

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Darja KERČMAR

**FOTOSINTEZNA BARVILA LISTOV OGNJENEGA
TRNA (*Pyracantha coccinea* Roem.) V HLADNEJŠI
POLOVICI LETA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Darja KERČMAR

**FOTOSINTEZNA BARVILA LISTOV OGNJENEGA TRNA
(*Pyracantha coccinea* Roem.) V HLADNEJŠI POLOVICI LETA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS IN LEAVES OF FIRETHORN
(*Pyracantha coccinea* Roem.) IN COLDER HALF OF THE YEAR**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2014

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija agronomije. Delo je bilo opravljeno na Katedri za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomske naloge imenovala doc. dr. Heleno ŠIRCELJ.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc BATIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: doc. dr. Helena ŠIRCELJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Gregor OSTERC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Darja KERČMAR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 581.1:547.979:581.5 (043.2)
KG fotosintezna barvila/sončno obsevanje/temperatura/stres/obrambni mehanizmi
AV KERČMAR, Darja
SA ŠIRCELJ, Helena (mentor)
KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI 2014
IN FOTOSINTEZNA BARVILA LISTOV OGNJENEGA TRNA (*Pyracantha coccinea* Roem.) V HLADNEJŠI POLOVICI LETA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP VIII, 54 str., 4 pregl., 32 sl., 61 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Vednozelenne rastline so z različnimi mehanizmi prilagojene na preživetje neugodnih razmer v zimskem času. V diplomskem delu smo ugotavljali spremembe v vsebnostih fotosinteznih barvil v listih ognjenega trna (*Pyracantha coccinea* Roem.) v izven vegetacijskem času. Vzorčili smo v rednih časovnih intervalih na 14 dni od oktobra 2010 do marca 2011. Vsebnosti violaksantina, anteraksantina, zeaksantina, neoksantina, luteina, klorofila a in b in α - in β -karotena smo določili po HPLC gradientni metodi, ki jo je opisal Pfeifhofer (1989). Ugotovili smo, da se vsebnosti fotosinteznih pigmentov v hladnejši polovici leta spreminjajo glede na trajanje in jakost sončnega sevanja in spremembe v temperaturi. Na spremembe v temperaturi se najbolj odzivata violaksantin in lutein, na spremembe sončnega obsevanja pa anteraksantin in zeaksantin.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 581.1:547.979:581.5 (043.2)
CX photosynthetic pigments/solar radiation/temperature/stress/defense mechanisms
AU KERČMAR, Darja
AA ŠIRCELJ, Helena (supervisor)
PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY 2014
TI PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS IN LEAVES OF FIRETHORN (*Pyracantha coccinea* Roem.) IN COLDER HALF OF THE YEAR
DT Graduation Thesis (University Studies)
NO VIII, 54 p., 4 tab., 32 fig., 61 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Evergreen plants are adapted to survive unfavourable conditions in wintertime with different mechanisms. The aim of this study was to observe the changes of photosynthetic pigments in leaves of firethorn (*Pyracantha coccinea* Roem.) outside the vegetation period. Leaves were sampled at regular intervals of 14 days from October to March. Content of violaxanthin, anteraxanthin, zeaxanthin, neoxanthin, lutein, chlorophyll a and b and α - and β -carotene were determined by HPLC gradient method described by Pfeifhofer (1989). Our study showed that the content of photosynthetic pigments in the colder half of the year varies depending on the duration and intensity of solar radiation and changes in temperature. The most responsive to changes in temperature are violaxanthin and lutein; anteraxanthin and zeaxanthin are the most responsive to changes in solar radiance.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 FOTOSINTEZNA BARVILA	3
2.2 RASTLINE IN STRES	4
2.3 PREZIMITVENI STRES	5
2.3.1 Nizke temperature in zmrzal	5
2.3.2 Fiziološka suša	7
2.3.3 Fotoinhibicija in fotooksidativni stres	7
2.4 ODVAJANJE PRESEŽNE ENERGIJE IZ FOTOSINTEZNEGA APARATA	10
2.5 ODSTRANJEVANJE ŠKODLJIVIH RADIKALOV	12
3 MATERIAL IN METODE	13
3.1 OPIS VRSTE	13
3.2 OPIS VZORČENJA IN ANALIZ	13
3.2.1 Vzorčenje in priprava vzorcev za kemijsko analizo	13
3.2.2 Kemijska analiza	14
3.3 METEOROLOŠKE MERITVE V ČASU TRAJANJA VZORČENJA	16
3.4 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	16
4 REZULTATI	17
4.1 KAROTENOIDI	19
4.1.1 Ksantofili	20
4.1.2 Karoteni	28
4.2 KLOROFIL	31
4.3 RAZMERJA MED PIGMENTI	34
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	46
6 POVZETEK	50
7 VIRI	51
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Vremenski podatki v času vzorčenja	16
Preglednica 2: Vrednosti Pearsonovega koeficienta korelacije (r)	17
Preglednica 3: Vsebnost pigmentov $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ SM na dan 25.5.2011	18
Preglednica 4: Izbrana razmerja pigmentov na dan 25.5.2011	18

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Zgradba klorofila (Prirodne boje, 2013)	3
Slika 2: Zgradba β -karotena in ksantofila zeaksantina (Photosynthesis, 2013)	4
Slika 3: Fotoregulacija ksantofilnega cikla (Reddy in Raghavendra, 2006)	11
Slika 4: Ognjeni trn (<i>Pyraecanthia coccinea</i> Roem.), na katerem je bilo izvedeno vzorčenje	13
Slika 5: Kromatogram vzorca	15
Slika 6: Časovni potek vsebnosti skupnih karotenoidov $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase	19
Slika 7: Časovni potek vsebnosti violaksantina $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase	20
Slika 8: Časovni potek vsebnosti anteraksantina $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase	21
Slika 9: Časovni potek vsebnosti zeaksantina $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase	22
Slika 10: Primerjava časovnega poteka vsebnosti violaksantina, anteraksantina in zeaksantina v $\mu\text{g/g}$ suhe mase	23
Slika 11: Časovni potek vsebnosti pigmentov ksantofilnega cikla $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase	24
Slika 12: Časovni potek vsebnosti neoksantina $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase	25
Slika 13: Časovni potek vsebnosti luteina $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase	26
Slika 14: Časovni potek vsebnosti ksantofilov $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase	27
Slika 15: Časovni potek vsebnosti α -karotena $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase	28
Slika 16: Časovni potek vsebnosti β -karotena $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase	29
Slika 17: Časovni potek vsebnosti karotenov $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase	30
Slika 18: Časovni potek vsebnosti klorofila a $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase	31
Slika 19: Časovni potek vsebnosti klorofila b $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase	32
Slika 20: Časovni potek vsebnosti skupnega klorofila $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase	33
Slika 21: Časovni potek razmerja V / VAZ $\pm$ SD	34
Slika 22: Časovni potek razmerja Z / VAZ $\pm$ SD	35
Slika 23: Časovni potek razmerja (A+Z) / VAZ $\pm$ SD	36
Slika 24: Časovni potek razmerja α -karoten / β -karoten $\pm$ SD	37
Slika 25: Časovni potek razmerja karoteni / karotenoidi $\pm$ SD	38
Slika 26: Časovni potek razmerja ksantofili / karotenoidi $\pm$ SD	39
Slika 27: Časovni potek razmerja klorofil a / klorofil b $\pm$ SD	40
Slika 28: Časovni potek razmerja klorofil / VAZ $\pm$ SD	41
Slika 29: Časovni potek razmerja klorofil / (A+Z) $\pm$ SD	42
Slika 30: Časovni potek razmerja klorofil / β -karoten $\pm$ SD	43
Slika 31: Časovni potek razmerja klorofil / karoteni $\pm$ SD	44
Slika 32: Časovni potek razmerja klorofil / ksantofili $\pm$ SD	45

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABA	abscizinska kislina
GSR	globalno sončno obsevanje (Global Solar Radiation)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High Performance Liquid Chromatography)
LoD	meja zaznave (Limit of Detection)
PSI	fotosistem I
PSII	fotosistem II
RC	reakcijski center
ROS	reaktivne kisikove spojine (Reactive oxygen species)
SD	standardna deviacija
SM	suha masa

1 UVOD

Rastline so, kot sesilni organizmi, izpostavljene številnim biotskim in abiotskim dejavnikom, se jim ne morejo izogniti, temveč se morajo z njimi soočiti in se jim ustrezno prilagoditi. Zato se je v rastlinah razvilo veliko kompleksnih in specializiranih sistemov za zaznavanje, prenos in obdelavo signalov iz okolja, zaradi katerih se rastlina lahko odzove in optimalno prilagodi spremenjenim okoljskim razmeram (Madhava Rao, 2006). Pomembni zunanji impulzi, s katerimi se rastlina kot fotosintezni organizem srečuje, so predvsem spremembe v kakovosti in kvantiteti svetlobnega sevanja, temperature, količini vode, mineralnih hranil, težkih kovin in ostalih ksenobiotikov. Ko nihanja okoljskih dejavnikov presežejo določen prag tolerance, se kot odziv na spremembe pojavi stres (Larcher, 1994).

Vednozelene rastline so z različnimi mehanizmi prilagojene na preživetje neugodnih razmer v zimskem času. Glavni omejujoči dejavnik v tem času so nizke temperature v kombinaciji z relativno veliko jakostjo svetlobnega sevanja in fiziološko sušo. Omenjenim dejavnikom se prilagaja tudi fotosintezni aparat, ki ostaja aktiven, če razmere to dovoljujejo. Zaščitni mehanizmi v zelenih tkivih skušajo ohraniti fotosintetski aparat v stanju, v katerem se lahko spomladi čim uspešneje aktivira.

Fotosintezni pigmenti so lahko kazalci stresa v rastlinah in odpornosti rastlin na delovanje stresnih dejavnikov. Karotenoidi so najbolj pomembni za preprečevanje nastajanja in odstranjevanje reaktivnih kisikovih spojin (ROS). Povečanje vsebnosti le-teh je odraz povečanja sinteze in kazalec prilagoditve na stres, zmanjšanje vsebnosti karotenoidov in klorofila pa je posledica oksidativnih poškodb (razgradnje pigmentov) in kazalec močnega stresa (Taiz in Zeiger, 2010; Demmig-Adams in Adams, 1993).

1.1 NAMEN DELA

Namen naloge je v izven vegetacijskem času ovrednotiti spremembe fotosinteznih barvil pri okrasni rastlini ognjenem trnu (*Pyracantha coccinea* Roem.). Z raziskovanjem smo želeli ugotoviti, kako se izbrani parametri v listih ognjenega trna spreminjajo glede na trajanje, jakost sončnega sevanja in temperaturo.

Na podlagi sprememb v vsebnosti in deležih fotosinteznih pigmentov lahko ugotovimo, ali je rastlina v stresu. Namen diplomskega dela je ugotoviti, kateri od pigmentov in katera razmerja med posameznimi pigmenti se najbolj odzivajo na spremembe svetlobe in temperature med prezimitvijo ognjenega trna.

1.2 HIPOTEZE

V diplomskem delu bomo preverili sledeče hipoteze:

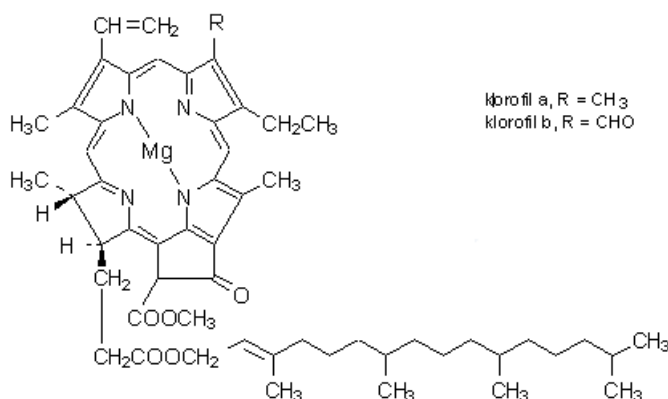
- Vsebnosti pigmentov ksantofilnega cikla se tekom zime spreminjajo v odvisnosti od trajanja in jakosti sončnega sevanja in temperature.
- Vsebnosti ksantofilov se tekom zime spreminjajo v odvisnosti od trajanja in jakosti sončnega sevanja in temperature.
- Vsebnosti karotenov se tekom zime spreminjajo v odvisnosti od trajanja in jakosti sončnega sevanja in temperature.
- Vsebnosti klorofilov se tekom zime spreminjajo v odvisnosti od trajanja in jakosti sončnega sevanja in temperature.
- Razmerja med posameznimi pigmenti se tekom zime spreminjajo v odvisnosti od trajanja in jakosti sončnega sevanja in temperature.

2 PREGLED OBJAV

2.1 FOTOSINTEZNA BARVILA

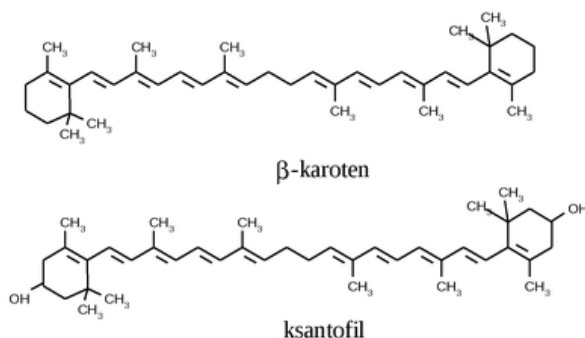
Za absorpcijo svetlobe, ki poganja proces fotosinteze, so odgovorna fotosintezna barvila. Klorofili in karotenoidi se v rastlini nahajajo izključno v tilakoidnih membranah kloroplastov, kjer so vezani v pigment-proteinskih kompleksih fotosistema II (PSII) in fotosistema I (PSI) (v reakcijskih centrih in antenskih (žetvenih) kompleksih). Skupna značilnost vsem fotosinteznim barvilom je prisotnost konjugiranih dvojnih vezi v molekuli (π -orbitale) (Vodnik, 2001).

Klorofili so estri dikarbonske kisline klorofilina in alkohola fitola. Osnovni gradnik so štiri enote pirola, ki so sklenjene v porfirinski obroč, z Mg ionom (Mg^{2+}) v sredini. Na porfirinsko jedro, ki je hidrofilno, je zaestren hidrofobni fitolni rep. Najpomembnejša predstavnika sta klorofil a in klorofil b, poznani pa so še klorofil c, d in e. Med seboj se razlikujeta po radikalu na drugem pirolnem obroču, zaradi česar imata različne lastnosti pri absorpciji svetlobe. Klorofil a ima na drugem pirolnem obroču pripeto metilno skupino ($-CH_3$), klorofil b pa aldehydno skupino ($-CHO$). Klorofili absorbirajo v modrem in rdečem delu vidnega spektra (Vukadinović, 1999; Lisjak in sod., 2009). Modro-zeleni klorofil a ima maksimalno absorpcijo pri 460 in 660 nm, rumeno-zeleni klorofil b pri 460 in 640 nm (Rabinowitch in Govindjee, 1969; Likar in Regvar, 2003).



Slika 1: Zgradba klorofila (Prirodne boje, 2013)

Karotenoidi so derivati izoprena (tetraterpeni – 8 izoprenskih enot). Delimo jih na oranžno-rdeče karotene in rumene ksantofile. Najpogostejša karotena sta β -karoten in α -karoten. Ksantofili so oksidacijski produkti karotenov in vsebujejo kisik v hidroksilnih, keto-, epoksi-, karboksi- in metoksi- skupinah. Najbolj poznani ksantofili so lutein, violaksantin in zaksantin (Vukadinović, 1999; Lisjak in sod., 2009; Vodnik, 2001). Karotenoidi, ki absorbirajo v modrem delu spektra med 400 in 530 nm in tako zapolnijo spekter absorpcijske svetlobe klorofila, prenašajo energijo na klorofil. Zaradi tega delujejo kot pomožna fotosintezna barvila. Njihova druga vloga pa je zaščita fotosinteznega aparata pred fotooksidacijo (Rabinowitch in Govindjee, 1969; Likar in Regvar, 2003; Lisjak in sod., 2009).



Slika 2: Zgradba β -karotena in ksantofila zeaksantina (Photosynthesis, 2013)

2.2 RASTLINE IN STRES

Rastline so v naravnih razmerah večkrat izpostavljene nihanjem okoljskih dejavnikov, ki odločilno vplivajo na njihovo rast in razvoj. Če dejavniki preveč odstopajo od optimalnih razmer in v rastlini sprožijo stresno reakcijo, jih označujemo kot dejavnike stresa ali stresorje. Te delimo na abiotske (svetloba, voda, temperatura, minerali, slanost, pH) in biotske (druge rastlinske vrste, živali, mikroorganizmi). Poleg naravnih dejavnikov tudi človek spreminja okolje z mehanskimi in kemičnimi posegi, ki lahko izzovejo stres (Larcher, 1994). Našteti stresorji skoraj nikoli ne nastopajo posamezno, tako je npr. suša pogosto povezana z visokimi temperaturami. Govorimo o multiplem stresu (Schulze in sod., 2005). V takih primerih rastline pogosto kažejo navzkrižno toleranco (cross-tolerance), ko odpornost na en stresni dejavnik sproži prilagajanje na drugega (Taiz in Zeiger, 2010).

Stres vpliva na celoten organizem, čeprav je prizadet le določen del rastline. Posledice so povezane z morfološkimi, biokemijskimi in fiziološkimi spremembami. Rastline na stres reagirajo z različnimi sistemi aklimatizacije in adaptacije, ki se odražajo na različnih ravneh od gena do celotnega organizma (izražanje genov, sinteza specifičnih molekul kot odgovor na škodo, ki jo povzroča stres, mehanizem odpornosti in tolerance, strukturne spremembe, tvorba zaščitnih spojin, mehanizem popravila in prilagajanja) (Šircelj, 2001; Vukadinović, 1999). Odzivnost organizma na stres je odvisna od genetske zasnove, fenotipskih lastnosti, starosti, sezone in celo dnevne aktivnosti in se med posameznimi osebki lahko precej razlikuje (Larcher, 1994).

Simptomi stresa so lahko specifični ali nespecifični. Specifični simptomi se kažejo kot lokalizirane spremembe glede na stresor in mesto delovanja (poškodbe tilakoidnih membran zaradi velike jakosti svetlobe, poškodba membran in proteinov zaradi toksičnosti težkih kovin), nespecifični simptomi pa so vezani na jakost stresa in so neodvisni od stresorja (sprememba encimske aktivnosti, sinteza in akumulacija antioksidantov, sekundarnih rastlinskih metabolitov, stresnih hormonov, spremenjene lastnosti membran, povečano dihanje, inhibicija fotosinteze, sprememba energetskega stanja, motnje rasti, zmanjšana fertilitet, zgodnja senescenca). Ali je rastlina v določeni situaciji v stresu lahko ugotovimo le, če to stanje rastline primerjamo z običajnim (Larcher, 1994).

Selye (1936), Stocher (1947) in drugi (Larcher, 1994) so opisali fazni model ob pojavu stresa. Pojav določenega stresorja najprej izzove alarmno reakcijo v organizmu. Prvotni destabilizaciji ob enaki intenzivnosti stresorja sledi faza odpornosti (utrditve), v kateri se organizem prilagaja stresorju. Zaradi prilagoditve in povečane odpornosti se stanje stabilizira in normalizira. Če se delovanje stresorja nadaljuje ali se obremenitev poveča, nastopi faza izčrpavanja, kar privede do trajnih poškodb ali celo do odmiranja organov in celotne rastline.

Stres lahko na rastlino vpliva destruktivno, kar privede do nepopravljive škode in propada (distres), njegov vpliv pa je lahko tudi pozitiven (eustres). Kratkotrajna obdobja stresa lahko spodbudijo rastlino k prilagoditvi in večji odpornosti (Larcher, 1994).

2.3 PREZIMITVENI STRES

Preživetje zimskih razmer je kompleksna lastnost, ki se ne nanaša zgolj na sposobnost rastlin, da vzdržijo neposredne učinke nizkih temperatur. Med zimskimi obdobji so rastline poleg nizkih temperatur izpostavljene še drugim dejavnikom, kot so suša, velika jakost svetlobnega sevanja, veter, psihofilni patogeni (Larcher, 1994).

2.3.1 Nizke temperature in zmrzal

Nizke temperature in zmrzal lahko v rastlinah povzročijo stres. Z zniževanjem temperature se upočasni biokemijski procesi in ravnotežne reakcije se premaknejo v smeri sproščanja energije (*Le Chatelierov* princip). Pri nizkih temperaturah metabolizem zagotavlja manj energije, sprejem vode in hranilnih snovi je omejen, zmanjša se biosinteza novih in poveča razgradnja obstoječih proteinov, pojavi se inhibicija fotosinteze, upočasnjeno dihanje in premeščanje ogljikovih hidratov, pojavi se razbarvanje listov in uvelost rastline in rast se ustavi. Negativni učinki na uspevanje rastlin so odvisni od trajanja in pogostosti nizkih temperatur, jakosti ohlavitve, vrste in razvojne faze rastline (Larcher, 1994; Taiz in Zeiger, 2010).

Prvi znaki poškodb zaradi nizkih temperatur so simptomi venenja, ki so rezultat porušenega vodnega režima, pri čemer so sintezni procesi upočasneni, biološke oksidacije pa so povečane zaradi rušenja pigmentno-proteinskih struktur v kloroplastih. Tako nizke pozitivne temperature lahko rezultirajo v odmiranju rastlin zaradi sprememb v metabolizmu (Vukadinović, 1999). Nizke pozitivne temperature lahko povzročijo tudi različne motnje kalitve, razvoja cvetov in plodov ter kakovosti pridelka (Fowler in Limin, 2002).

Poškodbe drugega tipa nastanejo kot posledica zmrzali. Te nastanejo, ko temperatura pade pod ledišče vode. Zamrznejo najprej tisti deli rastline, ki so najbolj izpostavljeni podhladitvi. To so predvsem periferna prevajalna tkiva (Larcher, 1994). Do tvorbe ledu lahko pride znotraj in/ali zunaj celice. Intracelularna tvorba ledenih kristalov nastane zaradi hitrega padca temperature. Ta mehanično poškoduje protoplazemske strukture in lahko povzroči celično smrt. Nekateri polisaharidi in proteini lahko služijo kot nukleacijska jedra za tvorbo ledu. Pri postopnem ohlajanju se ledeni kristali začnejo najprej pojavljati v

medceličnem prostoru. To privede do dehidracije protoplazme, saj se voda iz celice premakne v ekstracelularni prostor (Fowler in Limin, 2002). Voda se giblje k mestu nastajanja ledu zaradi razlike v kemijskih potencialih (led ima manjši kemijski potencial kot voda). Proces teži k vzpostavitvi termodinamskega ravnotežja, zato se pri konstantni temperaturi kristal ledu večja, dokler ni izenačen kemijski potencial ledu in vode (Ille in Sekulić, 2006). Poleg tega se v celici poveča koncentracija topljivih snovi. Velike koncentracije nekaterih anorganskih soli in aminokislin so lahko toksične (Vukadinović, 1999). Številni proteini vplivajo na rast ledenih kristalov. t.i. »antifreeze proteini«, katerih tvorba je sprožena z nizkimi temperaturami, se vežejo na površine ledenih kristalov, da bi preprečili ali upočasnili njihovo nadaljnjo rast (Taiz in Zeiger, 2010).

