosystem II: a comparative and evolutionary overview. *Biochim Biophys Acta* 1817(1):26-43.

Chen YE, Zhang CM, Su YQ, Ma J, Zhang ZW, Yuan M, Zhang HU, Yuan S. 2017. Responses of photosystem II and antioxidative systems to high light and high temperature co-stress in wheat. *Environ Exp Bot* 135:45-55.

Debez A, Koyro HW, Grignon C, Abdelly C, Huchzermeyer B. 2008. Relationship between the photosynthetic activity and the performance of *Cakile maritima* after long-term salt treatment. *Physiol Plant* 133:373-385.

Demmig B, Winter K, Krüger A, Czygan FC. 1987. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves: a possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. *Plant Physiol* 84(2):218-224.

Droppa M, Horvath G. 1990. The role of copper in photosynthesis. *Crit Rev Plant Sci* 9:2, 111-123.

- Egger B, Hampp R. 1996. Activities of enzymes of starch metabolism in developing Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] needles. *Trees* 11(2):72-75.
- Elvira S, Alonso R, Inclan R, Castillo FJ, Gimeno BS. 1998. On the response of pigments and antioxidants of *Pinus halepensis* seedlings to Mediterranean climatic factors and long-term ozone exposure. *New Phytol* 138(3):419-432.
- Fink S. 1999. Pathological and regenerative plant anatomy. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart.
- Foyer CH, Shigeoka S. 2011. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiol* 155(1):93-100.
- Govindjee 2004. Chlorophyll a fluorescence: A bit of basics and history U: Papageorgiou GC., Govindjee (ur) Chlorophyll a fluorescence: A signature of photosynthesis, vol. 19, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands 1-42.
- Heldt HW. 1997. Plant Biochemistry and Molecular Biology. Oxford University Press, New York.
- Hideg E, Tamás K, Hideg K, Vass I. 2000. Do oxidative stress conditions impairing photosynthesis in the light manifest as photoinhibition? *Philos Trans R Soc London, Ser B Biological Sciences* 355(1402):1511-1516.
- Horak R. 2015. Fiziološke adaptacije bukve (*Fagus sylvatica* L.), smrče (*Picea abies* L.) Karsten i jele (*Abies alba* Mill.) na sezonsko variranje abiotičkih činitelja u četiri zaštićena planinska područja Republike Srbije. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu.
- Jajoo A. 2014. Changes in Photosystem II Heterogeneity in Response to High Salt Stress. U: Contemporary problems of *photosynthesis* u: Allakhverdiev SI, Rubin AB i Shuvalov VA (ur) Institute of Computer Science, Izhevsk–Moscow, 2014, Vol. 2:397-413.
- Jeddi K, Cortina J, Chaieb M. 2009. *Acacia salicina*, *Pinus halepensis* and *Eucalyptus occidentalis* improve soil surface conditions in arid southern Tunisia. *J Arid Environ* 73:1005-1013.
- Jia J, Bai J, Haifeng G, Wen X, Zhang G, Cui B, Liu X. 2016. In situ soil net nitrogen mineralization in coastal salt marshes (*Suaeda salsa*) with different flooding periods in a Chinese estuary. *Ecol Indic* 73:559-565.
- Jiang CD, Gao HY, Zou Q, Jiang GM. 2004. Inhibition of photosynthesis by shift in the balance of excitation energy distribution between photosystems in dithiothreitol treated soybean leaves. *Photosynthetica* 42(3):409-415.

Jiang CD, Jiang GM, Wang X, Li LH, Biswas DK, 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. *Environ Exp Bot* 58(1-3):261-268.

Johnson, MP. 2016. Photosynthesis. *Essays Biochem* 60(3):255-273.

Juranović Cindrić I, Zeiner M, Starčević A, Stinger G. 2018. Metals in pine needles: characterisation of bio-indicators depending on species. *Int J Environ Sci Technol* 6:47:50.

Kachout SS, Mansoura AB, Leclerc JC, Jaffel K, Rejeb MN, Ouerghi Z. 2012. Effects of heavy metals on antioxidant activities of *Atriplex hortensis* and *Atriplex rosea*. *J Appl Bot Food Qual* 83(1):37-43.

Kalaji HM, Govindjee, Bosa K, Kościelniak J, Żuk-Gołaszewska K. 2011. Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO₂ assimilation of two Syrian barley landraces, *Environ Exp Bot* 73:64-72.

