

# Udio fenolnih spojeva, antioksidacijska aktivnost i fotosintetska učinkovitost različitih dijelova vrčeva hibrida roda *Sarracenia* L.

---

Tušek, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:414272>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Martina Tušek

Udio fenolnih spojeva, antioksidacijska aktivnost i  
fotosintetska učinkovitost različitih dijelova vrčeva  
hibrida roda *Sarracenia* L.

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad izrađen u Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno - matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Mirte Tkalec, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno - matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja naziva magistre edukacije biologije i kemije.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Mirti Tkalec na pomoći i savjetima prilikom izrade mojeg diplomskog rada te pregledu cjelokupnog diplomskog rada.

Velika zahvala ide asistentici dr. sc. Mariji Babić na velikoj pomoći prilikom eksperimentalnog rada i pregledu mojeg diplomskog rada. Hvala na korisnim savjetima, strpljenju i velikoj želji da mi prenesete svoje znanje.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima i bratu koji su mi omogućili studiranje i bili mi potpora.

Hvala svim kolegama i prijateljima koji su me podržavali i bili uz mene za vrijeme studiranja.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno – matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Udio fenolnih spojeva, antioksidacijska aktivnost i fotosintetska učinkovitost različitih dijelova vrčeva hibrida roda *Sarracenia* L.**

Martina Tušek

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

*Sarracenia* je rod mesojednih biljaka rasprostranjen u području Sjeverne Amerike, a karakteriziraju ga listovi preobraženi u vrčeve pomoću kojih mame, hvataju i probavljaju kukce. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi kako se morfološki različiti hibridi međusobno razlikuju u udjelu fotosintetskih pigmenta i fenolnih spojeva, fotosintetskoj učinkovitosti i antioksidacijskoj aktivnosti u različitim dijelovima vrčeva. Analizirana su četiri dijela vrča - poklopac, „krilo“, gornji dio vrča i donji dio vrča morfološki različitih hibrida (A, B i C) iz roda *Sarracenia*. Utvrđeno je smanjenje fotosintetske učinkovitosti u poklopcu i gornjem dijelu vrča u odnosu na donji dio vrča i „krilo“, osobito kod hibrida B te povećana stopa fotosinteze kod hibrida C. Hibrid B također se isticao većim udjelom klorofila i karotenoida u „krilu“ i donjem dijelu vrča u odnosu na ostala dva hibrida. Utvrđena je povezanost udjela fenolnih spojeva i fotosintetskih pigmenta s obojenošću dijelova vrča te sudjelovanjem u privlačenju i hvatanju kukaca. Viši udio fenolnih spojeva, osobito antocijana, izmjeren je u poklopcu i gornjem dijelu vrča koji su crveni te više služe karnivoriji dok su udio klorofila i fotosintetska učinkovitost bili viši u „krilu“ koje je zelene boje te sudjeluje u fotosintezi. Antioksidacijska aktivnost je bila visoka u svim dijelovima vrčeva svih hibrida.

(57 stranica, 18 slika, 1 tablica, 53 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

**Ključne riječi:** mesojedne biljke, fotosinteza, fotosintetski pigmenti, *Sarracenia*, antocijani, flavonoidi, ukupni fenoli, obojenost vrčeva

**Voditelj:** Dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof.

**Neposredni voditelj:** Dr. sc. Marija Babić

**Ocjenitelji:** Dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof.

Dr. sc. Ines Radanović, izv. prof.

Dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek, izv. prof.