Inhibicija fotosinteze in dihanja je odraz poškodb kloroplastne in mitohondrijske membrane. Rastlinske membrane so sestavljene iz lipidnega dvosloja in različnih proteinov. Fizikalne lastnosti lipidov vplivajo na aktivnost integralnih membranskih proteinov. Membrane občutljivih rastlin so sestavljene iz večjega deleža nasičenih maščobnih kislin kot membrane rastlin, ki so odporne na nizke temperature, zato se njihova fluidnost zmanjša že pri temperaturah precej nad 0°C. Rezultat je zmanjšana selektivnost pri prepustnosti membrane in izmenjavi snovi, tako znotraj celice, kot tudi med njeno notranjostjo in zunanostjo (Larcher, 1994; Taiz in Zeiger, 2010). Nekateri sladkorji in poliolli stabilizirajo membrane in druge proteine pri nizkih temperaturah in dehidraciji (Taiz in Zeiger, 2010). Funkcionalnost membran pa je zaščitena tudi s t.i. zaščitnimi proteini, ki so 1000-2500 krat učinkovitejši od sladkorjev (Vukadinović, 1999). Raziskave o odpornosti pšenice na nizke temperature so omogočile izoliranje gena *wcor410* (trije homologi: *wcor410*, *wcor410b* in *wcor410c*), ki je odgovoren za sintezo WCOR410 proteina. Ta protein ni transmembranski, ampak se akumulira v njeni bližini in membrano ščiti pred zamrzovanjem in dehidracijo (Danyluk in sod., 1998).

Zakaj pride do poškodb rastlin pri nizkih temperaturah je Levitt (1962) skušal razložiti s sulfhidril-disulfidno hipotezo (mostički –SH-HS- in –S-S-). Vzrok je ireverzibilna denaturacija proteinov zaradi nastanka disulfidnih vezi. Zaradi dehidracije in nizkih temperatur pride do nastanka novih disulfidnih vezi znotraj ene in tudi med sosednjimi molekulami, kar privede do sprememb v proteinski strukturi. Take medproteinske povezave povzročijo inaktivacijo encimov. Najverjetneje pa je formacija disulfidnih vezi posledica (sekundarni efekt) in ne vzrok (primarni efekt) za nastanek poškodb (McKersie in Leshem, 1994).

Posledice manjšega temperaturnega stresa, ki ne vključuje ekstremno nizkih temperatur, so običajno reverzibilne. Rastline se lahko utrdijo, če so predhodno izpostavljene postopno znižanim temperaturam, ki so še nad kritično mejo. To lahko zmanjša ali prepreči škodo, ki bi nastala ob naslednji izpostavljenosti nizkim temperaturam (Fowler in Limin, 2002). Sinteza proteinov, ki je vzpodbujena z nizkimi temperaturami, je ključna za razvoj odpornosti proti nizkim temperaturam. Več različnih proteinov, ki se tvorijo med aklimatizacijo na mraz, so posledica sprememb v izražanju genov. Irving in Lanphear (1967) sta potrdila, da je toleranca na nizke temperature inducirana tudi s krajšanjem dneva. Na večjo odpornost proti zmrzali vpliva tudi ABA (abscizinska kislina). Ob tretiranju z ABA brez predhodne izpostavljenosti mrazu so bili nekateri na novo sintetizirani proteini enaki tistim, ki se sintetizirajo zaradi mraza. Ko rastlini primanjkuje

vode, se poveča sinteza ABA, zato je veliko rastlinskih vrst, ki so tolerantne na pomanjkanje vode in odporne na nizke temperature (Taiz in Zeiger, 2010).

2.3.2 Fiziološka suša

Fiziološka suša je pojav, ko je v zemlji dovolj vode, vendar je ta rastlinam nedostopna. Že pri nižjih temperaturah tal je oteženo sprejemanje vode in hranilnih snovi, ko pa ta zamrznejo, rastlina ni več sposobna pokriti vseh potreb po vodi (Larcher, 1994).

Fiziološka suša se najpogosteje pojavi tam, kjer tla niso pokrita s snegom. Časovno se to stopnjuje proti koncu zime, ko se jakost sončnega sevanja povečuje, kar vodi do povečane transpiracije.

Poznamo dva tipa zimske izsušitve. Akutni padec oskrbe z vodo je običajen pri rastlinah, ki pozimi hitro odprejo listne reže. Tako s stomatalno transpiracijo izgubijo veliko vode, ki je pa zaradi nizkih temperatur in zamrznjenih tal ne morejo nadomestiti. To privede do pretrganja transpiracijskega toka v ksilemu in nastanka kavitacije. Ker te embolije blokirajo prevajanje vode, pride hitro do poškodb listov in vejic. Kronični potek fiziološke suše je značilen za rastline, ki imajo v zimskem času listne reže zaprte ali jih le malo odpirajo. Te transpirirajo skozi kutikulo ali periderm in tako vodo izgubljajo postopno. Najbolj občutljive so tiste rastline, ki imajo veliko transpiracijo in majhne zaloge vode v tkivih.

Učinek fiziološke suše se lahko poveča zaradi vetra, ki izniči zaščitni učinek kutikule in vpliva na spremembo upornosti listnih rež in mejne plasti zraka, in napada parazitov.

Fiziološka suša nastane tudi zaradi prevelikih koncentracij soli v tleh. Voda v takih tleh je osmotsko vezana in rastlinam nedostopna (Larcher, 1994).

2.3.3 Fotoinhibicija in fotooksidativni stres

Čeprav je svetloba nujen pogoj za življenje rastlin, lahko velika jakost svetlobe negativno vpliva na proces fotosinteze. Kadar rastline absorbirajo več sončne energije kot je lahko izkoristijo, presežek fotokemične energije obremeni fotosintezni proces, kar označujemo kot fotoinhibicija. Velika jakost sončnega sevanja v kombinaciji z drugimi okoljskimi dejavniki (mraz, suša, pomanjkanje hranil) lahko poškoduje in uniči fotosintezni aparat (fotodestrukcija) (Larcher, 1994; Xu and Shen, 1999).

Rastline so razvile različne mehanizme, s katerimi se zaščitijo pred močno svetlobo oz. njenim škodljivim učinkom. Fizikalni zaščitni mehanizem vključuje spremembo orientacije listov glede na smer svetlobe, morfološke prilagoditve so sestava kutikule in epikutikularni voski, ki delujejo kot zaščita pred sončnim sevanjem, poraščenost s trihomi, velikost in oblika listov ter kompaktna rast rastline. Pojavljajo se spremembe v legi kloroplastov in njihovem gibanju. Poleg prej omenjenih mehanizmov prihaja tudi do kopičenja različnih spojin za zaščito rastlin pred poškodbami in fotooksidativnim stresom (Taiz in Zeiger, 2010; Larcher, 1994; Glime, 2007).

Glede na količino svetlobe, ki ji je rastlina izpostavljena, in čas okrevanja, ločimo dve vrsti fotoinhibicije: dinamično in kronično. Dinamična fotoinhibicija se pojavi takrat, ko je rastlina izpostavljena zmernim presežkom svetlobe in je odraz zaščitnih mehanizmov. Končna kapaciteta fotosinteze ostaja nespremenjena (saturacijska točka ostaja nespremenjena). Njen pojav je najpogostejše možno opaziti opoldne. Kronična fotoinhibicija je posledica velikih presežkov svetlobne energije in je v veliki meri povezana s poškodbami, ki nastanejo pri tem. Učinkovitost fotosinteznega aparata in asimilacije sta dolgotrajno zmanjšani (Taiz in Zeiger, 2010). Ta se ponavadi pojavi v sušnem obdobju in pozimi (Lacher, 1994).

Rastline, ki so prilagojene na senčna rastišča, že ob kratkotrajni izpostavljenosti direktnemu sončnemu sevanju kažejo znake poškodb (so fotolabilne). To je veliko vodnih rastlin in rastline gozdne podrasti, za katere so že moteč faktor sončni žarki, ki prodirajo skozi krošnje dreves, svetlobni šok pa doživijo, če nenadoma pride do izpostavljenosti (vetrolom, golosek). Praviloma so pigmentni kompleksi takih rastlin učinkovitejši pri lovljenju svetlobe. Rastline, prilagojene na rastišča izpostavljena direktni svetlobi, označujemo kot fotostabilne. Vendar tudi pri teh rastlinah pride do fotoinhibicije in fotodestrukcije, še posebej, če je rastlina predhodno ali dodatno izpostavljena stresu (vročina, mraz, suša, zasoljenost tal, pomanjkanje hranil, patogeni organizmi, škodljivci) (Lacher, 1994).

Posledice fotoinhibicije so zmanjšan kvantni prinos, zmanjšana fotokemijska aktivnost PSII in s tem zmanjšana maksimalna fotosinteza (Xu and Shen, 1999). Fotoinhibicija se ne pojavi kot posledica zmanjšanja vsebnosti fotosinteznih pigmentov, ravno nasprotno, degradacija pigmentov se pojavi, ko je že prišlo do fotoinhibicije (Alves in sod., 2002).

Fotoinhibicija privede do poškodb PSII in PSI, vendar je slednji manj dovzeten. Primarno mesto poškodovanja je protein D1, ki je sestavni del D1/D2 heterodimera v reakcijskem centru PSII (Taiz in Zeiger, 2010). Po fotoinhibiciji, v procesu popravila, poškodovani center PSII prehaja k stroma tilakoidam, kjer se poškodovani protein D1 odstrani in nadomesti z novo sintetizirano kopijo proteina. RC PSII preide nazaj na grana tilakoide, kjer se nadomestijo ostale komponente in se formira funkcionalen PSII. Pri veliki jakosti svetlobe, ko hitro prihaja do poškodb, je potrebna velika hitrost popravilnega procesa, da se aktivnost PSII ohrani na visoki ravni (Long in Humphries, 1994; Goh in sod., 2011).

Čeprav je fotoinhibicija že skoraj sinonim za izgubo proteina D1, je na podlagi študij zdaj jasno, da do inaktivacije in okrevanja PSII pride tudi brez razgradnje in zamenjave D1. Pri rastlinah odpornih na mraz so pri nizkih temperaturah opazili precejšnjo fotoinhibicijo brez zaznane izgube proteina D1. V študijah *in vitro* je bilo ugotovljeno, da fotoinhibicija PSII *in vivo* nastane v dveh korakih:

1. inaktivacija, v kateri protein D1 ostane nespremenjen in je možna hitra reaktivacija brez zamenjave D1;
2. škoda, ki zahteva odstranitev poškodovanega proteina D1 in nadomestitev z novo sintetiziranim (Critchley in sod., 1999; Long in Humphries, 1994).

V naravnih razmerah so poškodbe in/ali uničenje fotosinteznega aparata posledica kombinacije svetlobe in drugih obremenitev okolja, kot so nizke temperature, suša in

pomanjkanje hranil. Nizke temperature, zlasti zmrzal, ne inhibirajo le fotosinteze, kar vodi do presežka svetlobne energije, ampak ovirajo tudi zaščitne in popravljalne mehanizme, ki bi lahko preprečili ali omilili škodo. Nastajanje poškodb zato presega sposobnost popravila (Xu and Shen, 1999).

Fotoinhibicija je lahko tudi posledica oksidativnega stresa, ki je ena najbolj škodljivih posledic okoljskega stresa. Fotooksidativni stres je induciran z absorpcijo presežne eksitacijske energije, ki vodi do preobremenitve elektronske transportne verige in s tem do nastanka reaktivnih kisikovih spojin (ROS), kar privede do fotooksidativnih poškodb fotosinteznega aparata. Pri višjih rastlinah UV svetloba ($\lambda=290-380\text{nm}$) močnejše vpliva na nastanek fotoinhibicije od vidne svetlobe ($\lambda=380-750\text{nm}$) (Reddy in Raghavendra, 2006; Goh in sod., 2011).

Pojem oksidativni stres pomeni neravnovesje med nastajanjem in odstranjevanjem ROS, med katere spadajo singletni kisik ($^1\text{O}_2$), superoksid radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$), vodikov peroksid (H_2O_2) in ostali peroksidi (ROOH) in zelo reaktiven hidroksilni radikal ($\text{OH}^{\bullet}$).

Če v celičnem metabolizmu ni zadostnih koncentracij prejemnikov elektronov, se kisik lahko s prenosom enega elektrona na molekulo O_2 pretvori v superoksid radikal. Pomembno mesto univalentne redukcije kisika predstavlja prenos elektronov od PSI do NADP^+ , kjer imajo velik delež pri nastanku $\text{O}_2^{\bullet-}$ Fe-S proteini X, A in B (Asada, 1994; Alscher in sod., 1997). V zvezi s tem je pomembna Melerjeva reakcija (Mehler, 1951), t.i. pseudociklični transport elektronov. Ob majhnih koncentracijah CO_2 in hkrati veliki jakosti svetlobe je zmanjšana razpoložljivost NADP^+ , zato se elektroni iz reduciranega Ferodoksina (Fd) prenesejo neposredno na kisik.



Nastali superoksidni anion lahko izzove poškodbe, npr. z nastankom lipidnih peroksidov in posledično poškodovanje membran, ali pa se z nadaljnjo redukcijo pretvori v druge, bolj reaktivne predstavnike ROS, kot sta vodikov peroksid in hidroksilni radikal.



H_2O_2 ima relativno dolgo razpolovno dobo in velik oksidacijski potencial, zato je škodljiv predvsem zaradi možne oksidacije tiolnih skupin. $\text{OH}^{\bullet}$ pa je zelo reaktiven in lahko reagira z večino organskih spojin. V celici obstajata dve možnosti za njegov nastanek. Prva je redukcija H_2O_2 ob prisotnosti dvovalentnega kovinskega iona.



Druga možnost pa je t.i. Haber-Weiss reakcija, skupna redoks reakcija H_2O_2 in $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Reddy in Raghavendra, 2006; McKersie in Leshem, 1994).



$^1\text{O}_2$ v kloroplastih nastane v glavnem s prenosom energije iz vzbujenega (tripletnega) stanja klorofila na molekularni kisik ($^3\text{O}_2$). To privede do obrata spina enega od nesparjenih elektronov tako, da imata elektrona antiparalelni spin. $^1\text{O}_2$ ima velik oksidacijski potencial in reagira predvsem z dvojnimi vezmi med ogljikovimi atomi, kar povzroči poškodbe lipidov, aminokislin in pigmentov (Caspi in sod., 2000).



2.4 ODVAJANJE PRESEŽNE ENERGIJE IZ FOTOSINTEZNEGA APARATA

Učinkovita uporaba sončne energije za fotosintezni proces je odvisna predvsem od sposobnosti odvajanja odvečne energije iz fotosinteznega aparata, preprečevanje nastanka ROS in fotoinhibicije. Proces odvajanja presežne eksitacijske energije je povezan s fotozaščitnimi pigmenti (Reddy in Raghavendra, 2006).

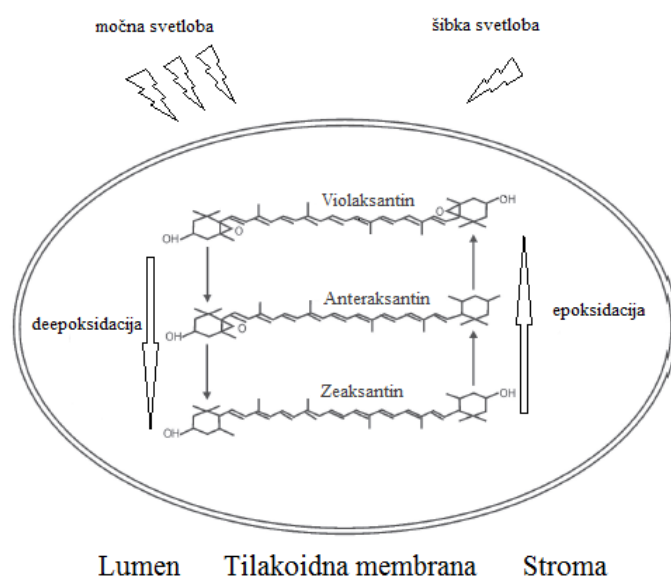
Karotenoidi imajo v rastlini več funkcij. Skupaj z drugimi pigmenti tvorijo širok barvni spekter cvetov, kar privablja opraševalce in raznašalce semen. Pomembno vlogo imajo tudi pri zbiranju svetlobe, zaščiti fotosinteznega aparata in stabilizaciji pigment-proteinskih kompleksov in membran (Šircelj, 2001).

Presežna eksitacijska energija se lahko odvede na dva načina. Vzburjeni klorofil se lahko v osnovno stanje povrne s tem, ko odda energijo v obliki fluorescence (svetloba daljše valovne dolžine kot predhodno absorbirana svetloba) (Vodnik, 2001). Ta proces ni primeren za velike količine presežne energije. V stresnih situacijah je učinkovitejše odvajanje energije v obliki toplote. Ta način označujemo kot nefotokemično dušenje (non-photochemical quenching – NPQ) (Müller in sod., 2001). Vršijo ga karotenoidi z deset ali več konjugiranimi dvojnimi vezmi. Ti so sposobni dušiti tripletno stanje klorofila in s tem preprečiti nastanek $^1\text{O}_2$. Vzburjeni karotenoid nima dovolj energije za nastanek singletnega kisika, zato se pretvori nazaj v nevzbujeno (osnovno) stanje, pri tem pa sprosti svojo energijo v obliki toplote (Demmig-Adams in Adamms, 1996; Taiz in Zeiger, 2010; McKersie in Leshem, 1994).



Pri spremenjenih jakostih svetlobnega sevanja so pogoste hitre spremembe v sestavi karotenoidov v fotosinteznem aparatu (Havaux in Niyogi, 1999). Sapozhnikov in sod. (1957) so prvi poročali o občutnem zmanjšanju vsebnosti violaksantina v različnih listih, ki so bili izpostavljeni močni jakosti svetlobe. Yamamoto in sod. (1962) so pokazali, da se z zmanjšanjem violaksantina povečuje delež tako anteraksantina kot zeaksantina, kasneje (1967) pa so dokazali, da se violaksantin v temi ali slabših svetlobnih razmerah pretvarja iz zeaksantina, kar je potrdilo medsebojno pretvarjanje pigmentov v ciklu imenovanem ksantofilni cikel. Poznanih je šest ksantofilnih ciklov, katerim pripisujejo sposobnost odvajanja presežne energije iz fotosintetskega aparata, vendar je pri višjih rastlinah najbolj razširjen violaksantinski cikel, zato ga v literaturi označujemo kar kot ksantofilni cikel (Šircelj, 2008).

Ksantofilni cikel sestavljajo trije karotenoidi. Pigmenti cikla nastajajo iz β -karotena. V primeru močne osvetlitve se diepoksid violaksantin preko intermediata antraksantina (monoepoksid) petvori v deepoksid zeaksantin (Havaux in Niyogi, 1999) ob pomoči askorbata in NADPH₂ (Larcher, 1994). Obratno reakcijo stimulira šibka svetloba. V reakcije sta vključena dva encima: violaksantin deepoksidaza in zeaksantin epoksidaza. Violaksantin deepoksidaza se pri nevtralnem pH nahaja prosto v lumnu tilakoide. Kadar se zaradi močne svetlobe pH lumna zmanjša, pride do konformacijskih sprememb, ki encimu omogočijo, da se veže na tilakoidno membrano. Optimalni pH za aktivnost encima je okoli 5,2. pH optimum encima zeaksantin epoksidaze je okoli 7,5, za epoksidacijo pa sta potrebna kisik in NADPH (Rmiki in sod., 1998; McKersie in Leshem, 1994). Deepoksidacija poteka zelo hitro (nekaj sekund), epoksidacija pa počasneje (več minut do več ur) (Demmig-Adams in sod., 1999).



Slika 3: Fotoregulacija ksantofilnega cikla (Reddy in Raghavendra, 2006)

Zeaksantin je, kot sestavni del ksantofilnega cikla, ključnega pomena pri odvajanju presežne eksitacijske energije. Razširitev sistema konjugiranih dvojnih vezi iz 9 (violaksantin) na 11 (zeaksantin) zmanjšuje energijo v singletnem stanju zeaksantina pod raven singletnega klorofila, kar omogoča učinkovit prenos energije na zeaksantin preko singlet-singlet procesa energetskega prenosa (Frank in sod., 1994). Odvečno energijo pa lahko odvaja tudi anteraksantin (Demmig-Adams in Adamms, 1996). Predpostavljajo tudi, da je epoksidacija zeaksantina način za odstranjevanje aktivnih kisikovih spojin, ki nastanejo med stresom. Nastali violaksantin se lahko spet deepoksidira. V takšnem primeru je epoksidacija neencimska (Schubert in sod., 1994). Nedavno je bilo dokazano, da se poškodbe membran, ki nastanejo zaradi fotoinduciranega oksidativnega stresa, zelo povečajo, če delovanje ksantofilnega cikla blokiramo z dodatkom DTT (ditiotreitola). S tem je pokazano, da ksantofilni cikel poleg neposredne zaščitne vloge pri odvajanju presežne energije poveča odpornost in stabilizacijo membran proti peroksidaciji (Sarry in sod., 1994).

2.5 ODSTRANJEVANJE ŠKODLJIVIH RADIKALOV

Karotenoidi imajo poleg odvajanja presežne eksitacijske energije iz fotosinteznega aparata pomembno vlogo pri odstranjevanju že nastalih radikalov. Karoteni zaščitijo fotosintetski aparat pred poškodbami tako, da odstranijo $^1\text{O}_2$ in kisikove radikale. β -karoten in drugi karotenoidi lahko reagirajo s peroksil radikali. Pri reakciji β -karotena nastane β -karoten radikal. V prisotnosti kisika pride do avtooksidacije β -karotena, če pa kisik ni prisoten, β -karoten reagira z drugim peroksil radikalom. Rezultat reakcije je neaktiven produkt (Foyer, 1993).

Ko so zaščitni karotenoidni sistemi preobremenjeni, je rezultat oksidativni stres in poškodbe komponent tilakoidne membrane. Dovzetnost pigmentov za oksidativne poškodbe oz. bledenje pigmentov je v določenem zaporedju: β -karoten > neoksantin > violaksantin > lutein > klorofil a > klorofil b (Young in Britton, 1990). Ker karotenoidi predstavljajo prvo obrambno linijo kot dušilci tripletnega stanja klorofila in odstranjevalci singletnega kisika, so v primeru stresa najbolj izpostavljeni.