Kalaji HM, Jajoo A, Oukarroum A, Brestic M, Zivcak M, Samborska IA, Cetner MD, Łukasik I, Goltsev I, Ladle RJ. 2016. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiol Plant* 38:102.

Kalaji HM, Rastogi A, Živčák M, Brestic M, Daszkowska-Golec A, Sitko K, Alsharafa KY, Lotfi R, Stypinski P, Samborska IA, Cetner MD. 2018. Prompt chlorophyll fluorescence as a tool for crop phenotyping: an example of barley landraces exposed to various abiotic stress factors. *Photosynthetica* 56:953-961.

Kalaji HM, Schansker G, Brestic M, Bussotti F, Calatayud A, Ferroni L, Goltsev V, Guidi L, Jajoo A, Li P, Losciale P, Mishra VK, Misra AN, Nebauer SG, Pancaldi S, Penella C, Pollastrini M, Suresh K, Tambussi S, Yanniccari M, Zivcak M, Cetner MD, Samborska IA, Stirbet A, Olsovska K, Kunderlikova K, Shelonzek H, Rusinowski S, Baba W. 2017. Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynth Res* 132(1):13-66.

Kan X, Ren J, Chen T, Cui M, Li C, Zhou R, Zhang Y, Liu H, Deng D, Yin Z. 2017. Effects of salinity on photosynthesis in maize probed by prompt fluorescence, delayed fluorescence and P700 signals. *Environ Exp Bot* 140:56-64.

Katanić Z, Atić L, Ferhatović DŽ, 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 Biol Hung* 63, 2:218-230.

Keren N, Krieger-Liszkay A. 2011. Photoinhibition: molecular mechanisms and physiological significance. *Physiol Plant* 142(1):1-5.

Kingstone HM, Jassie LB. 1986. Microwave Energy for Acid Decomposition at Elevated Temperatures and Pressures Using Biological and Botanical Samples. *Anal Chem* 58:2534–2541.

Kok B, Forbush B, McGloin M. 1970. Cooperation of charges in photosynthetic oxygen evolution. *Photochem Photobiol* 11:457-475.

Krause GH, Virgo A, Winter K. 1995. High susceptibility to photoinhibition of young leaves of tropical forest trees. *Planta* 197:583-591.

Lazar D. 2006. The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Funct Plant Biol* 33(1):9-30.

Lepeduš H, Cesar V, Ljubešić N, Has-Schon E. 2003. Photosynthetic pigments, chloroplast distribution and fine structure in vegetative buds of two spruce species. *Biologia – Sect Bot* 58(4):867-873.

Lepeduš H, Cesar V. 2004. Biochemical and functional characteristics of the photosynthetic apparatus in vegetative buds and mature needles of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.). *Acta Bot Croat*, 63 (2):93-99.

Lepeduš H, Fulgosi H, Bensić M, Cesar V. 2008. Efficiency of the photosynthetic apparatus in developing needles of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). *Acta Biol Hung* 59(2):217-232.

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 Physiol Biochem* 49:368-376.

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

Long SP, Humphries S, Falkowski PS. 1994. Photoinhibition of Photosynthesis in Nature. *Ann Rev Plant Physiol Mol Biol* 45:633-662.

Lopez FB, Barclay GF. 2017. Plant anatomy and physiology. *Pharmacognosy* 45-60.

Mathis JN, Burkey KO. 1989. Light intensity regulates the accumulation of the major light-harvesting chlorophyll-protein in greening seedlings. *Plant Physiol* 90(2):560-566.

Matusiewicz H, Sturgeon RE, Berman SS. 1989. Trace element analysis of biological material following pressure digestion with nitric acid - Hydrogen peroxide and microwave heating. *J Anal At Spectrom* 4: 323-327.

Maxwell K, Johnson GN. 2000. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *J Exp Bot* 51(345):659-668.

Mbarki S, Sytar O, Cerda A, Zivcak M, Rastogi A, He X, Zoghalmi A, Abdelly C, Brestic M. 2018. Strategies to Mitigate the Salt Stress Effects on Photosynthetic Apparatus and Productivity of Crop Plants. U: Kumar V., Wani S., Suprasanna P., Tran LS. (ur). *Salinity Responses and Tolerance in Plants*, Volume 1:85-136pp.