**Rad prihvaćen:** 3.9.2015.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### **Content of phenolic compounds, antioxidant activity and photosynthetic efficiency of different parts of pitchers of *Sarracenia L.* hybrids**

Martina Tušek

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

*Sarracenia* is a genus of carnivorous plants widespread in North America and is characterized by leaves modified into pitchers which lure, hunt and digest insects. The aim of this study was to analyze the variance in photosynthetic pigments and phenolic compounds as well as photosynthetic efficiency and antioxidant activity in different pitcher parts of morphologically different hybrids. Four parts of the pitcher – operculum, “wing”, pitcher upper part and pitcher lower part were analyzed in morphologically different *Sarracenia* hybrids (A, B and C). The photosynthetic efficiency of operculum and pitcher upper part was lower than in pitcher lower part and “wing”, especially in hybrid B. However, in hybrid C the higher rate of photosynthesis was noticed. Hybrid B also has higher amount of chlorophyll and carotenoids in “wing” and pitcher lower part compared to the other two hybrids. Results indicate that the amount of phenolic compounds and photosynthetic pigments is related to coloration of pitcher parts, and therefore participating in attraction and trapping insects. The higher amount of phenolic compounds, especially anthocyanin, is measured in operculum and pitcher upper part, which are red-colored and involved more in carnivory, while amount of chlorophyll and photosynthetic efficiency were higher in “wing” that is green-colored and is involved more in photosynthesis. Antioxidant activity was high in all pitcher parts of all three hybrids.

(57 pages, 18 figures, 1 tables, 53 references, original: in Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

**Key words:** carnivorous plants, photosynthesis, photosynthetic pigments, *Sarracenia*, anthocyanins, flavonoids, content of total phenols, pitcher coloration

**Supervisor:** Dr. Mirta Tkalec, Assoc.Prof.

**Assistant Supervisor:** Dr. sc. Marija Babić

**Reviewers:** Dr. Mirta Tkalec, Assoc. Prof.

Dr. Ines Radanović, Assoc. Prof.

Dr. Draganja Mrvoš-Sermek, Assoc. Prof.

**Thesis accepted:** 3.9.2015.

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| <b>1. UVOD</b> .....  | 1  |
| <b>1.1. ROD SARRACENIA</b> .....  | 2  |
| <b>1.2. FOTOSINTEZA</b> .....   | 6  |
| 1.2.1. Fotosintetski pigmenti .....   | 6  |
| 1.2.2. Tijek procesa fotosinteze .....  | 8  |
| 1.2.3. Čimbenici koji utječu na stopu fotosinteze .....                                       | 9  |
| 1.2.4. Fluorescencija klorofila <i>a</i> .....  | 10 |
| 1.2.5. Proces fotosinteze kod mesojednih biljaka .....  | 12 |
| <b>1.3. FENOLNI SPOJEVI</b> .....   | 13 |
| 1.3.1. Flavonoidi .....   | 13 |
| 1.3.2. Fenolni spojevi kao antioksidansi .....  | 15 |
| <b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....  | 16 |
| <b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....   | 17 |
| <b>3.1. BILJNI MATERIJAL</b> .....  | 17 |
| 3.1.1. Morfološke karakteristike istraživanih hibrida .....                                   | 17 |
| 3.1.2. Priprema biljnog materijala za izvođenje pokusa .....                                  | 20 |
| <b>3.2. METODE</b> .....  | 21 |
| 3.2.1. Mjerenje fluorescencije klorofila <i>a</i> u uvjetima <i>in vivo</i> .....             | 21 |
| 3.2.2. Priprema ekstrakata biljnog tkiva i određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenta ..... | 23 |
| 3.2.3. Priprema ekstrakata biljnog tkiva i određivanje udjela fenolnih spojeva .....          | 24 |
| 3.2.3.1. Određivanje udjela ukupnih fenola .....  | 24 |
| 3.2.3.2. Određivanje udjela flavonoida .....  | 24 |
| 3.2.3.3. Određivanje udjela antocijana .....  | 25 |
| 3.2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom .....                             | 25 |
| 3.2.5. Statistička obrada podataka .....  | 26 |
| <b>4. REZULTATI</b> .....   | 27 |
| <b>4.1. FLUORESCENCIJA KLOROFILA <i>a</i> U UVJETIMA <i>in vivo</i></b> .....                 | 28 |
| 4.1.1. Omjer varijabilne i maksimalne fluorescencije ( $F_v/F_m$ ) .....                      | 28 |
| 4.1.2. Omjer varijabilne i minimalne fluorescencije ( $F_v/F_0$ ) .....                       | 29 |
| 4.1.3. Stopa smanjenja fluorescencije klorofila ( $R_{Fd}$ ) .....                            | 30 |
| <b>4.2. UDIO FOTOSINTETSKIH PIGMENATA U TKIVU</b> .....                                       | 32 |
| 4.2.1. Udio klorofila <i>a</i> .....  | 32 |
| 4.2.2. Udio klorofila <i>b</i> .....  | 33 |