Povečana sinteza karotenoidov, ki so pomembni za preprečevanje nastajanja in odstranjevanje kisikovih radikalov (β -karoten in pigmenti ksantofilnega cikla), je pokazatelj prilagoditve rastlin na stresne razmere (Demmig-Adams in Adams, 1993).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 OPIS VRSTE

Ognjeni trn (*Pyracantha coccinea* Roem.) je vednozeleni trnat grm. Pri vednozelenih rastlinah ostanejo listi na rastlini vsaj dve vegetacijski obdobji. Spada v družino rožnic (Rosaceae), poddružino Maloideae (pečkatoplodne rožnice) (Martinčič in sod., 2007).

Razširjen je od Italije, preko Balkana do Prednje Azije, udomačen pa je tudi v severni Ameriki (Petauer, 1993). Gostorazraščan grm s trnastimi poganjki zraste lahko do 5 metrov visoko. Premenjalno nameščeni listi so na zgornji strani bleščeči in temno zeleni. Na spodnji strani so svetlejši, mladi pa so dlakavi. Je žužkocvetna rastlina, ki cveti maja in junija. Dvospolni cvetovi so beli in drobni. Njegov zaščitni znak so okroglasti jabolčkasti plodovi, ki so ognjeno rdeče do oranžne barve in dozoriijo septembra in oktobra (Brus, 2008). Plodovi so v zimskem času hrana nekaterim pticam, ljudje pa so jih nekdanj uporabljali za pripravo marmelade, vendar pa so po nekaterih podatkih strupeni zaradi cianogenih glikozidov, ki se nahajajo v koščicah (Petauer, 1993).

Sadimo ga kot dekorativni grm. Dobro prenaša rez, zato ga uporabljamo za žive meje. Ker dobro prenaša tudi sušo, ga sadimo tja, kjer druge vrste zaradi pomanjkanja vode ne preživijo (Brus, 2008).

Ognjeni trn je ena izmed gostiteljskih rastlin hruševega ožiga (*Erwinia amylovora*). Je manj občutljiva gostiteljska rastlina in lahko mnogo let raste naprej, preden opazimo, da je okužena. Okužbo širijo žuželke, ki bakterijo prenašajo na okoliške rastline, še posebej v času opraševanja, zato je priporočljivo rastlino odstraniti iz bližine sadovnjakov (Lešnik in sod., 2008).



Slika 4: Ognjeni trn (*Pyracantha coccinea* Roem.), na katerem je bilo izvedeno vzorčenje

3.2 OPIS VZORČENJA IN ANALIZ

3.2.1 Vzorčenje in priprava vzorcev za kemijsko analizo

Vzorci za diplomsko nalogo smo pobrali na okrasni rastlini ognjnem trnu, ki raste pred stavbo Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete.

Vzorčenje, ki je potekalo v naravnih razmerah, smo izvajali med 6.10.2010 in 23.3.2011. Vzorčili smo v rednih časovnih intervalih na 14 dni, vsakič med 12. in 14. uro (11. in 13. uro po zimskem času). Rastlinski material smo nabrali tudi 25.5.2011, ko je bil grm v vegetacijski fazi cvetenja. Ti podatki služijo kot začetno stanje rastline. Ob vsakem vzorčenju je bilo nabranih 5 vzorcev. V vzorec so bili nabrani listi, ki se nahajajo na tretji četrtini poganjka glede na smer izraščanja. Vzorčenje je bilo opravljeno na različnih delih grma, vedno na prisojni strani.

Listi so bili prehodno spravljani v papirnatih vrečkah v zamrzovalni omari na -20°C . Po liofilizaciji so bili do nadaljnje uporabe shranjeni v zamrzovalni omari na temperaturi -20°C . Za mletje smo uporabili mlinček IKA A10 (IKA-Werke, Staufen, Nemčija). Zmlet rastlinski material smo shranili v prahovke in do nadaljnje uporabe spravili v zamrzovalno omaro na -20°C .

3.2.2 Kemijska analiza

3.2.2.1 Tekočinska kromatografija

Kemijske analize so bile izvedene s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti HPLC (angl. High Performance Liquid Chromatography). Kromatografski proces lahko opredelimo kot separacijsko tehniko, ki temelji na porazdelitvi vzorca med mobilno in stacionarno fazo. Vzorec s pomočjo mobilne faze potuje skozi stacionarno fazo (kromatografsko kolono) pod visokim tlakom v določeni smeri. Vzorec med potovanjem vstopa v interakcije s kolono, selektivno zadrževanje komponent na koloni pa omogoča separacijo vzorca. Snovi, ki jih ločujemo, se različno močno adsorbirajo na stacionarno fazo in nato desorbirajo z mobilno fazo (Kazakevich in McNair, 1996).

Do separacije pride zaradi razlik v porazdelitvenih koeficientih posameznih komponent vzorca, ki so posledica različnih termodinamskih lastnosti. Snovi z enakim porazdelitvenim koeficientom ne moremo ločiti. Velik porazdelitveni koeficient pomeni, da so sile med molekulami komponente in stacionarno fazo velike. Določena komponenta se dlje časa zadrži na koloni, zato se posledično kasneje eluira iz kolone (Abram in sod., 2006).

3.2.2.2 Analiza fotosinteznih barvil

Analize pigmentov so bile opravljene v laboratoriju Katedre za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete, z acetonskimi ekstrakti rastlinskega materiala po HPLC gradientni metodi, ki jo je opisal Pfeifhofer (1989).

V centrifugirne epruvete smo zatehtali od 150 mg in 200 mg zmletega liofiliziranega rastlinskega materiala. Sledila je ekstrakcija, ki smo jo izvedli v zatemnjenem prostoru. Zatehtanemu vzorcu smo dodali 5 ml hladnega acetona in nato 20 sekund homogenizirali na ledu s homogenizatorjem T25 digital ULTRA TURRAX (IKA-Werke, Staufen, Nemčija). Supernatant smo filtrirali skozi $0,20\ \mu\text{m}$ injekcijski filter Minisart SRP 15 (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Nemčija) v vialo.

Kromatografske razmere:

- HPLC sistem Surveyor, Thermo Finnigan (San Jose, USA)
- Predkolona Spherisorb ODS2 5U 5 μ m, 7,5 x 4,6 mm (Alltech Associates, Inc., Deerfield, ZDA)
- Kromatografska kolona Spherisorb ODS2 5U 5 μ m, 250 x 4,6 mm (Alltech Associates, Inc., Deerfield, ZDA)
- DA (diode array) detektor
- Računalnik s programsko opremo za zapis signala

Volumen injiciranja: 20 μ l

Mobilna faza A: acetonitril : metanol : voda = 100 / 10 / 5 (v/v/v)

Mobilna faza B: aceton : etilacetat = 2 / 1 (v/v)

Gradient: linearni gradient od 10 % B do 75 % B v osemnajstih minutah, sledi od 75 % do 70 % v sedmih minutah in od 70 % do 100 % v petih minutah

Pretok mobilne faze: 1 ml/min

Temperatura avtomatskega podajalnika vzorcev: 4 °C

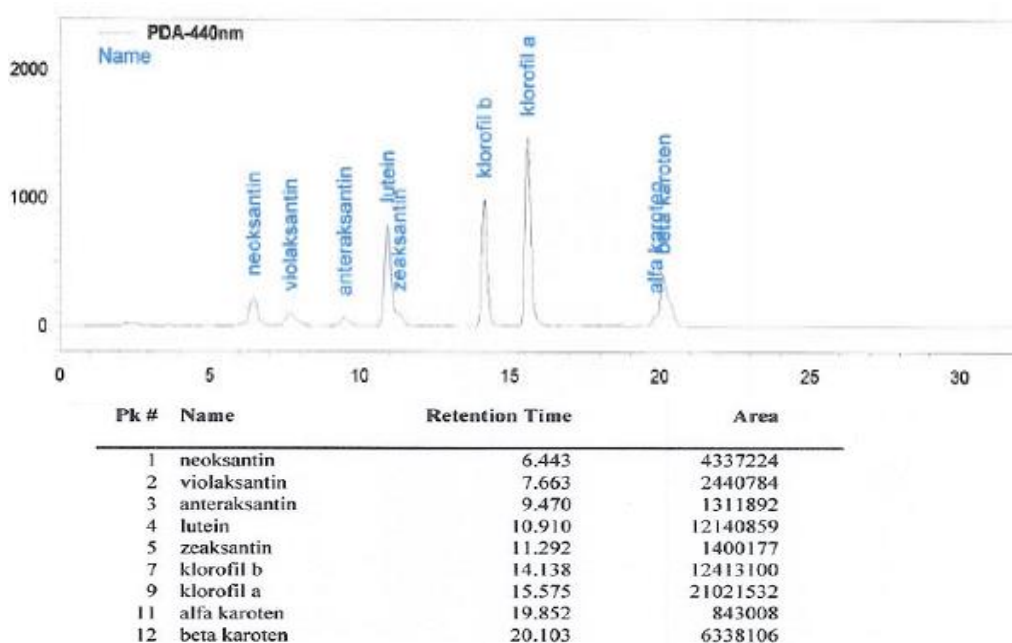
Temperatura kolone: 5 °C

Detekcija: 440 nm

Trajanje metode za analizo: 30 min

Topila, ki smo jih uporabili pri analizi, so bila visoke stopnje čistosti, primerna za HPLC analizo (Merck, Nemčija). Voda je bila bidestilirana in prečiščena s sistemom Milli-Q (Millipore, Bedford, ZDA).

Prisotnost in koncentracija barvil v vzorcih je bila določena s primerjavo retenzijskih časov v vzorcih in izračunana po metodi zunanjega standarda. Uporabili smo naslednje standarde: klorofil a, klorofil b, violaksantin, zeaksantin, anteraksantin, lutein, neoksantin, α -karoten in β -karoten (DHI LAB Products, Hørsholm, Danska). Standardi so bili dobro prečiščeni (s čistoto najmanj 95 % na snov kot je).



Slika 5: Kromatogram vzorca

3.3 METEOROLOŠKE MERITVE V ČASU TRAJANJA VZORČENJA

Vremenske podatke, ki vplivajo na preučevane parametre, smo zbrali iz različnih virov. Podatka o povprečni dnevni temperaturi in globalnem sončnem obsevanju (GSR) sta bila pridobljena iz meritev na avtomatski meteorološki postaji LI-COR na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete Oddelka za agronomijo. Podatke o temperaturi ob 12. uri, trajanju direktnega sončnega obsevanja in o povprečni oblačnosti smo zbrali na spletni strani Agencije Republike Slovenije za okolje (Meteo.si, 2013) in so bili izmerjeni na glavni meteorološki postaji Ljubljana – Bežigrad.

Preglednica 1: Vremenski podatki v času vzorčenja

Datum	T (°C) - ob 12.uri	T (°C) - povprečna dnevna	Trajanje direktnega sončnega obsevanja (ur/dan)	Povprečna oblačnost (pokritost neba v %)	GSR (MJ/m ² /dan)
6.10.2010	13,7	13,2	0	100	1,71
20.10.2010	9,1	6,9	2,7	73	5,14
3.11.2010	11,6	10,6	0	90	1,46
17.11.2010	11,1	10,4	0	100	1,16
1.12.2010	-1,0	-0,8	0	100	0,01
15.12.2010	-3,1	-4,9	2,5	77	4,26
29.12.2010	-2,8	-4,8	6,5	30	4,54
12.1.2011 *	5,0	4,7	0	87	1,95
26.1.2011	0,0	-0,5	0,6	77	3,11
9.2.2011	5,9	1,6	8,4	0	9,64
23.2.2011	-0,7	-2,3	8,4	37	9,86
9.3.2011	3,5	0,8	9,9	10	14,31
23.3.2011 **	11,0	7,0	11,0	10	17,41
25.5.2011 ***	26,9	20,2	11,3	63	23,86

* – grm je bil prekrit s snegom ** – pred vzorčenjem je grm bil obrezan *** – grm je bil v fazi cvetenja

3.4 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Za statistično obdelavo podatkov in grafične prikaze smo uporabili program Microsoft Excel 2010. Za vsak datum vzorčenja smo iz petih podatkov izračunali povprečno vrednost in standardno deviacijo za posamezne pigmente. Kot mero za povezanost okoljske spremenljivke z vsebnostjo pigmentov smo uporabili Pearsonov koeficient korelacije.

4 REZULTATI

V sklopu diplomske naloge smo s HPLC analizo določili vsebnost fotosinteznih pigmentov v listih ognjenega trna.

V preglednici 2 so podane vrednosti Pearsonovega koeficienta korelacije (r) med okoljsko spremenljivko in vsebnostjo pigmentov oz. razmerjem za podatke dobljene z vzorčenjem med 6.10.2010 in 23.3.2011 (n=65).

Preglednica 2: Vrednosti Pearsonovega koeficienta korelacije (r)

Pigmenti oz. razmerje	Trajanje direktnega sončnega obsevanja (ur/dan)	GSR (MJ/m ² /dan)	T (°C) - ob 12.uri	T (°C) - povprečna dnevna
Karotenoidi	0,3308 ***	0,2174	-0,2291	-0,2910 *
Violaksantin	-0,3269 ***	-0,2939 *	0,6110 ***	0,6474 ***
Anteraksantin	0,8376 ***	0,8268 ***	-0,2848 *	-0,4288 ***
Zeaksantin	0,7186 ***	0,7031 ***	-0,3226 ***	-0,4424 ***
VAZ	0,6489 ***	0,6505 ***	-0,0167	-0,1356
Neoksantin	-0,1231	-0,2390	-0,1582	-0,1411
Lutein	0,1437	-0,0363	-0,5058 ***	-0,5236 ***
Ksantofili	0,5686 ***	0,4736 ***	-0,2589 *	-0,3603 ***
α-karoten	-0,4716 ***	-0,4200 ***	0,3753 ***	0,4322 ***
β-karoten	-0,5674 ***	-0,6750 ***	-0,0991	0,0028
Karoteni	-0,6553 ***	-0,7283 ***	0,0518	0,1593
Klorofil a	0,0581	-0,0572	-0,1293	-0,1493
Klorofil b	-0,4522 ***	-0,5716 ***	-0,1067	-0,0386
Klorofil (a+b)	-0,0841	-0,2126	-0,1362	-0,1327
V/VAZ	-0,6864 ***	-0,6553 ***	0,5533 ***	0,6621 ***
Z/VAZ	0,6342 ***	0,6176 ***	-0,4195 ***	-0,5261 ***
(A+Z)/VAZ	0,6864 ***	0,6553 ***	-0,5533 ***	-0,6621 ***
α-karoten/β-karoten	-0,4662 ***	-0,4108 ***	0,3707	0,4267 ***
Karoteni/Karotenoidi	-0,8633 ***	-0,8391 ***	0,2267	0,3765 ***
Ksantofili/Karotenoidi	0,8633 ***	0,8391 ***	-0,2267	-0,3765 ***
Klorofil a/Klorofil b	0,5460 ***	0,5460 ***	-0,0130	-0,1071
Klorofil/VAZ	-0,5233 ***	-0,5479 ***	-0,0941	0,0052
Klorofil/(A+Z)	-0,6031 ***	-0,5368 ***	0,6018 ***	0,6841 ***
Klorofil/β-karoten	0,6642 ***	0,6376 ***	-0,0192	-0,1587
Klorofil/Karoteni	0,7496 ***	0,7081 ***	-0,1555	-0,2965 *
Klorofil/Ksantofili	-0,7136 ***	-0,7220 ***	0,1903	0,3070 *

* – Pri stopnji značilnosti 0,05 ($r \geq 0,2441$) obstaja linearna povezava med okoljsko spremenljivko in vsebnostjo pigmentov oz. razmerjem

** – Pri stopnji značilnosti 0,01 ($r \geq 0,3173$) obstaja linearna povezava med okoljsko spremenljivko in vsebnostjo pigmentov oz. razmerjem

Preglednica 3: Vsebnost pigmentov $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ SM na dan 25.5.2011

Pigmenti	Vsebnost $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase
Karotenoidi	720,41 $\pm$ 108,76
Violaksantin	69,31 $\pm$ 48,47
Anteraksantin	27,66 $\pm$ 6,57
Zeaksantin	27,87 $\pm$ 38,83
VAZ	124,84 $\pm$ 84,76
Neoksantin	82,23 $\pm$ 13,27
Lutein	298,59 $\pm$ 37,52
Ksantofili	505,66 $\pm$ 88,93
α -karoten	38,33 $\pm$ 12,99
β -karoten	176,42 $\pm$ 25,62
Karoteni	214,75 $\pm$ 37,39
Klorofil a	2091,11 $\pm$ 144,58
Klorofil b	986,49 $\pm$ 150,99
Klorofil (a+b)	3077,59 $\pm$ 291,52

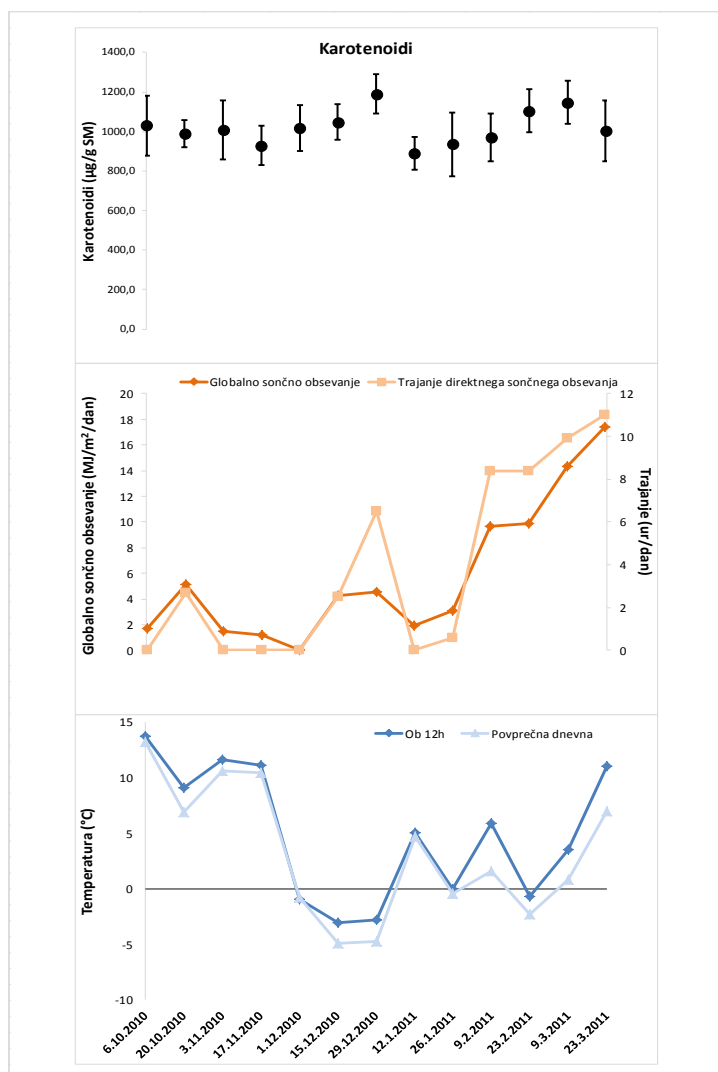
Preglednica 4: Izbrana razmerja pigmentov na dan 25.5.2011

Razmerje	Razmerja pigmentov
V/VAZ	0,57 $\pm$ 0,09
Z/VAZ	0,14 $\pm$ 0,20
(A+Z)/VAZ	0,43 $\pm$ 0,09
α -karoten/ β -karoten	0,21 $\pm$ 0,05
Karoteni/Karotenoidi	0,30 $\pm$ 0,04
Ksantofili/Karotenoidi	0,70 $\pm$ 0,04
Klorofil a/Klorofil b	2,14 $\pm$ 0,17
Klorofil/VAZ	32,13 $\pm$ 14,30
Klorofil/(A+Z)	78,97 $\pm$ 44,42
Klorofil/ β -karoten	17,55 $\pm$ 1,07
Klorofil/Karoteni	14,47 $\pm$ 1,09
Klorofil/Ksantofili	6,19 $\pm$ 0,86

Preglednici 3 in 4 predstavljata vsebnost fotosinteznih pigmentov in izbrana razmerja med njimi za rastlinski material, ki smo ga nabrali 25.5.2011.

Časovni poteki spreminjanja vsebnosti posameznih pigmentov s časovnim potekom meteoroloških meritev so prikazani na slikah 6-20.

4.1 KAROTENOIDI

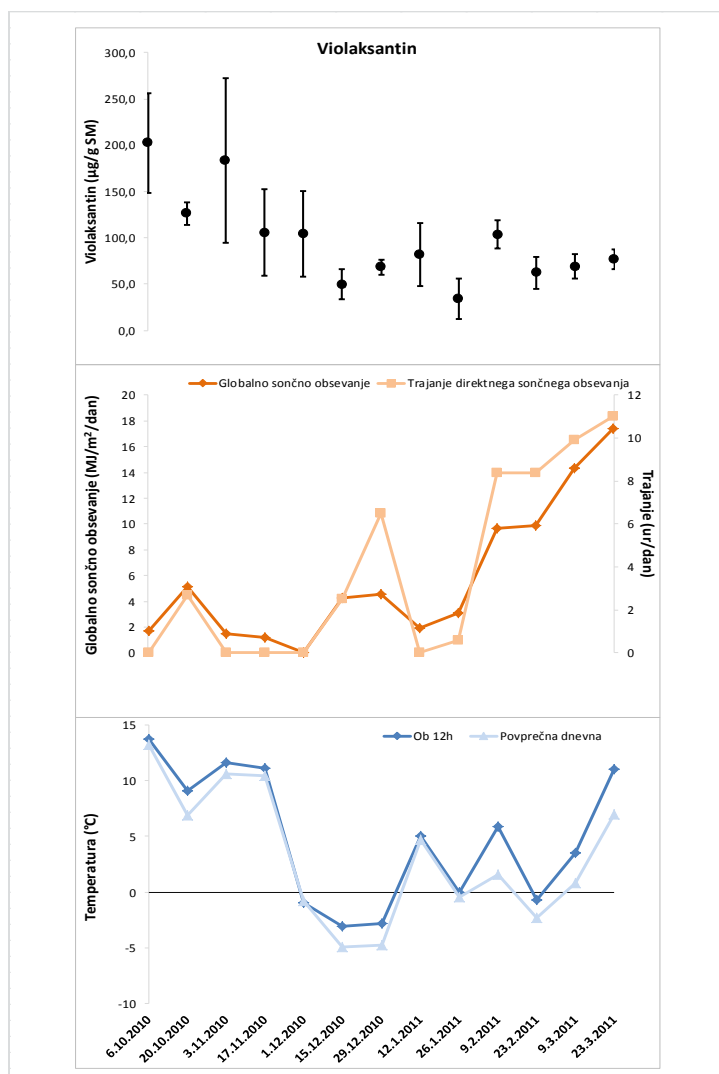


Slika 6: Časovni potek vsebnosti skupnih karotenoidov $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase

Tekom vzorčenja smo največjo vsebnost karotenoidov ($1190,1 \mu\text{g/g SM}$) izmerili 29.12.2010 pri povprečni dnevni temperaturi $-4,8^\circ\text{C}$ in trajanju direktnega sončnega obsevanja 6,5 ur, najmanjšo vsebnost ($889,6 \mu\text{g/g SM}$) pa smo izmerili takoj pri naslednjem vzorčenju 12.1.2011. Povprečna dnevna temperatura 12.1.2011 je bila $4,7^\circ\text{C}$, trajanje direktnega sončnega obsevanja je bilo manj kot 30 minut.