Mehta P, Jajoo A, Mathur S, Bharti S. 2010. Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on PS II in wheat leaves. *Plant Physiol Biochem* 48:16-20.

Mehta P, Allakhverdiev SI, Jajoo A. 2010. Characterization of photosystem II heterogeneity in response to high salt stress in wheat leaves (*Triticum aestivum*). *Photosynth Res* 105:249-255.

Misra AN, Srivastava A, Strasser RJ. 2001. Utilization of fast chlorophyll a fluorescence technique in assessing the salt/ion sensitivity of mung bean and brassica seedlings. *J Plant Physiol* 158:1173-1181.

Mlinarić S, 2013. Fotosintetska učinkovitost i antioksidativni odgovor mladih i razvijenih listova smokve (*Ficus carica* L.)u uvjetima svjetlosnog stresa. Doktorski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

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. *S Afr J Bot* 103:25-31.

Mlinarić S, Dunić AJ, Babojelić SM, Cesar V, Lepeduš H. 2017. Differential accumulation of photosynthetic proteins regulates diurnal photochemical adjustments of PSII in common fig (*Ficus carica* L.) leaves. *J Plant Physiol* 209:1-10.

Morales F, Abadía A, Abadía J. 2008. Photoinhibition and Photoprotection under Nutrient Deficiencies, Drought and Salinity. U: Demmig-Adams B., Adams W.W., Mattoo A.K. (ur) Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 21. Springer, Dordrecht 65-85pp.

Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y, Allakhverdiev S. 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics* 1767(6):414-421.

Müller P, Li XP, Niyogi KK. 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess lightenergy. *Plant Physiol* 125(4):1558-1566.

Osyczka A, Moser CC, Dutton PL. 2005. Fixing the Q cycle. *Trends Biochem Sci* 30(4):176-182.

Pravilnik o područjima prevenijencija svojti šumskog drveća od gospodarskog značaja. *Narodne novine* br. 107/2008.

Perl-Treves R, Perl A. 2002. Oxidative Stress in Plants, Oxidative Stress: An Introduction. London, *Taylor and Francis group* 1-33pp.

Pevalek-Kozlina B. 2003. Fiziologija bilja. Profil International. Zagreb.

Pompeiano A, Di Patrizio E, Volterrani M, Scartazza A, Guglielminetti L. 2016. Growth responses and physiological traits of seashore paspalum subjected to short-term salinity stress and recovery. *Agric Water Manag* 163:57-65.

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

Prgin D. 2005. Alepski bor (*Pinus halepensis* Mill.) prvorazredna vrsta za podizanje šuma na mediteranskom kršu. *Šumarski list* 1-2:71-80.

Reinbothe C, El Bakkouri M, Buhr F, Muraki N, Nomata J, Kurisu G, Fujita Y, Reinbothe S. 2010. Chlorophyll biosynthesis: spotlight on protochlorophyllide reduction. *Trends Plant Sci* 15(11) :614-624.

Sato R, Ito H, Tanaka A. 2015. Chlorophyll *b* degradation by chlorophyll *b* reductase under high-light conditions. *Photosynth Res* 126(2-3):249-259.

Schreiber U, Berry J.A. 1977. Heat-Induced Changes of Chlorophyll Fluorescence in Intact Leaves Correlated with Damage of the Photosynthetic Apparatus. *Planta* 136:233-238.

Schreiber U, Bilger W, Neubauer C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. *Ecol Stud* 100:49-70.

Senser M, Schötz F, Beck E. 1975. Seasonal changes in structure and function of spruce chloroplasts. *Planta* 126(1):1-10.

Stefanov M, Yotsova E, Rashkov G, Ivanova K, Markovska Y, Apostolova EL. 2016. Effects of salinity on the photosynthetic apparatus of two Paulownia lines. *Plant Physiol Biochem* 101:54-59.

Strasser BJ, Strasser RJ, 1995. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP test. U: Mathis P (ur), *Photosynthesis: from light to biosphere* 5:977-980, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M, 2004. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. U: Papageorgiou GC, Govindjee (ur) Chlorophyll *a* fluorescence: a signature of photosynthesis; advances in photosynthesis and respiration, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 321-362.

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, 443-483.