|   |    |
|---|----|
| 4.2.3. Udio ukupnih karotenoida.....                                    | 34 |
| 4.3. UDIO FENOLNIH SPOJEVA U TKIVU .....                                | 36 |
| 4.3.1. Udio ukupnih fenola .....  | 36 |
| 4.3.2. Udio flavonoida .....  | 37 |
| 4.3.3. Udio antocijana .....  | 38 |
| 4.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST U TKIVU.....                            | 40 |
| 5. RASPRAVA.....  | 41 |
| 5.1. FOTOSINTETSKA UČINKOVITOST .....                                   | 42 |
| 5.1.1. Omjer varijabilne i maksimalne fluorescencije ( $F_v/F_m$ )..... | 42 |
| 5.1.2. Omjer varijabilne i minimalne fluorescencije ( $F_v/F_0$ ).....  | 43 |
| 5.1.3. Stopa smanjenja fluorescencije klorofila ( $R_{Fd}$ ).....       | 44 |
| 5.2. UDIO FOTOSINTETSKIH PIGMENATA.....                                 | 46 |
| 5.3. UDIO FENOLNIH SPOJEVA .....  | 48 |
| 5.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST.....                                    | 51 |
| 6. ZAKLJUČAK.....   | 52 |
| 7. LITERATURA .....   | 53 |



## 1. UVOD

Rod *Sarracenia* je jedan od najpoznatijih rodova unutar skupine mesojednih biljaka koji raste u području Sjeverne Amerike (D`Amato, 2013). Mesojedne biljke rastu uglavnom na vlažnim i močvarnim staništima niske pH-vrijednosti u kojima je količina hranjivih tvari ograničena (Rice, 2006). Naime, u vlažnim i močvarnim staništima prevladava mahovina roda *Sphagnum* koja tvori slojeve i izgrađuje vlažna močvarna staništa koja su kisela. Budući da je pH-vrijednost staništa prilično niska, uginuli organizmi se ne raspadaju nego prelaze u treset bez oslobađanja korisnih hranjivih tvari (Rice, 2006). Mesojedne biljke prilagodile su se životu na takvim staništima tako što su razvile određene prilagodbe koje im omogućuju nadoknađivanje nedostatka mineralnih tvari, uglavnom dušika i fosfora (Adamec, 2010). Ove biljke razvile su strategiju lova sitnih životinja, najčešće kukaca, pomoću zamki razvijenih iz listova te probavljanja ulovljenog plijena iz kojeg potom dobivaju potrebne mineralne tvari (Bruzese i sur., 2010).

Zamke mogu biti različitog oblika i različitih mehanizama lova, međutim sve imaju jednu namjenu, a to je uspješno uloviti plijen. Mesojedne biljke se dijele u dvije skupine ovisno o tome posjeduju li aktivne ili pasivne zamke. Aktivne zamke se aktivno gibaju, kada je to potrebno, s ciljem da ulove željeni plijen dok se pasivne zamke ne kreću aktivno nego kukac samostalno upada u zamku (Johnson, 2007). Osim što se zamke kod mesojednih biljaka dijele na aktivne i pasivne, one mogu biti različitih oblika: vrčaste zamke, zamke nalik vršama za jastoge, zamke s iznenadnim zatvaranjem, zamke koje imaju sposobnost „usisati“ plijen, ljepljive zamke i brojne druge (Rice, 2006). Jedan od vrlo čestih tipova zamki su zamke u obliku vrčeva koje su prisutne i kod vrsta iz roda *Sarracenia* (Rice, 2006).