Med časovnim potekom trajanja direktnega sončnega obsevanja in potekom vsebnosti karotenoidov obstaja šibka linearna povezava (pregl. 2), kar pomeni, da se s povečanjem sončnega obsevanja poveča vsebnost karotenoidov. Potek vsebnosti sledi poteku direktnega sončnega obsevanja.

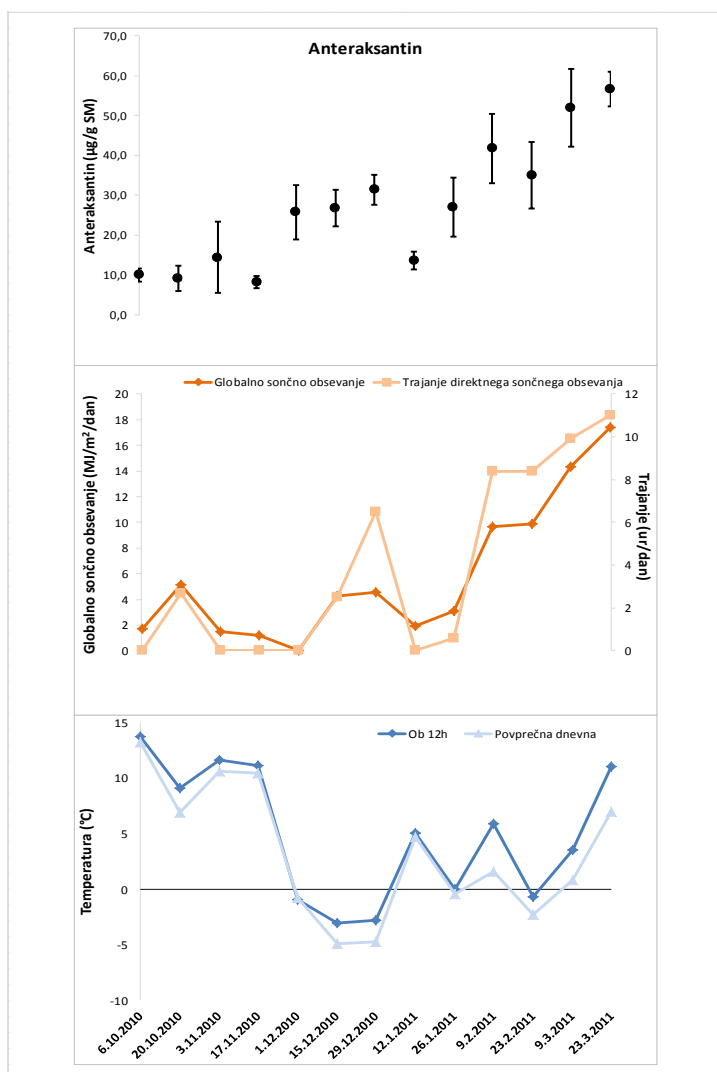
4.1.1 Ksantofili



Slika 7: Časovni potek vsebnosti violaksantina $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase

Vsebnost violaksantina je bila največja 6.10.2010, in sicer 202,5 $\mu\text{g/g SM}$. Takrat je direktno sončno obsevanje trajalo manj kot 30 minut, povprečna dnevna temperatura je bila 13,2 $^{\circ}\text{C}$. Najmanjšo vsebnost smo izmerili 26.1.2011, to je 34,0 $\mu\text{g/g SM}$, trajanje direktnega sončnega obsevanja je bilo 36 minut in povprečna dnevna temperatura je bila $-0,5^{\circ}\text{C}$.

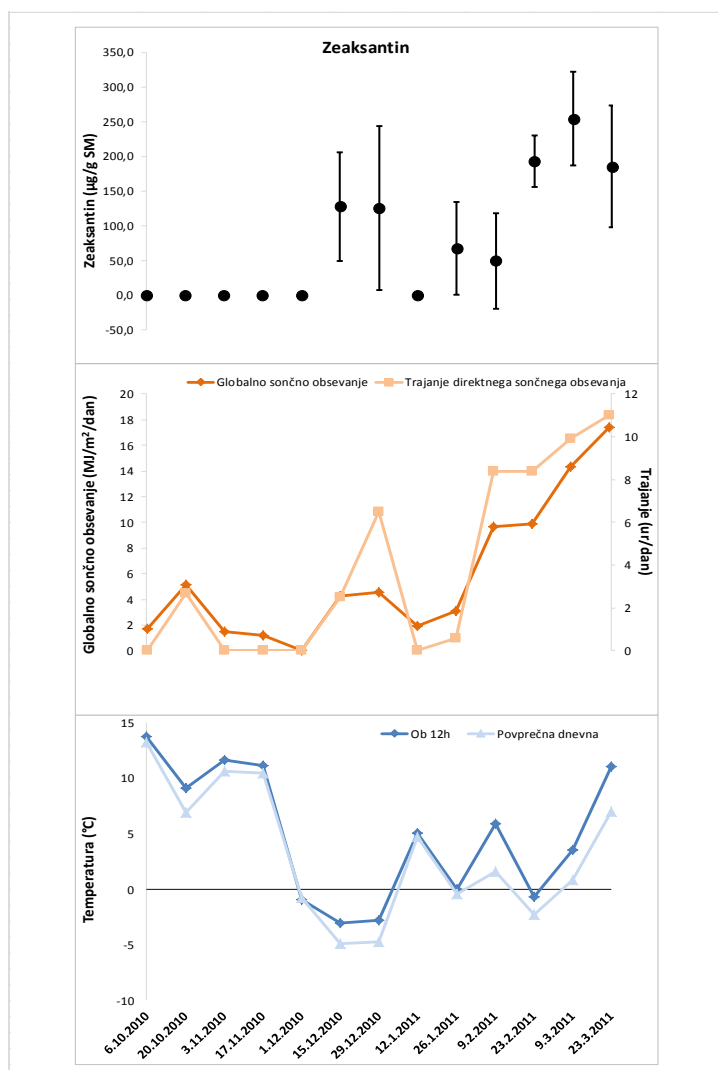
Največje vsebnosti smo izmerili jeseni (oktober, november), najmanjše pa zgodaj pozimi (januar, februar). Pri stopnji značilnosti 0,01 lahko trdimo, da med potekom vsebnosti violaksantina in potekom temperature obstaja linearna korelacija, med trajanjem direktnega sončnega obsevanja in vsebnostjo pa obstaja šibka negativna linearna povezava (pregl. 2). Časovni potek vsebnosti violaksantina sledi poteku temperature.



Slika 8: Časovni potek vsebnosti anteraksantina $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase

Vsebnost anteraksantina je bila največja 23.3.2011 (56,6 $\mu\text{g/g SM}$). Takrat je direktno sončno obsevanje trajalo 11 ur, povprečna dnevna temperatura pa je bila 7,0 $^{\circ}\text{C}$, ob 12.uri je bila temperatura 11,0 $^{\circ}\text{C}$. Najmanjša vsebnost je bila 17.11.2010, in sicer 8,1 $\mu\text{g/g SM}$, ko je direktno sončno obsevanje trajalo manj kot 30 minut, povprečna dnevna temperatura pa je bila 10,4 $^{\circ}\text{C}$.

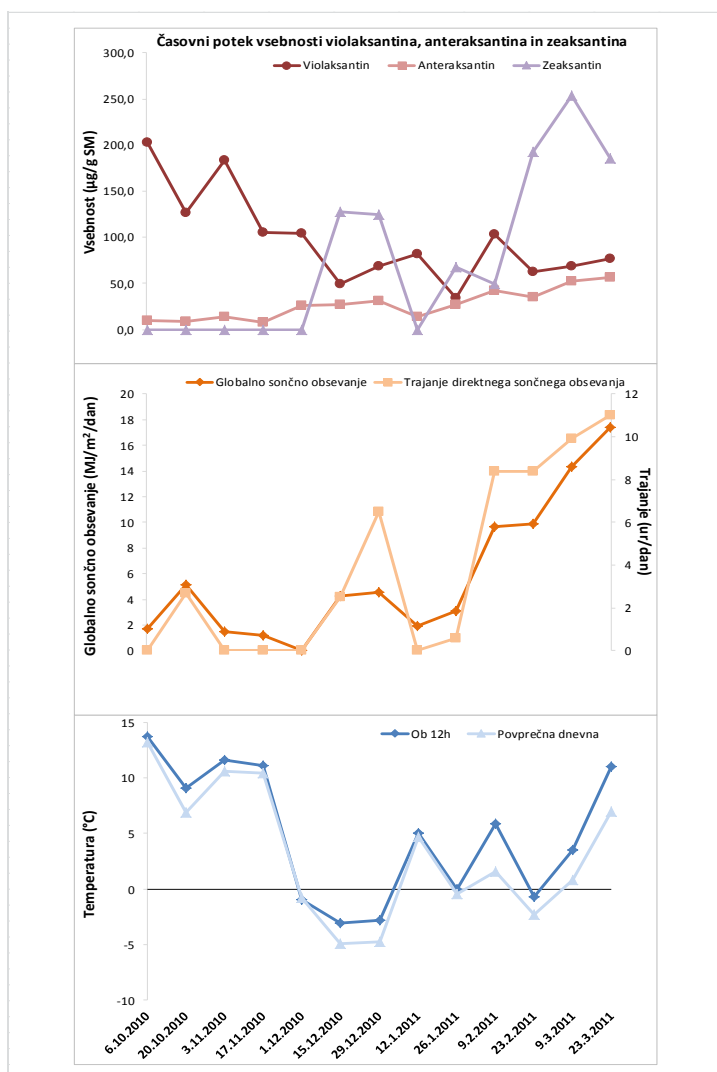
Najmanjše vsebnosti smo izmerili oktobra in novembra, največje pa februarja in marca. Na časovni potek vsebnosti anteraksantina močno vpliva potek sončnega obsevanjanja. Obstaja tudi šibka negativna linearna povezava med potekom temperature in vsebnostjo anteraksantina (pregl. 2).



Slika 9: Časovni potek vsebnosti zeaksantina $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase

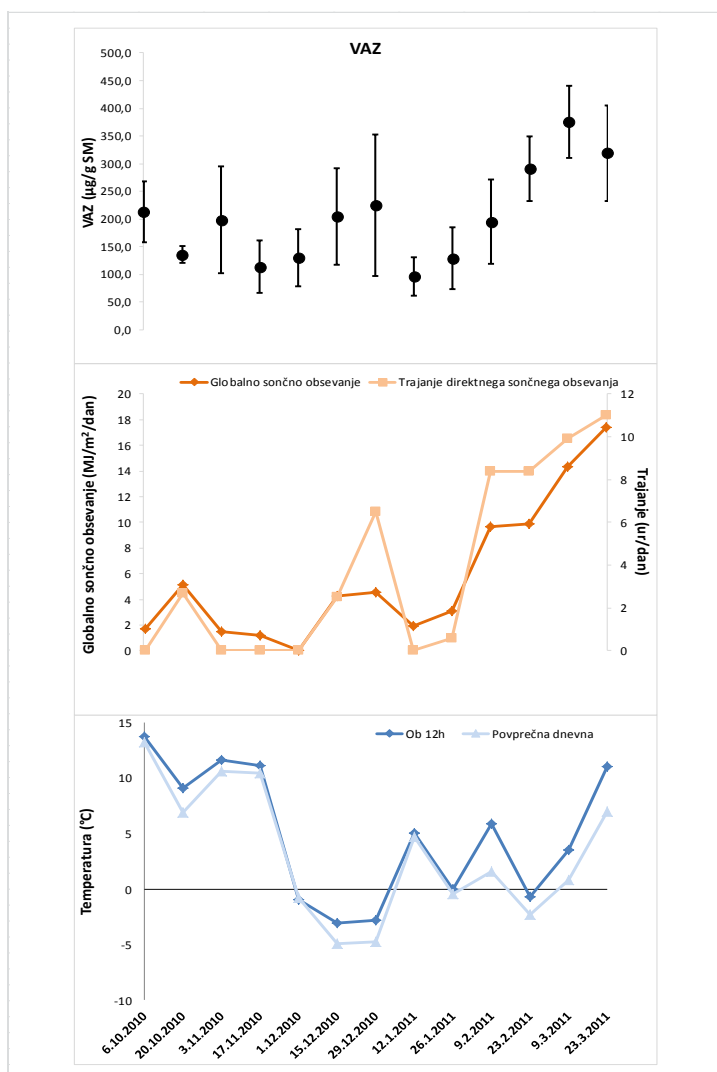
Na sliki 9 je predstavljen časovni potek vsebnosti zeaksantina. Največjo vsebnost smo izmerili 9.3.2011 (254,2 $\mu\text{g/g SM}$), vremenske razmere pa so bile sledeče: trajanje direktnega sončnega obsevanja je bilo 9 ur in 54 minut, povprečna dnevna temperatura je bila 0,8 $^{\circ}\text{C}$. V prvih petih vzorčenjih in še 12.1.2011 je bila vsebnost pod mejo zaznave (Limit of Detection – LoD). Z izjemo 1.12.2010, ko je bila povprečna dnevna temperatura $-0,8^{\circ}\text{C}$, so bile temperature v ostalih dnevih nad lediščem (6.10.2010 – 13,2 $^{\circ}\text{C}$; 20.10.2010 – 6,9 $^{\circ}\text{C}$; 3.11.2010 – 10,6 $^{\circ}\text{C}$; 17.11.2010 – 10,4 $^{\circ}\text{C}$; 12.1.2011 – 4,7 $^{\circ}\text{C}$). V naštetih datumih je bilo trajanje direktnega sončnega obsevanja krajše od 30 minut, le 20.10.2010 je bilo 2 uri in 42 minut.

Časovni potek vsebnosti zeaksantina je močno povezan s potekom sončnega obsevanja, obstaja pa tudi šibka negativna linearna korelacija med potekom temperature in vsebnostjo zeaksantina (pregl. 2). Pri nizki temperaturi in povečani jakosti sončnega sevanja se je vsebnost zeaksantina povečala.



Slika 10: Primerjava časovnega poteka vsebnosti violaksantina, anteraksantina in zeaksantina v µg/g suhe mase

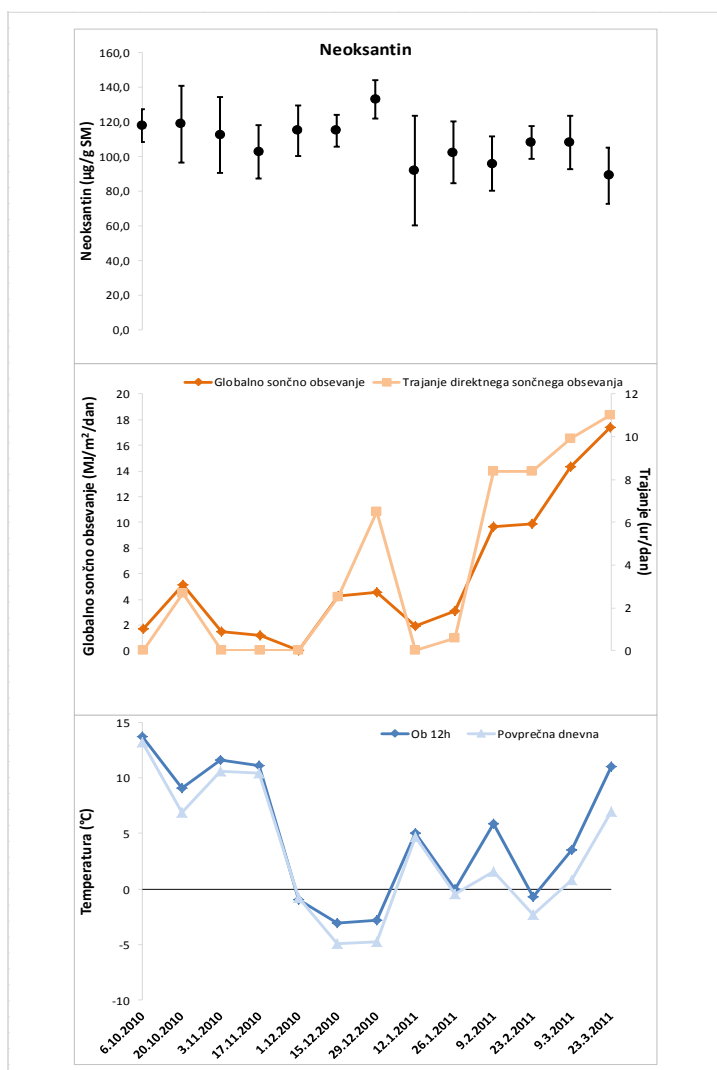
Slika 10 prikazuje primerjavo časovnega poteka povprečne vsebnosti violaksantina, anteraksantina in zeaksantina. Iz slike je razvidno, da se pri nizki temperaturi in povečani jakosti sončnega sevanja zmanjša vsebnost violaksantina in poveča vsebnost anteraksantina in zeaksantina.



Slika 11: Časovni potek vsebnosti pigmentov ksantofilnega cikla $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase (VAZ – violaksantin + anteraksantin + zeaksantin)

Vsebnost pigmentov ksantofilnega cikla je bila najmanjša ($95,5 \mu\text{g/g SM}$) 12.1.2011. Povprečna dnevna temperatura je bila $4,7^\circ\text{C}$, trajanje direktnega sončnega obsevanja pa je bilo krajše od 30 minut. Največjo vsebnost ($375,2 \mu\text{g/g SM}$) smo izmerili 9.3.2011 ob povprečni dnevni temperaturi $0,8^\circ\text{C}$ in trajanju direktnega sončnega obsevanja 9 ur 54 minut.

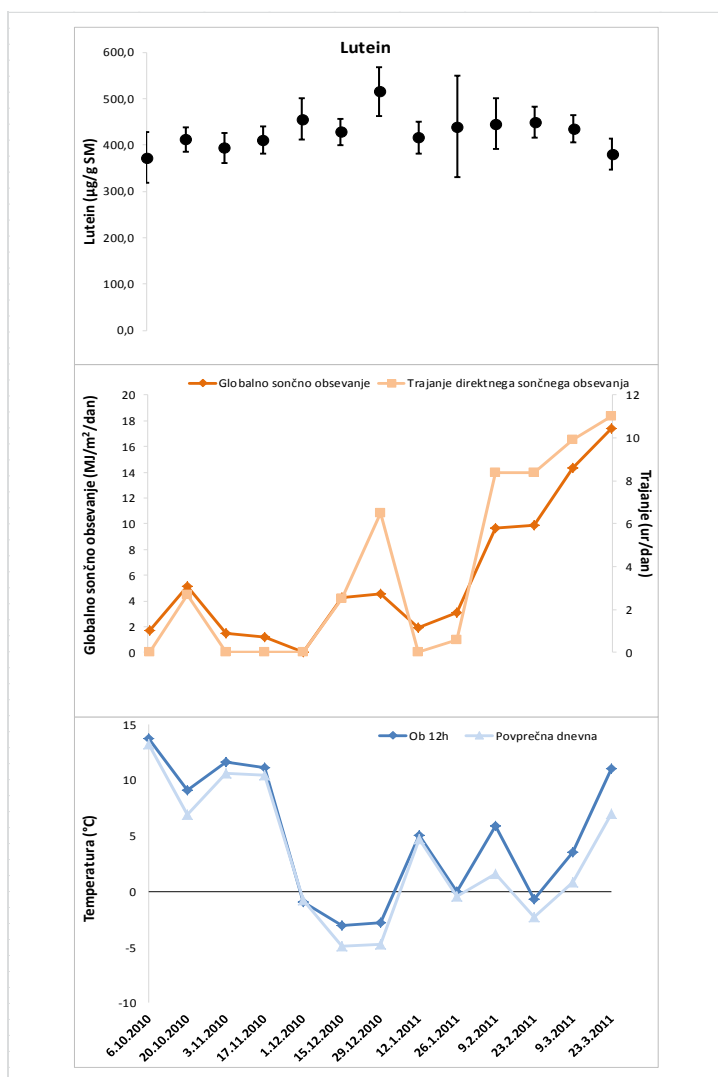
Na časovni potek vsebnosti skupnih pigmentov ksantofilnega cikla izključno vpliva potek sončnega obsevanja (pregl. 2).



Slika 12: Časovni potek vsebnosti neoksantina $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase

Na sliki 12 je prikazan časovni potek neoksantina. Najmanjšo vsebnost ($89,0 \mu\text{g/g SM}$) smo izmerili pri zadnjem vzorčenju (23.3.2011), ko je bila povprečna dnevna temperatura $7,0^\circ\text{C}$, direktno sončno obsevanje pa je trajalo 11 ur. Največja vsebnost ($133,0 \mu\text{g/g SM}$) je bila 29.12.2010 pri povprečni dnevni temperaturi $-4,8^\circ\text{C}$ in trajanju direktnega sončnega obsevanja 6,5 ur.