Sun ZW, Ren LK, Fan JW, Li Q, Wang KJ, Guo MM, Wang L, Li J, Zhang GX, Yang ZY, Chen F, Li XN. 2016. Salt response of photosynthetic electron transport system in wheat cultivars with contrasting tolerance. *Plant Soil Environ* 62:515-521.

Suzuki JY, Bollivar DW, Bauer CE 1997. Genetic analysis of chlorophyll biosynthesis. *Annu Rev Genet* 31:61-89.

Taiz L, Zeiger E. 1998. Plant Physiology. 2nd Edition, Sinauer Associates Publishers, Sunderland, Massachusetts.

Takahashi S, Murata N. 2008. How do environmental stresses accelerate photoinhibition. *Trends Plant Sci* 13(4):178-182.

Tanaka A, Ito H, Tanaka R, Tanaka NK, Yoshida K, Okada K. 1998. Chlorophyll *a* oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll *b* from chlorophyll *a*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:12719-12723.

Tanaka R, Tanaka A. 2000. Chlorophyll *b* is not just an accessory pigment but a regulator of the photosynthetic antenna. *Porphyrins* 9(1):240-245.

Tekić I, Fuerst-Bjeliš B, Durbešić A. 2014. Rasprostranjenost alepskog bora (*Pinus halepensis* Mill.) i njegov utjecaj na vegetaciju i strukturu pejzaža šireg šibenskog područja. *Šumarski list* 138 (11-12):593-600.

Toth SZ. 2006. Analysis and application of the fast Chl *a* fluorescence (OJIP) transient complemented with simultaneous 820 nm transmission measurements. Doctoral Thesis, Université de Genève, Genève.

Trinajstić I. 2011. Fitogeografska raščlanjenost biljnoga pokrova. Šume hrvatskog sredozemlja. *Akademija šumarskih znanosti* 182-192, Zagreb.

- Trstenjak T, Antunović Dunić J, Mlinarić S, Begović L, Škoro M, Cesar V, Lepeduš H. 2020. Anatomy, chlorophyll content and photosynthetic performance in current year and previous-year Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) needles. *Bot Serb* 44(1):61-69.
- Tsimilli-Michael M, Eggenberg P, Biro B, Köves-Pechy K, Vörös I, Strasser RJ. 2000. Synergistic and antagonistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers on the photosynthetic activity of alfalfa, probed by the polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient O-J-I-P. *Appl Soil Ecol* 15(2):169-182.
- Van Heerden PDR, Swanepoel JW, Krüger GHJ. 2007. Modulation of photosynthesis by drought in two desert scrub species exhibiting C3-mode CO₂ assimilation. *Environ Exp Bot* 61(2):124-136.
- Vennetier M, Ripert C, Rathgeber C. 2020. Autecology and growth of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.). *For Ecol Manage* 413:32-47
- Voet D, Voet JG. 2004. Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc., New York, 871-908pp.
- Von Wettstein D, Gough S, Kannangara CG. 1995. Chlorophyll biosynthesis. *Plant Cell* 7:1039-1057.
- Vukadinović V, Lončarić Z. 1998. Ishrana bilja. Poljoprivredni fakultet, Osijek.
- Whitmarsh J. 1998. Electron transport and energy transduction. U: Raghavendra AS (ur) Photosynthesis: A Comprehensive Treatise. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, 87-107pp.
- Yusuf MA, Kumar D, Rajwanshi R, Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Govindjee, Sarin NB. 2010. Overexpression of gamma-tocopherol methyl transferase gene in transgenic Brassica juncea plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll fluorescence measurements. *Biochim Biophys Acta* 1797(8):1428-1438.
- Zabërgja Ferati F, Mihone Kerolli M, Flamur A. 2022. Effects of Metal Toxicity on the Growth and Photosynthetic Pigment Contents of *Salix purpurea* in Mitrovica, Kosovo, *Kem Ind* 71(3-4):123-130.
- Zeiger L, Taiz E. 2002. Plant physiology. 3rd edn. Sinauer Associates 91(6): 750–751pp.
- Zeiner M, Juranović Cindrić I. 2021. Accumulation of Major, Minor and Trace Elements in Pine Needles (*Pinus nigra*) in Vienna (Austria). *Molecules* 26, 3318.

Zeiner M, Kuhar A, Juranović Cindrić I. 2019. Geographic Differences in Element Accumulation in Needles of Aleppo Pines (*Pinus halepensis* Mill.) Grown in Mediterranean Region. *Molecules* 24, 1877.