Mesojedne biljke obuhvaćaju ukupno 650 vrsta unutar 16 rodova (Adamec, 2010). Neki od poznatijih i raširenijih rodova su rodovi s vrčastim zamkama kao što su *Sarracenia*, *Darlingtonia*, *Heliophora*, tropski rod *Nepenthes* i rod *Cephalotus*, raširen u području Australije. Od rodova koji imaju aktivne zamke poznatiji je rod *Drosera*, raširen po cijelome svijetu, rod *Pinguicula* od kojeg većina vrsta obitava u području sjeverne hemisfere te rod *Utricularia* i rod *Dionea* (D`Amato, 2013).

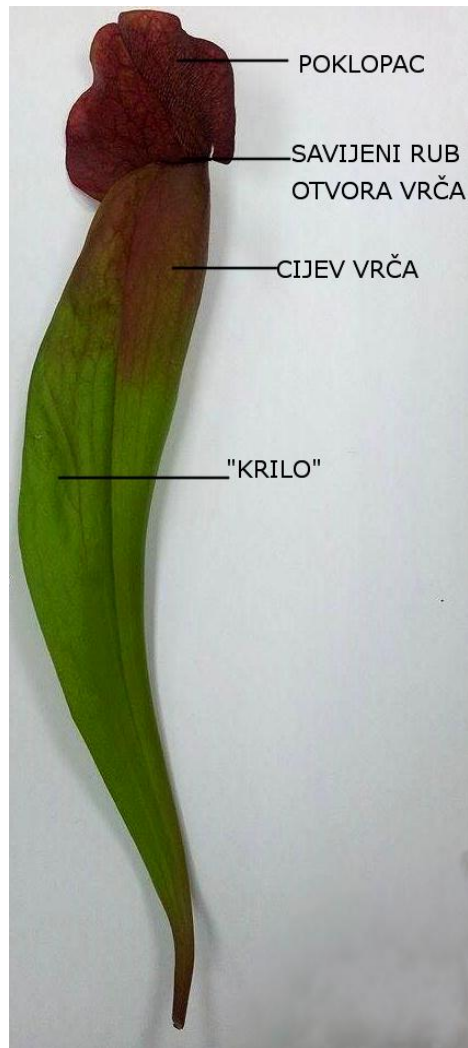
## 1.1. ROD *SARRACENIA*

*Sarracenia* (cjevološke) je rod mesojednih biljaka za koji se pretpostavlja da obuhvaća 8 vrsta rasprostranjenih u jugoistočnom dijelu Sjedinjenih Američkih Država, a jedna vrsta rasprostranjena je sjevernije uz obalu i u velikom dijelu Kanade. Rod *Sarracenia* obuhvaća vrste *Sarracenia purpurea*, *Sarracenia flava*, *Sarracenia rubra*, *Sarracenia alata*, *Sarracenia leucophylla*, *Sarracenia oreophylla*, *Sarracenia minor* i *Sarracenia psittacina*. Rod je nazvan prema botaničaru M. Sarrazinu. On je žive primjerke vrsta iz spomenutog roda poslao J. P. de Tournefortu koji je vrstu opisao. Linné je prihvatio ime roda 1731. godine (D'Amato, 2013). Rod *Sarracenia* spominje 1793. godine i William Bartram koji je, osim što se divio ljepotama vrsta iz ovog roda, prvi posumnjao u mogućnost njihove karnovorije. Darwin također spominje rod *Sarracenia* u svojem djelu „Insectivorous Plants“ te govori da se na temelju istraživanja J. H. Mellichampa i W. M. Canbyja može sumnjati u karnivoriju rodova *Sarracenia* i *Darlingtonia*. Tek je u 19. stoljeću Joseph Mellichamp dokazao karnivoriju kod roda *Sarracenia* (Slack, 2000).

Vrste roda *Sarracenia* su trajnice s listovima preobraženim u vrčeve. Listovi u obliku vrčeva u stvari su pasivne zamke koje kod većine vrsta prežive jednu godinu. Plijen su najčešće kukci koji su obično privučeni bojom vrčeva i nektarom kojega izlučuju žlijezde smještene u pojedinim dijelovima vrčeva (Rice, 2006).