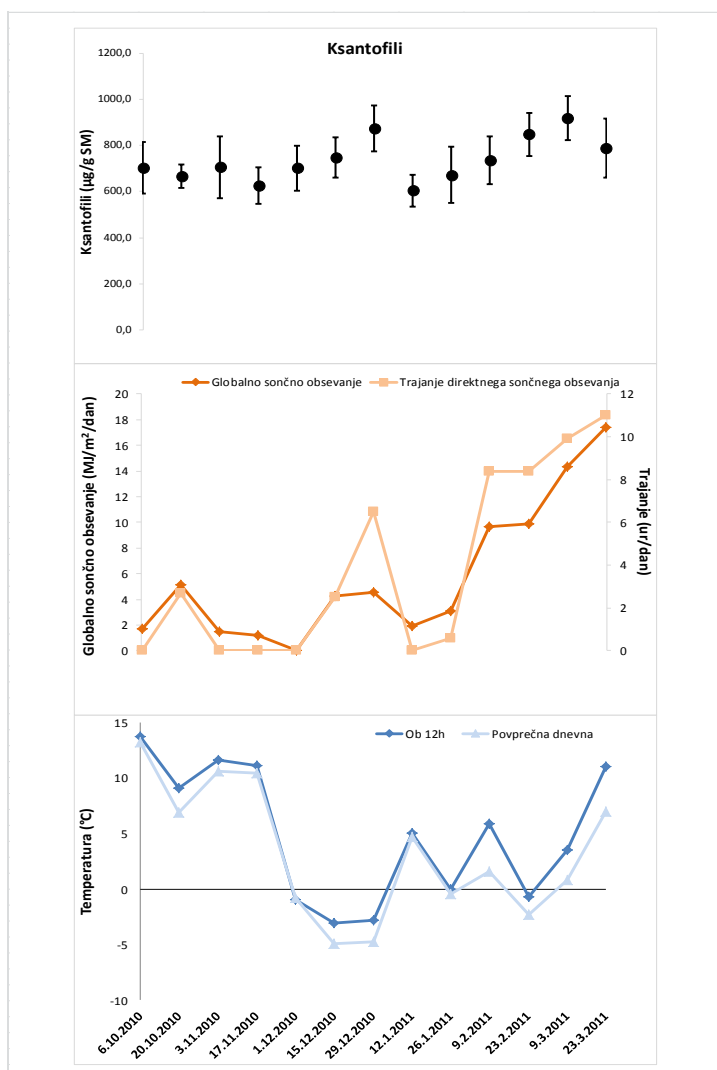
Pearsonov koeficient korelacije je pokazal, da na časovni potek vsebnosti neoksantina ne vpliva nobena obravnavana okoljska spremenljivka (pregl. 2).



Slika 13: Časovni potek vsebnosti luteina $\pm$ SD v µg/g suhe mase

Najmanjša vsebnost luteina (372,5 µg/g SM) je bila 6.10.2010 ob povprečni dnevni temperaturi 13,2 °C in direktnem sončnem obsevanju, ki je bilo krajše od 30 minut. Največja izmerjena vsebnost je bila 515,4 µg/g SM. Izmerili smo jo 29.12.2010, ko je povprečna dnevna temperatura bila -4,8 °C, direktno sončno obsevanje pa je trajalo 6,5 ur.

Pri stopnji značilnosti 0,01 lahko trdimo, da med temperaturo in vsebnostjo luteina obstaja negativna linearna povezava (pregl. 2).

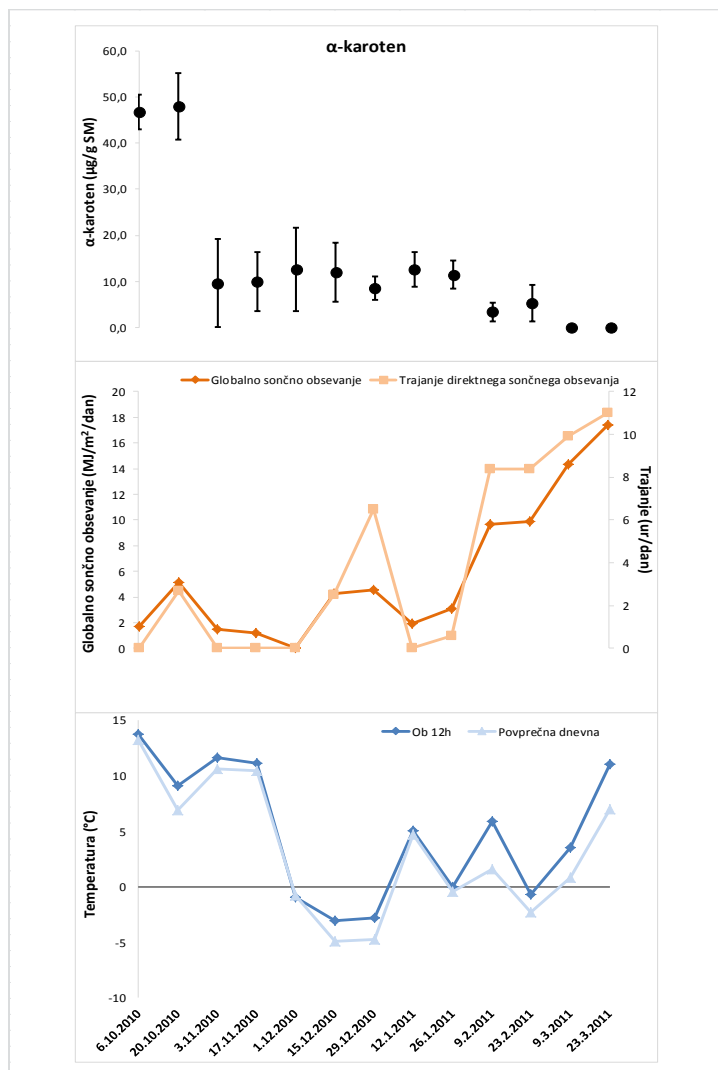


Slika 14: Časovni potek vsebnosti ksantofilov $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase

Vsebnost ksantofilov (VAZ+lutein+neoksantin) je bila enako, kot vsebnost pigmentov ksantofilnega cikla, najmanjša 12.1.2010, in sicer $603,4 \mu\text{g/g SM}$, pri povprečni dnevni temperaturi $4,7^{\circ}\text{C}$ in trajanju direktnega sončnega obsevanja, ki je bilo krajše od 30 minut, največja pa 9.3.2011 ($918,4 \mu\text{g/g SM}$), ko je bila povprečna dnevna temperatura $0,8^{\circ}\text{C}$ in trajanje direktnega sončnega obsevanja 9 ur 54 minut.

Potek vsebnosti ksantofilov sledi poteku trajanja direktnega sončnega obsevanja (pregl. 2).

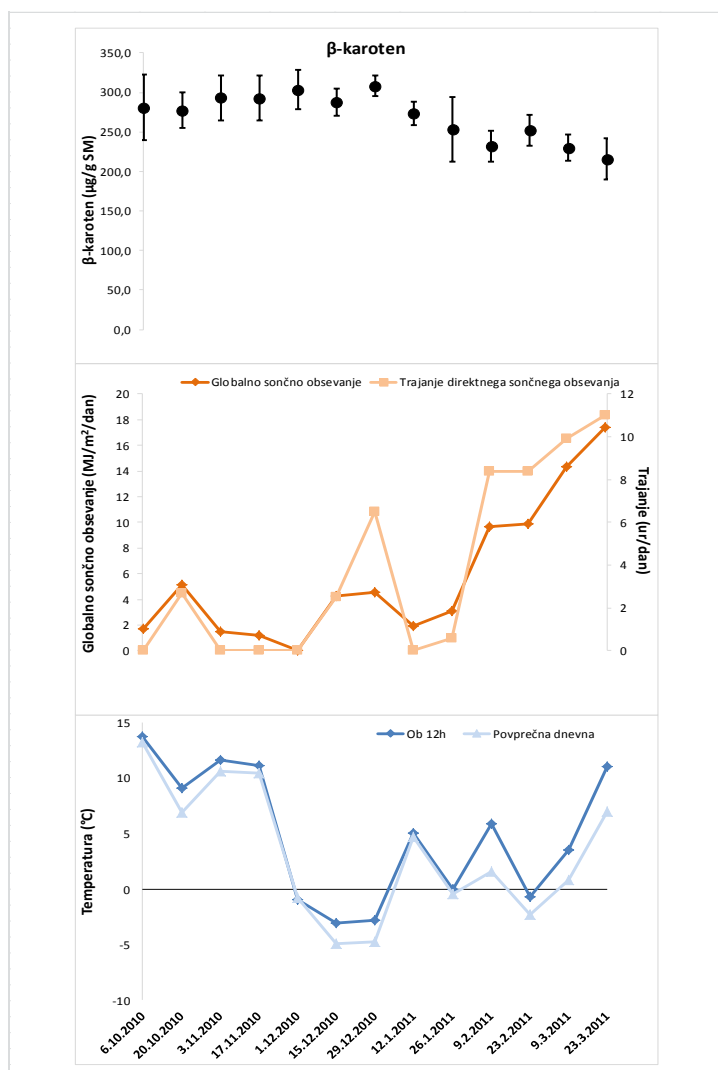
4.1.2 Karoteni



Slika 15: Časovni potek vsebnosti α -karotena $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase

Največjo vsebnost α -karotena smo izmerili 20.10.2010 ($47,9 \mu\text{g/g SM}$), ko je bila povprečna dnevna temperatura $6,9^\circ\text{C}$ in je direktno sončno obsevanje trajalo 2 uri in 42 minut. Marca 2011 pa je bila vsebnost α -karotena pod LoD. 9.3.2011 je bila povprečna dnevna temperatura $0,8^\circ\text{C}$, direktno sončno obsevanja je trajalo 9 ur in 54 minut, 23.3.2011 pa je povprečna dnevna temperatura znašala $7,0^\circ\text{C}$ in direktno sončno obsevanje je trajalo 11 ur.

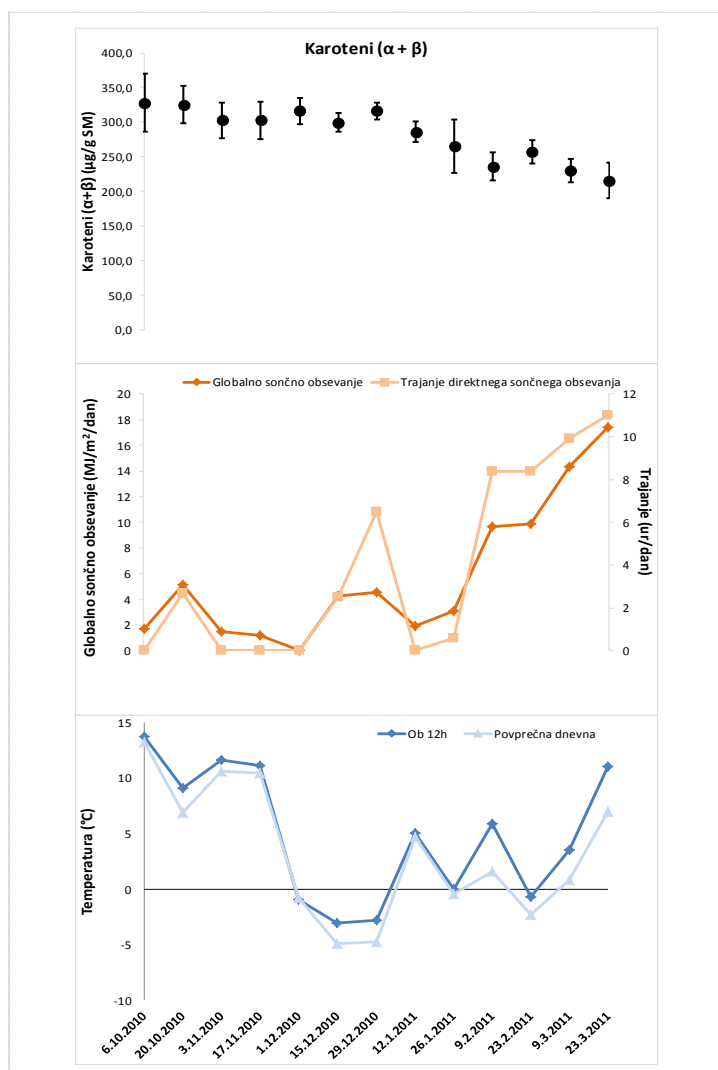
Med potekom temperature in potekom vsebnosti α -karotena obstaja zmerna linearna povezava, med potekom direktnega sončnega obsevanja in potekom vsebnosti pigmenta pa obstaja negativna linearna povezava. S Pearsonovim koeficientom korelacije smo pokazali, da na potek vsebnosti α -karotena vplivata tako osončenost kot temperatura (pregl. 2).



Slika 16: Časovni potek vsebnosti β-karotena ± SD v μg/g suhe mase

Slika 16 predstavlja časovni potek vsebnosti β-karotena. Najmanjšo vsebnost (215,8 μg/g SM) smo tekom vzorčenja izmerili pri zadnjem nabiranju vzorcev (23.3.2011), ko je bila temperatura 7,0 °C in globalno sončno obsevanje največje (17,4 MJ/m²/dan). Največja vsebnost (308,1 μg/g SM) je bila 29.12.2010, ko je bila povprečna dnevna temperatura -4,8 °C, trajanje direktnega osončenja pa 6,5 ur/dan.

Med časovnim potekom direktnega sončnega obsevanja in potekom vsebnosti β-karotena obstaja negativna linearna korelacija (pregl. 2). Najmanjše vsebnosti pigmenta smo izmerili februarja in marca, ko je bilo direktno sončno obsevanje največje.

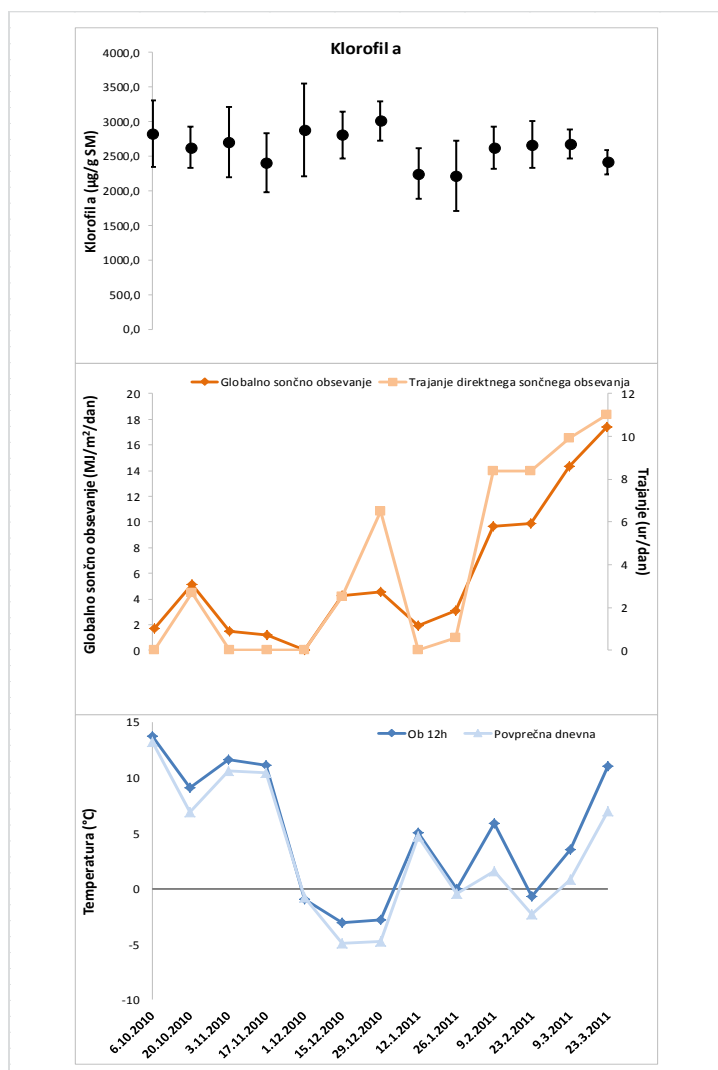


Slika 17: Časovni potek vsebnosti karotenov ± SD v µg/g suhe mase

Najmanjšo vsebnost karotenov (215,8 µg/g SM) smo izmerili pri zadnjem vzorčenju (23.3.2011) pri povprečni dnevni temperaturi 7,0 °C in trajanju direktnega sončnega obsevanja 11 ur. Vsebnost karotenov je bila največja (327,9 µg/g SM) pri prvem vzorčenju (6.10.2010), ko je povprečna dnevna temperatura znašala 13,2 °C in je direktno sončno obsevanje trajalo manj kot 30 minut.

Na vsebnost karotenov vpliva izključno sončno obsevanje. Pearsonov korelacijski koeficient je pokazal, da med potekom osončenosti in vsebnostjo karotenov obstaja negativna korelacija (pregl. 2). Pri povečanem sončnem obsevanju se je zmanjšala vsebnost karotenov.

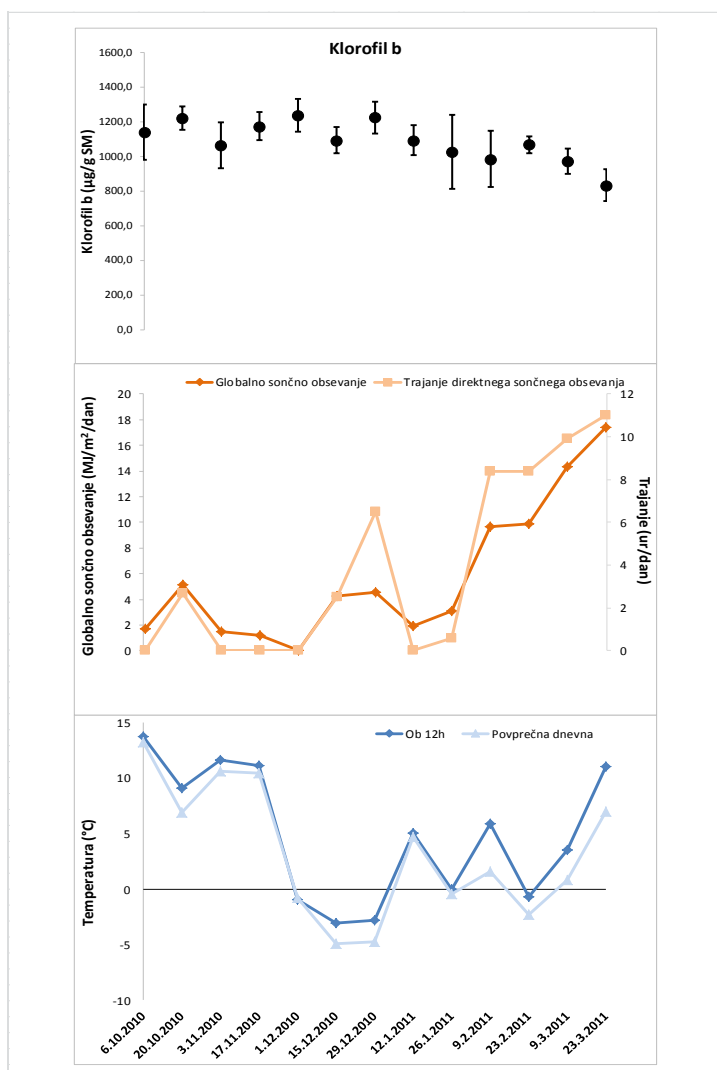
4.2 KLOROFIL



Slika 18: Časovni potek vsebnosti klorofila a $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase

Vsebnost klorofila a je bila najmanjša 26.1.2011 (2219,1 $\mu\text{g/g SM}$), ob povprečni dnevni temperaturi $-0,5^{\circ}\text{C}$ in trajanju direktnega sončnega obsevanja 36 minut, največja pa 29.12.2010 (3012,4 $\mu\text{g/g SM}$), ko je povprečna dnevna temperatura bila $-4,8^{\circ}\text{C}$ in je direktno sončno obsevanje trajalo 6,5 ur.

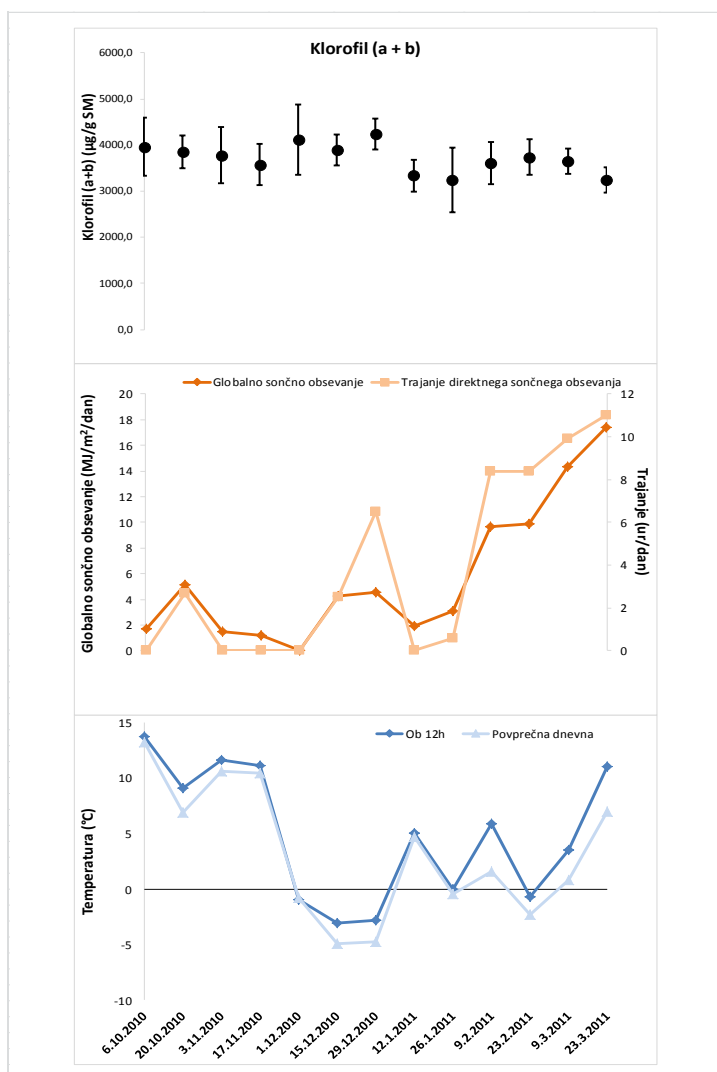
Pearsonov koeficient korelacije je pokazal, da potek vsebnosti klorofila a ni povezan s potekom nobene obravnavane okoljske spremenljivke (pregl. 2).



Slika 19: Časovni potek vsebnosti klorofila b $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase

Najmanjšo vsebnost klorofila b smo izmerili pri zadnjem vzorčenju (23.3.2011), in sicer 835,3 $\mu\text{g/g SM}$. Ob 12. uri je bila temperatura 11,0 °C, trajanje direktnega sončnega obsevanja je bilo 11 ur. Največjo vsebnost smo izmerili 1.12.2010 (1239,1 $\mu\text{g/g SM}$), pri povprečni dnevni temperaturi –0,8 °C in direktnem sončnem obsevanju, ki je bilo krajše od 30 minut.

Marca smo izmerili nekoliko manjše vsebnosti klorofila b. Na njegovo vsebnost vpliva sončno obsevanje, saj pri stopnji značilnosti 0,01 obstaja negativna linearna korelacija (pregl. 2).