Mrežni izvori:

https://hr.wikipedia.org/wiki/Alepski_bor#/media/File:Pinus_halepensis_g2.jpg, 15.3.2018.

<https://www.plantea.com.hr/alepski-bor/>, 15.3.2018.

<http://www.plantea.com.hr/alepski-bor/#Staniste>, 15.3.2018.

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=7995029>, 2.3.2016.

http://www.euforgen.org/distribution_maps.html, 7.11.2015.

8. PRILOZI

8.1. Popis kratica

ABA	Apscizinska kiselina
ABS/RC	Apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu
ADP	Adenozindifosfat
ALA	Aminolevulinska kiselina
APX	Askorbat-peroksidaza
ATP	Adenozintrifosfat
Car	Ukupni karotenoidi
Chl <i>a</i>	Klorofila <i>a</i>
Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i>	Omjer koncentracije klorofila <i>a</i> i klorofila <i>b</i> (Chl <i>a</i> / Chl <i>b</i>)
Chl <i>a+b</i>	Koncentracije ukupnih klorofila
Chl <i>a+b</i> /Car	Omjer koncentracije ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida
Chl <i>b</i>	Klorofil <i>b</i>
cyt <i>b₆f</i>	Citokrom <i>b₆f</i>
D1	D1 Protein
DI ₀ /RC	Disipacija pobudne energije po aktivnom reakcijskom središtu PSII (DI ₀ /RC)
ET ₀ /RC	Prijenosa elektrona po aktivnom reakcijskom središtu
ET ₀ /(TR ₀ -ET ₀)	Srednje vrijednosti i standardne devijacije transporta elektrona dalje od primarnog
Fd	Ferodoksin
Fv/Fm	Standardne devijacije maksimalnog prinosa kvanta fotosustava II
LHC II	Kompleks za prikupljanje svjetla fotosustava II (eng. <u>L</u> ight <u>H</u> arvesting <u>C</u> omplex)
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfat
OEC	Kompleks koji karakterizira osidaciju vode (eng. <u>O</u> xygen <u>E</u> volving <u>C</u> omplex)
OJIP	Porast fluorescencije klorofila <i>a</i> od O do P faze
OS	Ovosezonske
P700	Specijalizirana molekula klorofila <i>a</i> s maksimumom apsorpcije na 700 nm
PBG	Porfobilinogen
PC	Plastocijanin
PI _{ABS}	Indeks fotosintetske učinkovitosti
PO	Poslije podne
PQ	Plastokinon
PQ ⁻ pool	Skup molekula plastokinona
PR	Prije podne
PS	Prošlosezonske
PSI	Fotosustav I
PSII	Fotosustav II
Q _A	Plastokinon A
Q _A ⁻	Reducirani oblik plastokinona A
Q _B	Plastokinon B
Q-ciklus	Plastokinonski ciklus
RC	Reakcijsko središte
RC/ABS	Omjer koncentracije klorofila u reakcijskim središtima i antenama fotosustava II
ROS	Reaktivne kisikove jedinice (eng. <u>R</u> eactive <u>O</u> xigen <u>S</u> pecies)
RC/CS ₀	Gustoća aktivnih reakcijskih središta
TR ₀ /DI ₀	Omjer hvatanja ekscitona i disipacije pobudne energije
TR ₀ /RC	Hvatanje ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu
V _I	Varijabilna fluorescencija klorofila <i>a</i> u I-stupnju
V _J	Varijabilna fluorescencija klorofila <i>a</i> u J-stupnju

9. ŽIVOTOPIS

Tomo Trstenjak rođen je 16. rujna 1960. godine u Gornjem Predrijevu, Općina Sopje. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja u Slatini upisao je Prehrambeno – tehnološki fakultet u Osijeku na kojem je diplomirao 1986. godine.

Godinu dana nakon diplomiranja služio je obvezni vojni rok u bivšoj JNA. Od godine 1988. do 1992. radio je u poduzeću Dimnjak d.d. na radnom mjestu voditelja službe za održavanje termoelektričnih postrojenja.

Od 1992. godine zapošljava se u tvornici za preradu voća i povrća “Slavonka” d.o.o. u Slatini, gdje je četiri godine obnašao dužnost direktora tvornice.

U razdoblju od 1996. do 1997. godine radio je na mjestu glavnog tehnologa u “Osječkoj tvornici koža d.d.” u Osijeku.

Sudjelovao u Domovinskom ratu kratko vrijeme.

Krajem 1997. godine prelazi u regionalnu samoupravu Osječko-baranjsku županije gdje radi kao županijski inspektor zaštite okoliša. Nakon reustroja regionalne samouprave automatski prelazi u državnu službu 2001. godine na radno mjesto inspektora zaštite okoliša pri Ministarstvu zaštite okoliša, prostornog uređenja i graditeljstva, Područna jedinica Osijek za Osječko-baranjsku županiju. Istu funkciju obnaša i danas, ali u Državnom inspektoratu Republike Hrvatske, s time što je u međuvremenu postao viši inspektor zaštite okoliša.

Godine 1999. dobio je priznanje pčelarske zadruge “Slavonska pčela” iz Osijeka za aktivnu suradnju.

Godine 2000. stekao je diplomu “Hrvatskog centra za čistiju proizvodnju” nakon završenog tečaja čistije proizvodnje i održivog razvoja na lokalnoj razini u organizaciji Hrvatske gospodarske komore u Osijeku.

Završio je tečaj za internog auditora za ISO 14001 standard 2001. godine i stekao “Certificate of Achievement” tvrtke “Bureau Veritas” iz Londona.

Na Elektrotehničkom fakultetu u Osijeku 2003. godine završio je programsku obuku za održavanje i rukovanje rashladnim i klima uređajima i dobio uvjerenje “Gospodarenje rashladnim sredstvima”.

Pri Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku 2010. godine završio je poslijediplomski sveučilišni interdisciplinarni znanstveni studij „Zaštita prirode i okoliša“ te obranio znanstveni magistarski rad pod naslovom „Ispitivanje općih i visoko specifičnih pokazatelja kvalitete Našičke rijeke“ te stekao akademski stupanj magistra znanosti.

Iste godine potpisao je Ugovor o poslovno tehničkoj suradnji sa ustanovom za obrazovanje odraslih „Zagrebačko učilište“ iz Zagreba gdje je povremeno angažiran kao vanjski predavač, a u istoj je ustanovi 2012. stekao zvanje „Specijalist zaštite okoliša“.

Održao je brojna predavanja iz zaštite okoliša pri „Hrvatskoj gospodarskoj komori“, „Udruženju obrtnika“, „Ministarstvu zaštite okoliša“ te kod brojnih pravnih i fizičkih osoba. Sudjelovao je na raznim konferencijama i sajmovima kao predavač u zaštiti okoliša i prehrambenoj industriji.

Godine 2011. prilikom sudjelovanja na seminaru dobio je uvjerenje „Usavršavanje inspektora zaštite okoliša i predstavnika ključnih dionika u borbi protiv prekršajnih i kaznenih djela protiv okoliša“, a 2013. dobio je certifikat o sudjelovanju na *twinning* projektu „Natura 2009“ pod nazivom „Strengthening the capacities for control of transboundary movement of waste“.

Član je “Udruga za promicanje zaštite ljudi u radnoj i životnoj okolini” iz Osijeka, “Hrvatskog udruženja za zaštitu zraka” iz Zagreba, a jedno vrijeme bio je i predsjednik udruge “Zaštita prirode i okoliša” u Osijeku.

Godine 2016. završio je tečaj engleskog jezika ekvivalentnog stupnja A2.

Od 2012. godine član je komisije Europske unije za zaštitu okoliša i ekspert-predavač u organizaciji TAIEX prilikom pridruživanja članica EU.

Sudjelovao je na 13. Hrvatskom biološkom kongresu međunarodnog karaktera u Poreču u rujnu 2018.

Ukupno ima preko 35 godina radnog staža, od čega 10-tak godina u privredi i preko 25 godina staža kao inspektor zaštite okoliša.

Koautor je znanstvenog rada pod nazivom „Anatomy, chlorophyll content and photosynthetic performance in current year and previous year Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) needles u časopisu *Botanica Serbica* 44 (1): 61-69.

U vrijeme pisanja ovog doktorskog rada Tomo Trstenjak radi u Državnom inspektoratu Republike Hrvatske, Područna jedinica Osijek, kao viši inspektor zaštite okoliša.