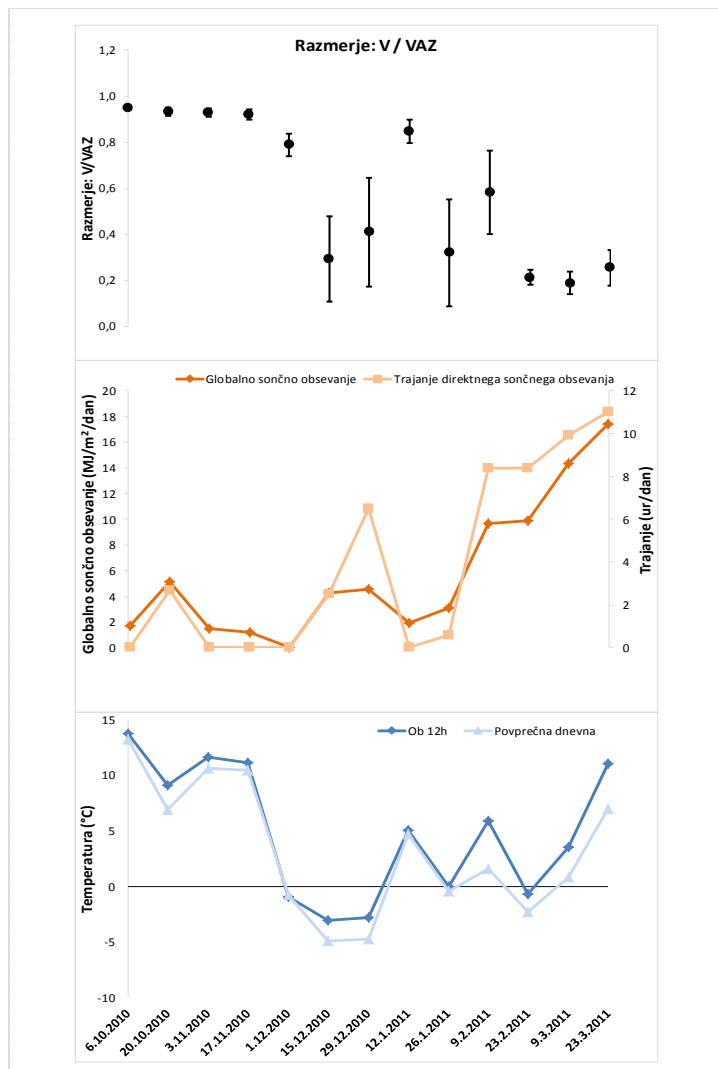
Slika 20: Časovni potek vsebnosti skupnega klorofila $\pm$ SD v $\mu\text{g/g}$ suhe mase

Najmanjšo vsebnost skupnega klorofila smo izmerili 26.1.2011 ($3246,2 \mu\text{g/g SM}$) pri povprečni dnevni temperaturi $-0,5^\circ\text{C}$ in trajanju direktnega sončnega obsevanja 36 minut. Največja vsebnost je bila $4239,4 \mu\text{g/g SM}$, ki smo jo izmerili 29.12.2010. Povprečna dnevna temperatura je bila $-4,8^\circ\text{C}$, direktno sončno obsevanje pa je trajalo 6,5 ur.

S Pearsonovim koeficientom korelacije smo dokazali, da na vsebnosti skupnega klorofila ne vpliva nobena okoljska spremenljivka (pregl. 2).

4.3 RAZMERJA MED PIGMENTI

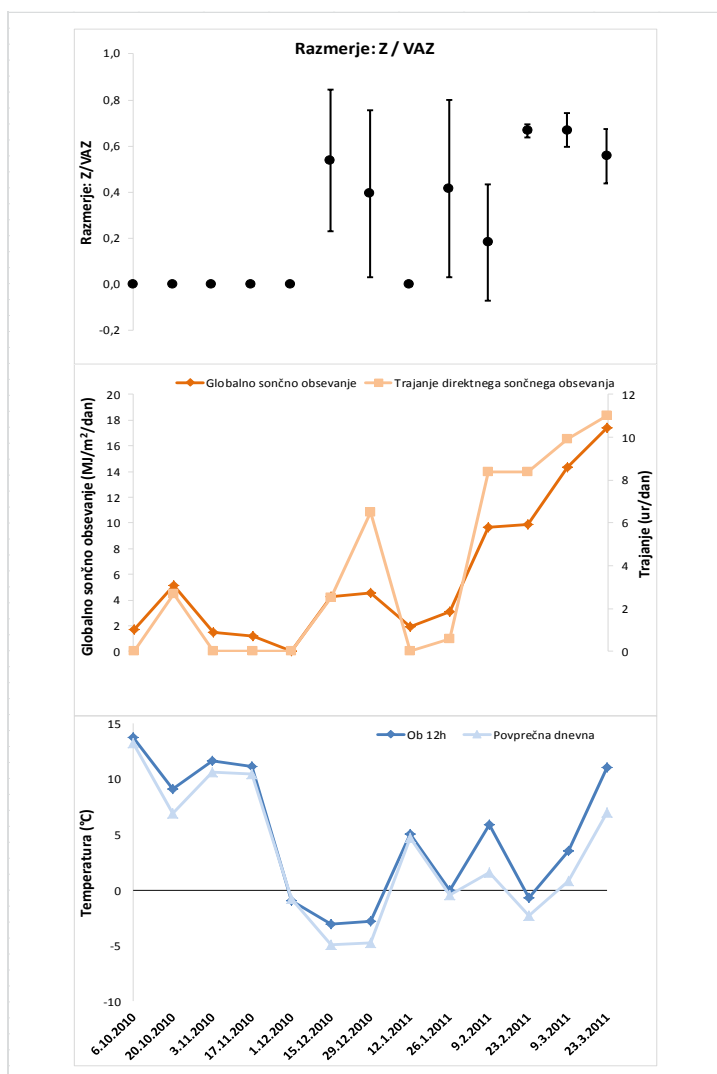
Izbrana razmerja, ki smo jih določili v listih ognjenega trna, so prikazana na slikah 21 – 32.



Slika 21: Časovni potek razmerja V / VAZ ± SD
(VAZ – violaksantin + anteraksantin + zeaksantin)

Največje razmerje V/VAZ smo določili pri prvem vzorčenju ob povprečni dnevni temperaturi 13,2 °C in trajanju direktnega sončnega obsevanja, ki je bilo krajše od 30 minut. Najmanjše razmerje pa je bilo 9.3.2011, ko je bila povprečna dnevna temperatura 0,8 °C in trajanje direktnega sončnega obsevanja 9 ur 54 minut.

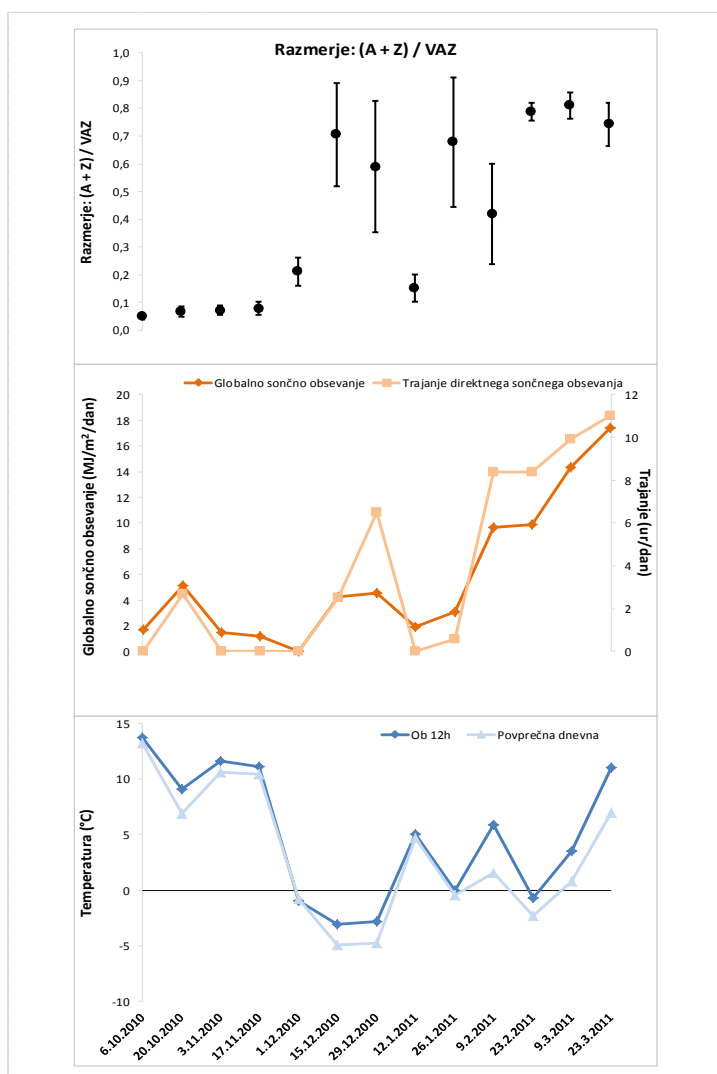
Ob povečani oblačnosti in višjih temperaturah (oktober, november) je bila vsebnost skupnih pigmentov ksantofilnega cikla glede na violaksantin manjša, kot marca. Pearsonov koeficient korelacije je pri stopnji značilnosti 0,01 pokazal, da med potekom temperature in potekom razmerja obstaja pozitivna linearna povezava, med potekom sončnega obsevanja in potekom razmerja pa negativna linearna povezava (pregl. 2).



Slika 22: Časovni potek razmerja Z / VAZ $\pm$ SD
(VAZ – violaksantin + anteraksantin + zeaksantin)

V prvih petih vzorčenjih in 12.1.2011 razmerja Z/VAZ nismo mogli določiti, saj je bila vsebnost zeaksantina pod LoD. Največje razmerje Z/VAZ je bilo 9.3.2011, ko je bila povprečna dnevna temperatura 0,8 °C in trajanje direktnega sončnega obsevanja 9 ur 54 minut.

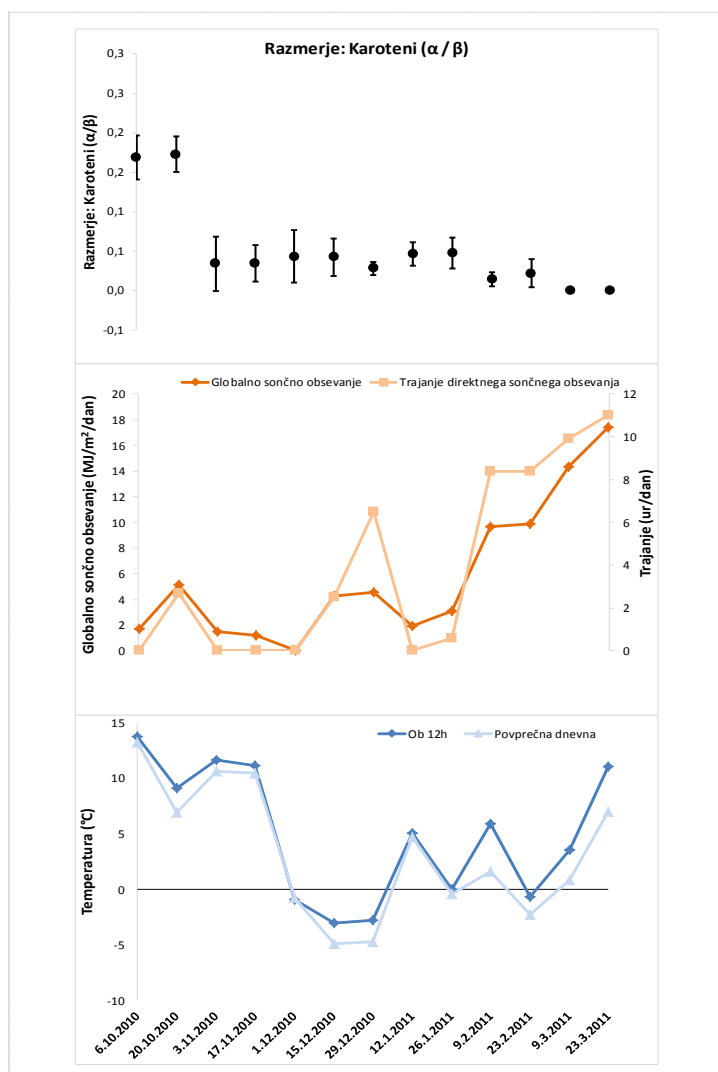
S povečanjem trajanja in jakosti sončnega obsevanja se je vsebnost skupnih pigmentov ksantofilnega cikla glede na zeaksantin zmanjšala. Pri stopnji značilnosti 0,01 trdimo, da je potek razmerja povezan s potekom sončnega obsevanja, med temperaturo in razmerjem pa obstaja negativna linearna povezava (pregl. 2).



Slika 23: Časovni potek razmerja (A+Z) / VAZ ± SD

Največje razmerje je bilo 9.3.2011. Povprečna dnevna temperatura je bila 0,8 °C in direktno sončno obsevanje je trajalo 9,9 ur. Najmanjše razmerje (A+Z)/VAZ smo določili pri prvem vzorčenju (6.10.2010) ob povprečni dnevni temperaturi 13,2 °C in direktnem sončnem obsevanju, ki je bilo krajše od 30 minut.

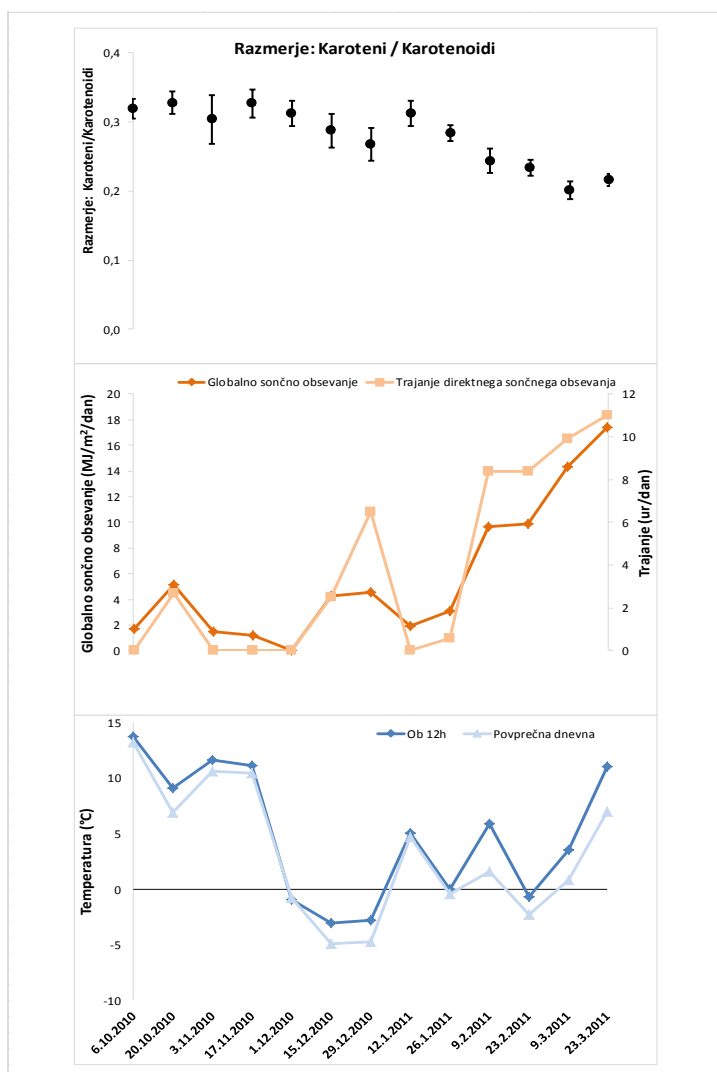
Potek razmerja (A+Z)/VAZ sledi poteku sončnega obsevanja. Ob povečanem osončenju se je zmanjša vsebnost VAZ glede na (A+Z). Pearsonov koeficient korelacije je pokazal, da med potekom temperature in potekom razmerja obstaja negativna linearna povezava (pregl. 2).



Slika 24: Časovni potek razmerja α -karoten / β -karoten $\pm$ SD

Največje razmerje α -karoten/ β -karoten smo izmerili pri drugem vzorčenju (20.10.2010), ko je bila povprečna dnevna temperatura 6,9 °C in je direktno sončno obsevanje trajalo 2 uri in 42 minut. Najmanjše razmerje pa je bilo 9.3.2011 pri povprečni dnevni temperaturi 0,8 °C (v času vzorčenja 3,5 °C) in trajanju direktnega sončnega obsevanja 9 ur in 54 minut in 23.3.2011, ko je direktno sončno obsevanje trajalo 11 ur, povprečna dnevna temperatura pa je bila 7,0 °C (v času vzorčenja 11,0 °C). Marca 2011 je bila vsebnost α -karotena pod LoD.

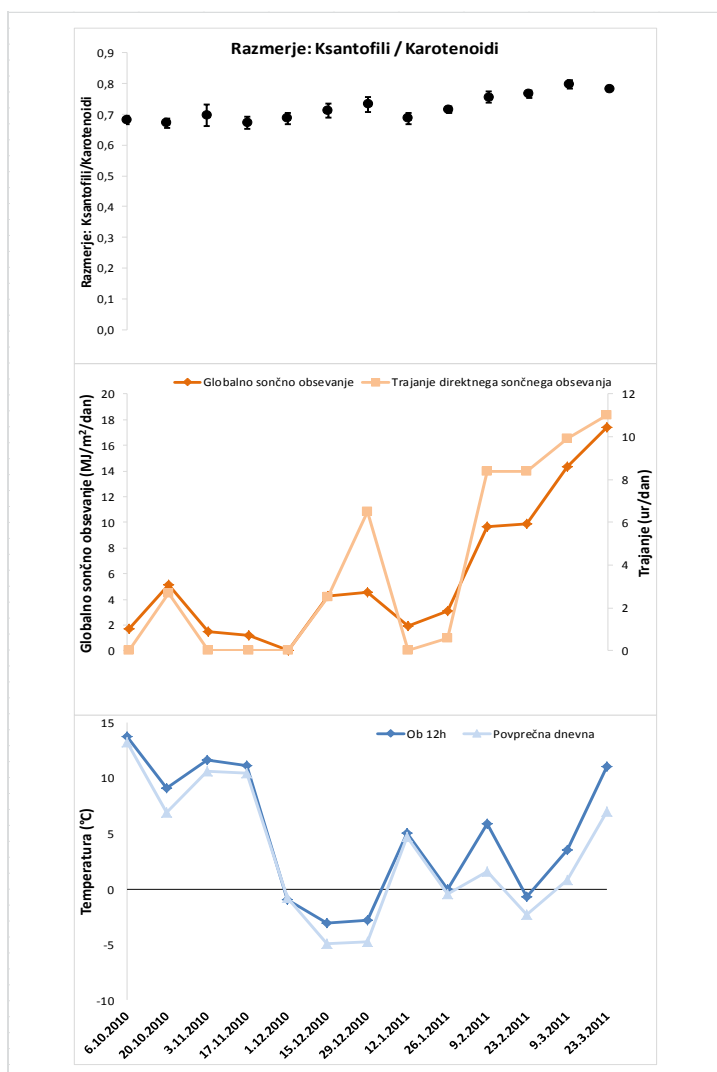
Med potekom temperature in potekom razmerja α -karoten/ β -karoten obstaja šibka linearna povazava, med potekom sončnega obsevanja in potekom razmerja pigmentov pa obstaja zmerna negativna linearna povezava. S Pearsonovim koeficientom korelacije smo pokazali, da na razmerje vplivata tako osončenost kot temperatura (pregl. 2).



Slika 25: Časovni potek razmerja karoteni / karotenoidi $\pm$ SD

Največje razmerje karoteni/karotenoidi smo določili 9.3.2011 pri povprečni dnevni temperaturi 0,8 °C in trajanju direktnega sončnega obsevanja 9 ur 54 minut. Najmanjše razmerje je bilo 20.10.2010, ko je bila povprečna dnevna temperatura 6,9 °C in je direktno sončno obsevanje trajalo 2 uri in 42 minut.

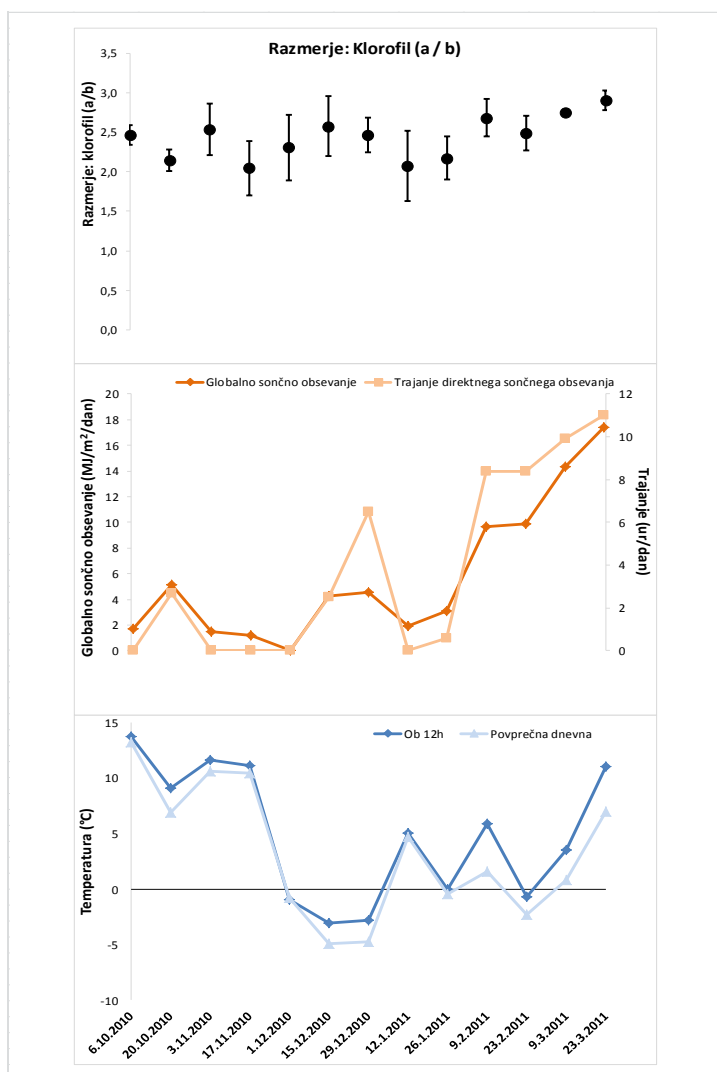
Februarja in marca se je povečala vsebnost karotenoidov v primerjavi s karoteni. Pearsonov koeficient korelacije pri stopnji značilnosti 0,01 kaže, da med potekom sončnega obsevanja in razmerjem karoteni/karotenoidi obstaja močna negativna linearna korelacija (pregl. 2).



Slika 26: Časovni potek razmerja ksantofili / karotenoidi ± SD

Največje razmerje ksantofili/karotenoidi je bilo 9.3.2011 pri povprečni dnevni temperaturi 0,8 °C in trajanju direktnega sončnega obsevanja 9 ur 54 minut. Najmanjše razmerje smo določili 20.10.2010, ko je bila povprečna dnevna temperatura 6,9 °C in je direktno sončno obsevanje trajalo 2 uri in 42 minut.

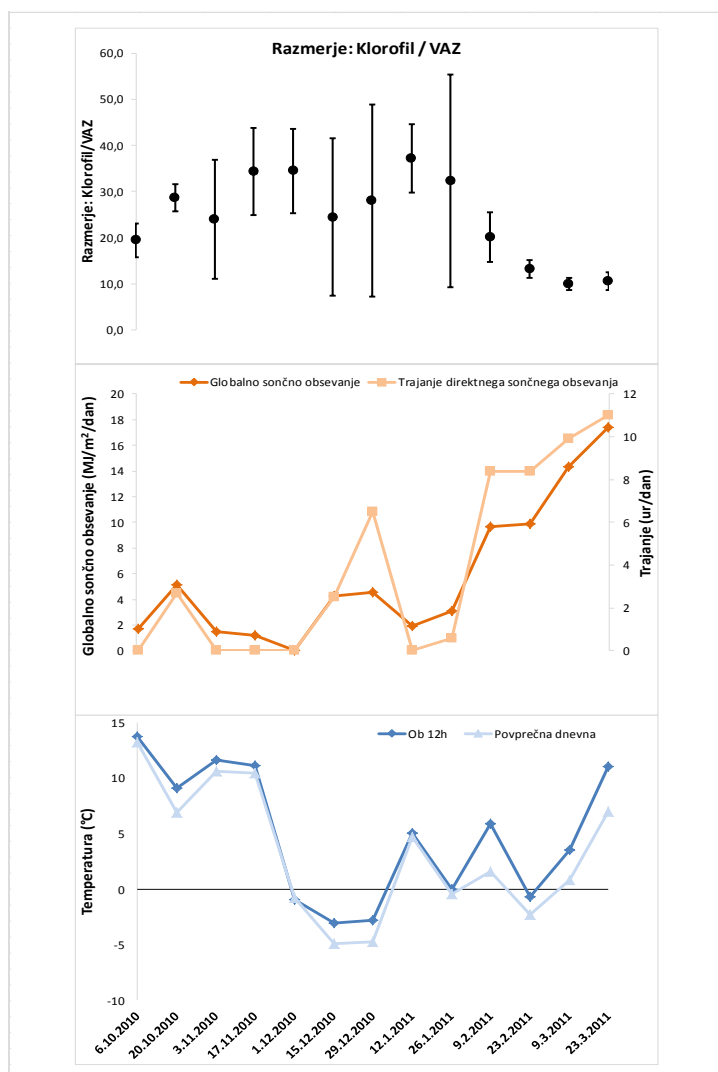
Razmerje ksantofili/karotenoidi se tekom vzorčenja ni bistveno spreminjalo. Potek razmerja sledi poteku sončnega obsevanja (pregl. 2).



Slika 27: Časovni potek razmerja klorofil a / klorofil b $\pm$ SD

Najmanjšo vsebnost klorofila b glede na klorofil a smo izmerili pri zadnjem vzorčenju. Takrat je direktno sončno obsevanje trajalo 11 ur, povprečna dnevna temperatura pa je bila 7,0 °C, ob 12.uri (v času vzorčenja) je temperatura znašala 11,0 °C. Največja vsebnost klorofila b glede na klorofil a je bila 17.11.2010, ko je direktno sončno obsevanje trajalo manj kot 30 minut, povprečna dnevna temperatura pa je bila 10,4 °C.

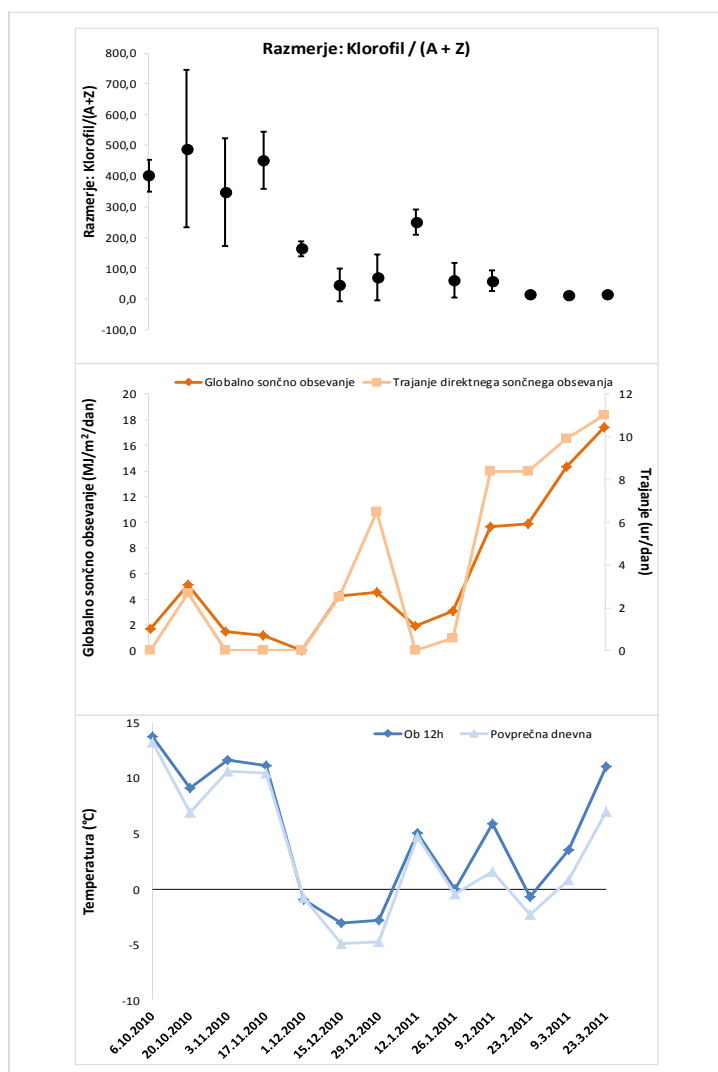
V februarju in marcu se je vsebnost klorofila b glede na klorofil a nekoliko zmanjšala. Potek razmerja sledi poteku osončenosti (pregl. 2).



Slika 28: Časovni potek razmerja klorofil / VAZ ± SD

Največje razmerje klorofil/VAZ je bilo 12.1.2011 pri povprečni dnevni temperaturi 4,7 °C in trajanju direktnega sončnega obsevanja manj kot 30 minut. Najmanjše razmerje smo določili 9.3.2011. Povprečna dnevna temperatura je bila 0,8 °C in direktno sončno obsevanje je trajalo 9 ur 54 minut.

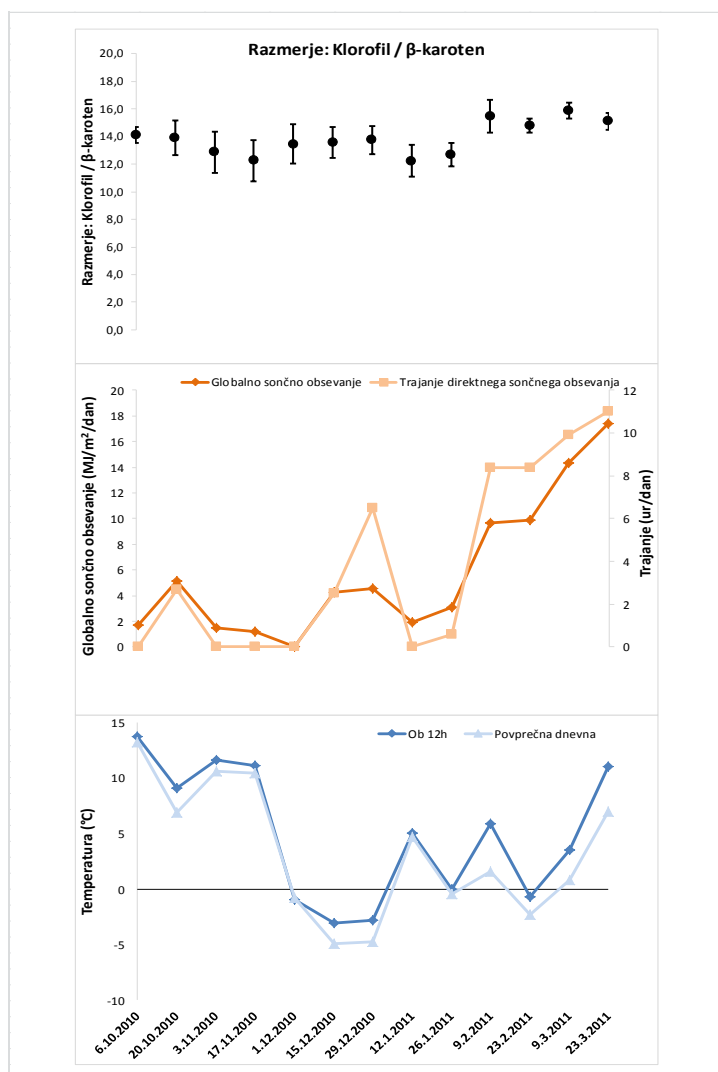
V februarju in marcu se je vsebnost skupnih pigmentov ksantofilnega cikla glede na klorofil povečala. Med potekom sončnega obsevanja in potekom razmerja obstaja negativna linearna povezava (pregl. 2).



Slika 29: Časovni potek razmerja klorofil / (A+Z) $\pm$ SD

Največje razmerje klorofil/(A+Z) smo izmerili pri drugem vzorčenju (20.10.2010), ko je bila povprečna dnevna temperatura 6,9 °C in je direktno sončno obsevanje trajalo 2 uri in 42 minut. Najmanjše razmerje pa je bilo 9.3.2011 pri povprečni dnevni temperaturi 0,8 °C (v času vzorčenja 3,5 °C) in trajanju direktnega sončnega obsevanja 9 ur in 54 minut.

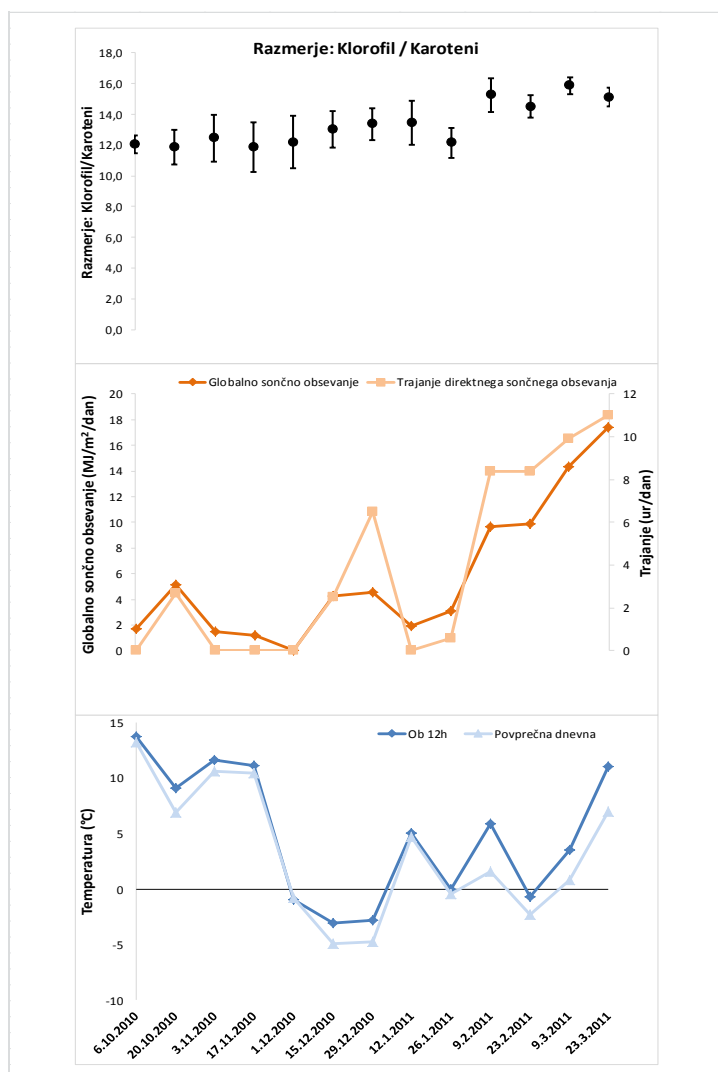
Vsebnost (A+Z) glede na klorofil je tekom vzorčenja ob povečanju sončnega obsevanja močno narasla, še posebej februarja in marca. S Pearsonovim koeficientom korelacije smo pri stopnji značilnosti 0,01 pokazali, da potek razmerja sledi poteku temperature, med sončnim obsevanjem in razmerjem klorofil/(A+Z) pa obstaja negativna linearna korelacija (pregl. 2).



Slika 30: Časovni potek razmerja klorofil / β-karoten ± SD

Tekom vzorčenja je bilo največje razmerje klorofil/β-karoten 9.3.2011. Povprečna dnevna temperatura je bila 0,8 °C in direktno sončno obsevanje je trajalo 9 ur 54 minut. Najmanjše razmerje smo določili 12.1.2010 pri povprečni dnevni temperaturi 4,7 °C in trajanju direktnega sončnega obsevanja manj kot 30 minut.

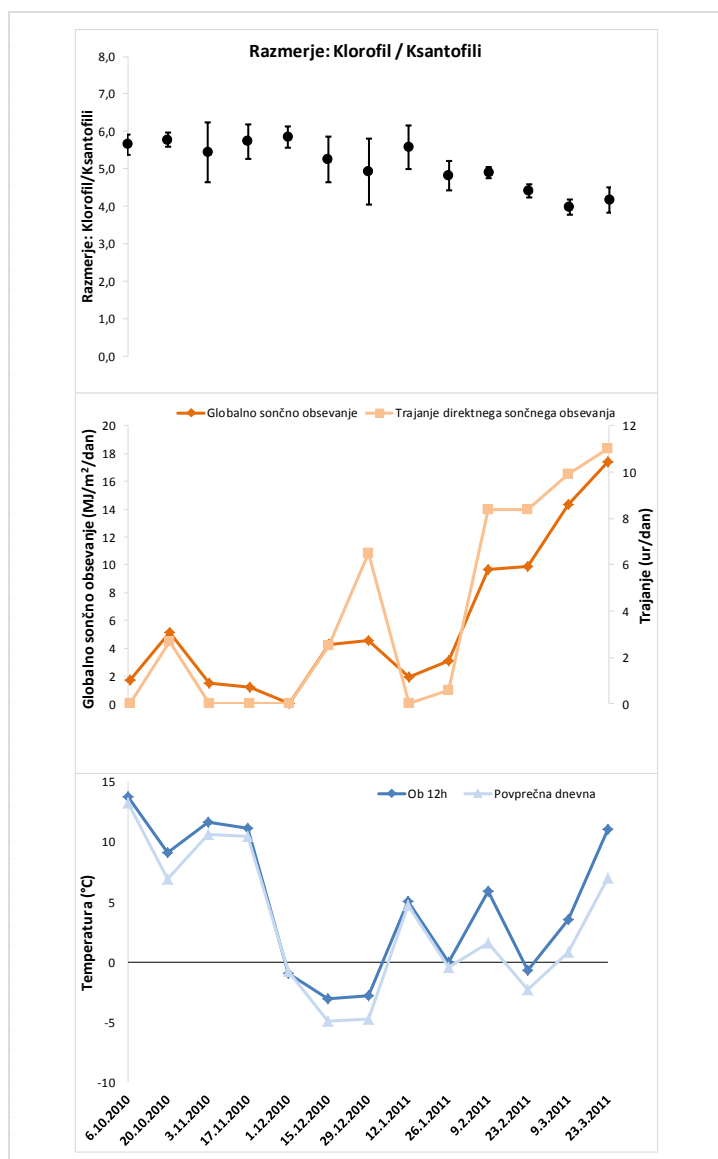
Februarja in marca se je vsebnost β-karotena glede na klorofil nekoliko zmanjšala. S Pearsonovim koeficientom korelacije smo pokazali, da časovni potek razmerja klorofil/β-karoten sledi poteku sončnega obsevanja (pregl. 2).



Slika 31: Časovni potek razmerja klorofil / karoteni ± SD

Največje razmerje klorofil/karoteni smo določili 9.3.2011 pri povprečni dnevni temperaturi 0,8 °C in trajanju direktnega sončnega obsevanja 9 ur 54 minut. Najmanjše razmerje pa je bilo 20.10.2010, ko je bila povprečna dnevna temperatura 6,9 °C in je direktno sončno obsevanje trajalo 2 uri in 42 minut.

Februarja in marca se je vsebnost karotenov glede na klorofil zmanjšala. Pri stopnji značilnosti 0,01 lahko trdimo, da potek razmerja sledi poteku sončnega obsevanja (pregl. 2).



Slika 32: Časovni potek razmerja klorofil / ksantofili ± SD

Tekom vzorčenja smo največje razmerje klorofil/ksantofili določili 1.12.2010 pri povprečni dnevni temperaturi $-0,8^{\circ}\text{C}$ in direktnem sončnem obsevanju, ki je trajalo manj kot 30 minut. Najmanjše razmerje je bilo 9.3.2011 pri povprečni dnevni temperaturi $0,8^{\circ}\text{C}$ in trajanju direktnega sončnega obsevanja 9 ur 54 minut.

Februarja in marca se je vsebnost ksantofilov glede na klorofil povečala. Na časovni potek razmerja klorofil/ksantofili vpliva potek sončnega obsevanja. Med spremenljivkama obstaja negativna linearna korelacija (pregl. 2).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Okolje je spremenljivo, zato morajo rastline imeti sposobnost, da se hitro prilagodijo na spremembe, kot so temperatura, jakost sončnega sevanja, dostopnost vode in hranilnih snovi. Okoljskim dejavnikom se prilagaja tudi fotosinezni aparat, ki je z različnimi mehanizmi zaščiten v manj optimalnih razmerah, ki lahko prevladujejo v zimskem času.

Namen diplomske naloge je bil določiti vsebnosti rastlinskih pigmentov (ksantofili violaksantin, anteraksantin, zeaksantin, neoksantin in lutein, α - in β -karoten in klorofil a in klorofil b) in ugotoviti, kako se vsebnosti spreminjajo glede na spremembe svetlobe in temperature v hladnejši polovici leta. Za poskusno rastlino smo izbrali vednozeleno okrasno rastlino ognjeni trn (*Pyraecantha coccinea* Roem.). Vzorčenje rastlinskega materiala je potekalo na prostem, v naravnih razmerah. Vzorce smo nabirali na prisojni strani grma med 6.10.2010 in 23.3.2011 v časovnem intervalu na 14 dni. Rastlinski material, ki smo ga nabrali 25.5.2011, nam služi za prikaz začetnega stanja rastline.

Spremembe v sestavi karotenoidov v fotosinteznem aparatu so posledica sprememb v jakosti in trajanju svetlobnega sevanja (Havaux in Niyogi, 1999). Vsebnosti skupnih karotenoidov (sl. 6) so se tekom vzorčenja gibale med 889,6 $\mu\text{g/g}$ SM in 1190,1 $\mu\text{g/g}$ SM. Največjo vsebnost smo izmerili 29.12.2010, pri naslednjem vzorčenju (12.1.2011) pa so listi vsebovali 25 % manj karotenoidov, kar je bila tudi najmanjša izmerjena vsebnost med potekom vzorčenja. Zmanjšanje vsebnosti karotenoidov je lahko posledica prilagoditve na dvig povprečne dnevne temperature za 9,5 °C in spremembe v trajanju direktnega sončnega obsevanja iz 6,5 ur/dan na manj kot 30 minut/dan (pregl. 1). Drug razlog za zmanjšanje vsebnosti karotenoidov so lahko poškodbe in razpad pigmentov, ki so lahko posledica oksidativnega stresa. V naslednjih vzorčenjih so se vsebnosti karotenoidov povečevale s hkratnim večanjem jakosti sončnega sevanja, kar je pokazala tudi statistična analiza (pregl. 2). Med časovnim potekom vzorčenja so listi vsebovali med 19 in 39 % več karotenoidov, kot listi nabrani v maju 2011 (pregl. 3).

Vsebnosti skupnih pigmentov ksantofilnega cikla (VAZ) (sl. 7) so variirale med 95,5 in 375,2 $\mu\text{g/g}$ SM. V vzorcih, nabranih med 6.10. in 1.12.2010, je bil delež (A+Z) (sl. 23) od 5 do 21 %, med 79 in 95 % skupnih pigmentov ksantofilnega cikla je predstavljal violaksantin (sl. 21). Veliko spremembo v deležih posameznih pigmentov smo zaznali pri šestem vzorčenju (15.12.2010), ko se je ob povečanju direktnega sončnega obsevanja in padcu temperature glede na prejšnji termin (pregl. 1) zmanjšal delež violaksantina na 29 %, delež (A+Z) pa se je povečal na 71 %. Podobne deleže posameznih pigmentov smo ob podobnih vremenskih razmerah zabeležili tudi pri sedmem vzorčenju (29.12.2010). Pri naslednjem vzorčenju (12.1.2011) je spet viden preobrat. Z zvišanjem temperature in zmanjšanjem direktnega sončnega obsevanja se je delež violaksantina povečal na 85 % skupnih pigmentov ksantofilnega cikla. Takšna sprememba je posledica epoksidacije deepoksida zeaksantina preko monoepoksida anteraksantina v diepoxid violaksantin, ki jo stimulira šibka svetloba (Havaux in Niyogi, 1999). Podobno, kot Yamamoto in sod. (1962), smo dokazali, da se z zmanjšanjem violaksantina povečuje delež tako anteraksantina kot zeaksantina. V februarju in marcu so se z naraščanjem energije in povečanjem trajanja direktnega sončnega obsevanja povečevale vsebnosti anteraksantina in zeaksantina kot tudi skupnih pigmentov ksantofilnega cikla, vsebnosti violaksantina pa so

bile konstantne (sl. 7, 8, 9, 11). Vsebnosti anteraksantina, zeaksantina in skupnih pigmentov ksantofilnega cikla so bile pri vzorcu, nabranem v maju 2011 (pregl. 2) bistveno manjše, kot vsebnosti, ki smo jih izmerili v marcu, vsebnost violaksantina pa je bila podobna. Povečanje vsebnosti ksantofilov je odraz povečane sinteze in pokazatelj prilagoditve rastlin na stresne razmere (Demmig-Adams in Adams, 1993). Pri vzorčenju maja (25.5.2011) je trajanje direktnega sončnega obsevanja bilo podobno kot pri zadnjem vzorčenju marca, energija obsevanja je bila večja za 6,45 MJ/m²/dan, povprečna dnevna temperatura je bila višja za 13,2 °C (pregl. 2).

Kadar rastlina ni v stresu, se delež zeaksantina glede na VAZ zmanjša z zmanjšanjem jakosti sončnega sevanja. Posledično se zmanjša odvajanje presežne eksitacijske energije v obliki toplote. Če pa je rastlina v močnem stresu, pa lahko delež zeaksantina ostane velik tudi, ko se jakost sončnega sevanja zmanjšuje (Demmig-Adams in Adams, 1992). V našem primeru slednjega stanja nismo zasledili, saj je delež zeaksantina glede na VAZ sledil poteku sončnega sevanja. Da bi potrdili rezultate raziskav, bi bilo smiselno vzorčiti v krajših časovnih intervalih, saj so Ottander in sod. (1995) ugotovili, da pri prenosu rdečega bora (*Pinus sylvestris*) iz zimskih razmer na sobno temperaturo in šibko osvetlitev v roku 60 ur poteče epoksidacija zeaksantina v violaksantin.

Neoksantin deluje kot antioksidant in ima pomembno vlogo pri zaščiti PSII pred inaktivacijo. Še posebej aktiven pa je pri odstranjevanju superoksidnega radikala (O₂^{•-}), ki nastane pri Mehlerjevi reakciji (Dall'Osto in sod., 2007). Vsebnosti neoksantina (sl. 11) so se gibale med 89,0 in 133,0 µg/g SM. Podobno, kot pri skoraj vseh pigmentih, je do precejšnjega zmanjšanja vsebnosti prišlo med sedmim (29.12.2010) in osmim (1.12.2011) vzorčenjem, kar za 31 %. Najmanjšo vsebnost smo izmerili pri zadnjem vzorčenju marca, še nekoliko manjšo vsebnost pa pri vzorčenju maja. Statistična analiza ni pokazala povezanosti med potekom temperature ali sončnega obsevanja s potekom vsebnosti neoksantina (preg. 3).

Lutein ima, kot ostali karotenoidi, pomembno vlogo pri dušenju tripletnega stanja klorofila in s tem preprečuje nastanek singletnega kisika (Johnson, 2007). Vsebnosti luteina (sl. 13) so se oktobra, novembra in decembra postopoma večale. Največjo vsebnost smo izmerili 29.12.2010, 12.1.2011 pa je bila vsebnost za 19 % manjša. Februarja in marca smo zaznali trend zmanjševanja vsebnosti. Najmanjšo vsebnost so imeli listi nabrani maja 2011 (pregl. 3). Listi so vsebovali 20 % manj luteina, kot listi nabrani 6.10.2010, ko smo izmerili najmanjšo vsebnost tekom vzorčenja. Statistična analiza je pokazala, da med časovnim potekom temperature in vsebnostjo neoksantina obstaja negativna linearna korelacija (pregl. 2)

Vsebnosti β-karotena (sl. 16) se oktobra, novembra in decembra niso bistveno spreminjale. V drugi polovici vzorčenja (januar, februar, marec) pa se kaže trend zmanjšanja vsebnosti. To je lahko posledica oksidativnega stresa, saj je β-karoten najbolj dovzeten za oksidativne poškodbe (Young in Britton, 1990). Demmig in sod. (1988) so ugotovili, da se je v stresnih razmerah, poleg povečanja zeaksantina, povečala vsebnost pigmentov ksantofilnega cikla predvsem na račun zmanjšanja vsebnosti β-karotena, kar bi lahko tudi bil vzrok za zmanjšanje vsebnosti β-karotena v našem primeru. Statistična analiza je pokazala, da med

potekom sončnega obsevanja in potekom vsebnosti β -karotena obstaja negativna linearna korelacija (pregl. 2)

Literatura navaja, da sta v listih rastlin najbolj zastopana lutein in β -karoten. To lahko potrdimo, saj so vsebnosti luteina predstavljale med 36 in 47 % karotenoidov, vsebnosti β -karotena pa med 20 in 32 %.

Vsebnosti α -karotena (sl. 15) se od novembra do januarja niso bistveno spreminjale, v februarju in marcu pa lahko zaznamo trend zmanjševanja vsebnosti, saj je marca bila vsebnost α -karotena pod LoD. Vsebnosti, ki smo jih izmerili oktobra, so kar za 80 % večje, kot vsebnosti izmerjene novembra. Sprva smo pomislili na napako, a smo pri vzorcu, nabranem maja, dobili podobne vsebnosti kot oktobra, kar kaže na to, da je α -karoten v vegetacijski dobi pomembnejši kot pozimi. S Pearsonovim koeficientom korelacije smo pokazali, da na potek vsebnosti α -karotena vplivata tako osončenost kot temperatura (pregl. 2)

Vsebnosti klorofila (sl. 20) se oktobra, novembra in decembra niso bistveno spreminjale. Največjo vsebnost smo izmerili v decembru. Večje zmanjšanje vsebnosti (za 22 %) pa smo opazili v januarju. V nadaljevanju vzorčenja so vsebnosti klorofila ostale manjše, vendar dokaj konstatne. Adams in sod. (2002) so ugotovili, da je bila vsebnost klorofila pri navadnem zimzelenu (*Vinca minor* L.) največja spomladi in poleti, zmanjševala se je jeseni in bila najmanjša pozimi. V našem primeru temu ni tako, saj smo največjo vsebnost izmerili 29.12.2010 (3012,4 $\mu\text{g/g}$ SM), najmanjšo (3077,6 $\mu\text{g/g}$ SM) pa pri vzorčenju maja 2011 (pregl. 3), kar je 5 % manj, kot najmanjša izmerjena vsebnost med potekom vzorčenja (26.1.2011). S statistično analizo smo pokazali, da na potek vsebnosti skupnega klorofila in klorofila a ne vpliva nobena obravnavana okoljska spremenljivka, na potek vsebnosti klorofila b pa vpliva potek sončnega obsevanja (pregl. 2).

Če primerjamo rezultata razmerja klorofil/(A+Z) (sl. 29), ki smo ju dobili decembra, z rezultati predhodnih vzorčenj (oktober in november), opazimo, da pride do velikega povečanja vsebnosti (A+Z) glede na klorofil. Do takšnih sprememb v razmerju pride zaradi povečane potrebe po odvajanju presežne eksitacijske energije iz fotosinteznega aparata (fotozaščite). Enake spremembe so opazili Adams in sod. (1995) pri raziskavah kombinacije več stresnih dejavnikov. Z zmanjšanjem vsebnosti (A+Z) glede na klorofil 12.1.2011, ki je najverjetneje posledica bolj ugodnih okoljskih razmer za rastlino, pa je hkrati prišlo tudi do večjega zmanjšanja vsebnosti klorofila. Predvidevamo, da je zmanjšanje vsebnosti klorofila posledica oksidativnega stresa in fotoinhibicije. Do konca vzorčenja so bile vsebnosti (A+Z) glede na klorofil mnogo večje, kot oktobra in novembra. Razmerje pigmentov v maju (pregl. 4) je bilo podobno razmerju v decembru.

Pri časovnem poteku vsebnosti pigmentov še posebej izstopajo vsebnosti, ki smo jih dobili pri vzorčenju 12.1.2011. Vsebnosti vseh pigmentov, razen violaksantina in α -karotena, so bile precej manjše od vsebnosti, ki smo jih dobili pri predhodnem terminu vzorčenja 29.12.2010. Predvidevamo, da je v časovnem obdobju med vzorčenjema rastlina bila izpostavljena stresu in da so oksidanti vzrok za zmanjšanje vsebnosti, saj ti povzročajo oksidativne poškodbe oz. bledenje pigmentov. Odprto puščamo tudi možnost, da je vzrok zmanjšanja vsebnosti večine pigmentov pokritost grma s snegom.

Na osnovi naših rezultatov lahko podamo naslednje sklepe:

- Vsebnosti pigmentov ksantofilnega cikla se tekom zime spreminjajo. Vsebnost violaksantina sledi poteku temperature. Na časovni potek vsebnosti anteraksantina, zeaksantina in skupnih pigmentov ksantofilnega cikla vpliva potek jakosti in trajanja direktnega sončnega obsevanja.
- Vsebnosti skupnih ksantofilov se tekom zime spreminjajo. Na časovni potek vsebnosti neoksantina ne vpliva nobena obravnavana okoljska spremenljivka, spremembe v vsebnosti luteina pa sledijo spremembam v temperaturi.
- Vsebnosti karotenov se tekom zime spreminjajo. Spremembe v vsebnosti α -karotena sledijo spremembam tako temperature kot osončenosti, potek vsebnosti β -karotena pa je povezan s potekom osončenosti.
- Vsebnosti klorofila se tekom zime spreminjajo. Časovni potek vsebnosti klorofila a ne sledi poteku nobene obravnavane okoljske spremenljivke, časovni potek klorofila b pa je povezan s potekom osončenosti.
- Razmerja med posameznimi pigmenti se tekom zime spreminjajo.
- Pearsonov koeficient korelacije je pokazal, da se na spremembe temperature najbolj odzivata violaksantin in lutein. Na spremembe v jakosti in trajanju direktnega sončnega obsevanja se najbolj odzivata anteraksantin in zeaksantin.

6 POVZETEK

Rastline so izpostavljene biotskim in abiotskim dejavnikom, katerim se morajo ustrezno prilagoditi. Ti dejavniki pogosto vodijo v stresno stanje, kot je npr. kombinacija nizkih temperatur s povečano jakostjo sončnega sevanja. Rastlinski pigmenti so lahko kazalci stresa v rastlinah in odpornosti rastlin na delovanje stresnih dejavnikov. Namen diplomskega dela je bil ovrednotiti spremembe fotosinteznih barvil pri okrasni rastlini ognjeni trn (*Pyracantha coccinea* Roem.) izven vegetacijskega časa in ugotoviti, kako se vsebnosti spreminjajo glede na spremembe svetlobe in temperature. Predvidevali smo, da se vsebnosti pigmentov in razmerja med njimi tekom zime spreminjajo.

Vzorčenje rastlinskega materiala je potekalo v naravnih razmerah pred stavbo Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete. Vzorce smo nabirali vedno na prisojni strani grma med 6.10.2010 in 23.3.2011 v rednih časovnih intervalih na 14 dni, vedno med 12. in 14. uro (11. in 13. po zimskem času). Rastlinski material, ki smo ga nabrali 25.5.2011, nam služi za prikaz običajnega stanja rastline. S pomočjo HPLC analize smo določili vsebnosti fotosinteznih pigmentov. Meteorološke podatke smo pridobili iz avtomatske meteorološke postaje LI-COR, ki se nahaja na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete, in Agencije Republike Slovenije za okolje (glavna meteorološka postaja Ljubljana-Bežigrad).

Ugotovili smo, da se vsebnosti fotosinteznih pigmentov v hladnejši polovici leta spreminjajo glede na trajanje in jakost sončnega obsevanja in spremembe v temperaturi. Časovnemu poteku osončenosti sledijo vsebnosti anteraksantina, zeaksantina, skupnih pigmentov ksantofilnega cikla in ksantofilov. Med potekom osončenosti in potekom vsebnosti β -karotena, skupnih karotenov in klorofila b obstaja negativna linearna korelacija. Časovnemu poteku temperature sledita violaksantin in lutein. Spremembe v vsebnosti α -karotena sledijo spremembam tako temperature kot osončenosti. Časovna poteka vsebnosti neoksantina in klorofila a ne sledita poteku nobene obravnavane okoljske spremenljivke. Na spremembe v temperaturi se najbolj odzivata violaksantin in lutein, na spremembe sončnega obsevanja pa anteraksantin in violaksantin.

7 VIRI

- Abram V., Cigić B., Poklar Ulrih N., Skrt M. 2006. Eksperimentalna biokemija za študente biotehnologije in živilske tehnologije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 111 str.
- Adams W.W., Demmig-Adams B., Rosenstiel T.N., Brightwell A.K., Ebbert V. 2002. Photosynthesis and photoprotection in overwintering plants. *Plant Biology*, 4: 545–557
- Adams W.W., Demmig-Adams B., Verhoeven A.S., Barker D.H. 1995. 'Photoinhibition' during winter stress: Involvement of sustained xanthophyll cycle-dependent energy dissipation. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 261–276
- Alscher R.G., Donahue J.L., Cramer C.L. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiologia Plantarum*, 100: 224–233
- Alves P.L. da C.A., Magalhaes A.C.N., Barja P.R. 2002. The phenomenon of photoinhibition of photosynthesis and its importance in reforestation. *The Botanical Review*, 68, 2: 193–208
- Asada K. 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. V: Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. Foyer C.H., Mullineaux P.M. (Hrsg.). London, Tokyo, CRC Press Boca Raton, Ann Arbor: 77–104
- Brus R. 2008. Sto grmovnih vrst na Slovenskem. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 215 str.
- Caspi V., Malkin S., Marder J.B. 2000. Oxygen uptake photosensitized by disorganized chlorophyll in model systems and thylakoids of greening barley. *Photochemistry and Photobiology*, 71, 4: 441–446
- Critchley C., Russel A.W., Morrison B.C. 1999. Photoinhibition of photosystem II in leaves: Stress, acclimation, or regulatory response? V: Handbook of plant and crop stress. Pessarakis M. (ed.). 2nd edition. New York, Marcel Dekker: 545–554
- Dall'Osto L., Cazzaniga S., North H., Marion-Poll A., Bassi R. 2007. The *Arabidopsis aba4-1* mutant reveals a specific function for neoxanthin in protection against photooxidative stress. *Plant Cell*, 19, 3: 1048–1064
- Danyluk J., Perron A., Houde M., Limin A., Fowler B., Menhamou N., Sarhan F. 1998. Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell*, 10, 4: 623–638
- Demmig B., Winter K., Kruger A., Czygan F.C. 1988. Zeaxanthin and the heat dissipation of excess light energy in *Nerium oleander* exposed to a combination of high light and water stress. *Plant Physiology*, 87: 17–24
- Demmig-Adams B., Adams W. 1992. Operation of the xanthophyll cycle in higher plants in response to diurnal changes in incident sunlight. *Planta*, 186: 390–398
- Demmig-Adams B., Adams W. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, 1, 1: 21–26

- Demmig-Adams B., Adams W., Ebbert V., Logan B.A. 1999. Ecophysiology of the xanthophyll cycle. V: The photochemistry of carotenoids. Frank H.A., Young A.J., Britton G., Cogdell R.J. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 245–269
- Demmig-Adams B., Adams W.W. 1993. The xanthophyll cycle. V: Antioxidants in higher plants. Alscher R.G., Hess J.L. (eds.). Florida, Boca Raton, CRC Press, Inc: 92–110
- Fowler D.B., Limin A.E. 2002. Impact of cold stress. Saskatoon, Saskatchewan, Canada
<http://www.plantstress.com/Articles/index.asp> (julij, 2013)
- Foyer C.H. 1993. Ascorbic acid. V: Antioxidants in higher plants. Alscher R.G., Hess J.L. (eds.). Florida, Boca Raton, CRC Press, Inc: 32–58
- Frank H.A., Cua A., Chynwat V., Young A., Gosztola D., Wasielewski M.R. 1994. Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophylls cycle in photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 41: 389–395
- Glime J.M. 2007. Bryophyte ecology. Vol. 1. Physiological ecology. Michigan Technological University, International Association of Bryologists.
<http://www.bryoecol.mtu.edu/> (oktober, 2013)
- Goh C.-H., Ko S.-M., Koh S., Kim Y.-J., Bae H.-J. 2011. Photosynthesis and environments: Photoinhibition and repair mechanisms in plants. *Journal of Plant Biology*, 55: 93–101
- Havaux M., Niyogi K. K. 1999. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96: 8762–8767
- Ille M., Sekulić D. 2006. Mehanizmi i modeliranje oštećanja betona djelovanjem smrzanja. *Građevinar* 58, 1: 15–23
- Irving R.M., Lanphear F.O. 1967. The long day leaf as a source of cold hardiness inhibitor. *Plant Physiology*, 42: 1384–1388
- Johnson J.D. 2007. Lutein and zeaxanthin: An introduction to the chemistry of dietary carotenoids. Florida State University, Alumnus, Department of Chemistry, Tallahassee
<http://www.chm.bris.ac.uk/motm/carotenoids/jcarotenoids.htm> (avgust, 2013)
- Kazakevich Y., McNair H.M. 1996. Basic liquid chromatography
<http://hplc.chem.shu.edu/HPLC/index.html> (april, 2013)
- Larcher, W. 1994. Ökophysiologie der Pflanzen: Leben, Leistung und Stressbewältigung der Pflanzen in ihrer Umwelt. 5. Auflage. Stuttgart. Eugen Ulmer: 394 str.
- Lešnik M., Knapič V., Orešek E., Ravnikar M., Jerman Cvelbar J., Potočnik A., Seljak G., Miklavc J., Viršček Marn M. 2008. Obvladovanje hruševega ožiga (*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.*). Ljubljana, Fitosanitarna uporaba RS: 51str.
http://www.furs.si/svn/zvr/POSNadzori/Erwinia/strategija/OBVLADOVANJE_julij_08.pdf (april, 2013)
- Levitt J. 1980. Responses of plants to environmental stresses, Vol. 1. Chilling, freezing, and high temperature stresses. 2nd edition. New York, Academic Press: 497 str.
- Likar M., Regvar M. 2003. Praktikum fiziologije rastlin. Ljubljana, Študentska založba: 94 str.

- Lisjak M., Špoljarević M., Agić D., Andrić, L. 2009. Praktikum iz fiziologije bilja. Osijek, Poljoprivredni fakultet Osijek: 80 str.
http://www.pfos.hr/~dsego/ispitna_literatura/praktikum_fiziologije_bilja.pdf
(november, 2013)
- Long S.P., Humphries S. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45: 633–662
- Madhava Rao K.V. 2006. Introduction. V: *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Madhava Rao K.V., Raghavendra A.S., Janardhan Reddy K. (ed.). Dordrecht, Springer: 1–14
http://khamphamoi.com/public/files/news/1354062566_1422916166.pdf (junij, 2013)
- Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Ravnik V., Turk B., Vreš B., Frejman B., Strgulc-Krajšek S., Trčak B., Bačič T., Fischer M.A., Eler K., Surina B. 2007. Mala flora Slovenije: ključ za določanje praprotnic in semenk. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 967 str.
- McKersie B.D., Leshem Y.Y. 1994. Stress and stress coping in cultivated plants. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers: 256 str.
- Mehler A.H. 1951. Studies on reactions of illuminated chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 33: 65–77
- Meteo.si. Agencija Republike Slovenije za okolje.
<http://www.meteo.si/> (januar, 2013)
- Müller P., Li X.P., Niyogi K.K. 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*, 125:1558–1566
- Ottander C, Campbell D, Öquist G. 1995. Seasonal changes in photosystem II organization and pigment composition in *Pinus sylvestris*. *Planta*, 197:176–83
- Petauer T. 1993. Leksikon rastlinskih bogastev. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 684 str.
- Pfeifhofer H.W. 1989. Evidence of chlorophyll b and lack of lutein in *Neottia nidus-avis* plastids. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 184: 55–61
- Photosynthesis. Biobook.
<http://biobook.nerinxhs.org/bb/cells/photosynthesis.htm> (september, 2013)
- Prirodne boje. Vitis Varaždin.
<http://www.vitis.hr/proizvodi/prirodne-boje> (september, 2013)
- Rabinowitch E., Govindjee. 1969. Photosynthesis. New York, John Wiley and Sons Inc.: 273 str.
- Reddy A.R., Raghavendra A.S. 2006. Photooxidative stress. V: *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Madhava Rao K.V., Raghavendra A.S., Janardhan Reddy K. (ed.). Dordrecht, Springer: 156–186
http://khamphamoi.com/public/files/news/1354062566_1422916166.pdf
(september, 2013)

- Rmiki N.E., Schoefs B., Lemoine Y. 1998. Carotenoids and stress in higher plants and algae. V: Handbook of plant and crop stress. Pessaraki M. (ed.). 2nd edition. New York, Marcel Dekker: 465–482
- Sapozhnikov D.I., Kyzsovskaya T.A., Maevskaya A.N. 1957. Change in the interrelationship of the basis carotenoids of the plastids of green leaves under the action of light. Doklady Akademii Nauk SSSR, 113: 74–76
- Sarry J.E., Montillet J.L., Sauvaire Y., Havaux M. 1994. The protective function of the xanthophyll cycle in photosynthesis. FEBS Letters, 353: 147–150
- Schubert H., Kroon B.M.A., Matthijs H.C.P. 1994. In vivo manipulation of the xanthophyll cycle and the role of zeaxanthin in the protection against photodamage in the green alga *Chlorella pyrenoidosa*. Journal of Biological Chemistry, 269: 7267–7272
- Schulze E.D., Beck E., Müller-Hohenstein K. 2005. Plant ecology. Berlin/Heidelberg, Springer: 702 str.
- Selye H. 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. Nature, 138: 32
- Stocker O. 1947. Probleme der pflanzlichen Düreresistenz. Naturwissenschaften, 34: 362–371
- Šircelj H. 2001. Ugotavljanje sušnega stresa pri jablani (*Malus domestica* Borkh.) z izbranimi biokemičnimi in fiziološkimi kazalci: doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 164 str.
- Šircelj H. 2008. Karotnoidi v fotosineznem aparatu in odziv na stres. Acta agriculturae Slovenica, 91, 1: 271–282
- Taiz L., Zeiger E. 2010. Plant physiology. 5th edition. Sunderland, Sinauer Associates Inc.: 782 str.
- Vodnik D. 2001. Fiziologija rastlin: praktične vaje. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 56 str.
- Vukadinović V. 1999. Ekofiziologija. Interna skripta. Osijek, Poljoprivredni fakultet Osijek: 74 str.
<http://ishranabilja.com.hr/literatura/ekofiziologija/ekofiziologija.pdf> (junij, 2013)
- Xu D-Q., Shen Y-K. 1999. Light stress: Photoinhibition of photosynthesis in plants under natural conditions. V: Handbook of plant and crop stress. Pessaraki M. (ed.). 2nd edition. New York, Marcel Dekker: 483–497
- Yamamoto H.Y., Chang J.L., Aihara M.S. 1967. Light-induced interconversions of violaxanthin and zeaxanthin in New Zealand spinach-leaf segments. Biochimica et Biophysica Acta, 141: 342–347
- Yamamoto H.Y., Nakayama T.O.M., Chichester C.O. 1962. Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls. Archives of Biochemistry and Biophysics, 97: 168–173
- Young A., Britton G. 1990. Carotenoids in stress. V: Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms. Alscher R.G., Cumming J.R. (eds.). New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, Wiley-Liss: 87–112

ZAHVALA

Mentorici doc. dr. Heleni Šircelj se iskreno zahvaljujem za strokovno pomoč, koristne nasvete in veliko potrpežljivost pri nastanku diplomske naloge.

Hvala tudi prof. dr. Dominiku Vodniku in ostalim sodelavcem Katedre za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko.

Hvala družini, prijateljem in sodelavcem za vso podporo.