Boja vrčeva kod roda *Sarracenia* ima važnu ulogu u privlačenju kukaca, a različite vrste karakterizira i različita obojenost vrčeva. Naime, boja vrčeva kod roda *Sarracenia* može biti od žute pa sve do crvene boje. Većina vrsta sadrži crvene, žute ili ljubičaste listove ili su pak listovi pokriveni crvenim prugama ili mrljama. Listovi vrsta koje karakteriziraju crvene pruge ili crvene mrlje obično imaju žutu podlogu s manje ili više izraženom pigmentacijom (Sheridan, 1997).

Na vrču kod vrsta iz roda *Sarracenia* može se prepoznati nekoliko dijelova (Slika 1). Dijelovi vrča su cijev vrča koja počinje otvorom vrča, savijeni rub otvora vrča koji izlučuje nektar, poklopac, vrat poklopca i krilo (Rice, 2006).



**Slika 1.** Dijelovi vrča hibrida iz roda *Sarracenia* (autor fotografije: Martina Tušek).

Sama cijev vrča može se podijeliti u 4 dijela koja imaju različite karakteristike, a pomažu u primamljivanju i lovu. Spomenute 4 zone nazvane su „Hookerove zone“ (Slika 2), a ime su dobile po istraživaču Sir Josephu D. Hookeru koji ih je prvi otkrio i prepoznao u vrste *Sarracenia purpurea* L. dok je kasnije F. E. Lloyd uočio i petu zonu (Slack, 2000).



**Slika 2.** Podjela cijevi vrča u 5 „Hookerovih zona“ kod vrste *Sarracenia purpurea* L. 1-prva zona, 2-druga zona, 3-treća zona, 4-četvrta zona, 5-peta zona (autor fotografije: Barry Rice, Preuzeto s: <http://www.sarracenia.com/faq/faq5521.html>).

Prva zona obuhvaća poklopac vrča koji je pokriven brojnim žlijezdama za izlučivanje nektara između kojih su razmještene oštre dlake usmjerene prema dolje (Slack, 2000). Uglavnom ima ulogu u privlačenju kukaca i omogućavanju ulova plijena. Druga zona ima ulogu u uvođenju plijena u cijev vrča na način da se u ovome području vrča izlučuje nektar i skliska voštana tvar koja onemogućava kukcima da se odupru padu u vrč. Obuhvaća savijeni rub otvora vrča, ali se djelomično proteže i u početni dio cijevi vrča. Treća zona obuhvaća područje ispunjeno žlijezdama za izlučivanje probavnih enzima. Treća zona prelazi u četvrtu zonu koja je potopljena tekućinom kojom je ispunjen vrč, u njoj se odvija probava i apsorpcija mineralnih tvari, a nedostatak kutikule u ovoj zoni poboljšava apsorpciju. Peta zona, koja je otkrivena samo kod vrsta *Sarracenia purpurea* L. i *Sarracenia rosea* Naczi, Case i R. Case, vrlo je slična trećoj zoni, međutim njezina funkcija nije još u potpunosti poznata. Iako se vrste međusobno malo razlikuju u mehanizmu lovljenja plijena, svrha svake zamke je uloviti plijen koji će potom u unutrašnjosti vrča uginuti i biti razgrađen. Razgradnja plijena može se odvijati pod utjecajem enzima koje izlučuje sama biljka ili pak djelovanjem zajednice organizama (mikroorganizama, malih beskralješnjaka) koji se nalaze u vrču. U zadnje vrijeme sve se više pažnje posvećuje četvrtoj zoni u kojoj su pronađeni različiti organizmi kao što su ličinke kukaca, različite gljive, alge i određene vrste beskralješnjaka koji svojim djelovanjem pospješuju oslobađanje hranjivih tvari iz plijena (Glenn i Bodri, 2012).

Da bi plijen upao u cijev vrča u kojoj dolazi do razgradnje i apsorpcije hranjivih tvari, najprije mora doći do otvora vrča. Otvor vrča okružen je savijenim rubom koji izlučuje nektar koji privlači kukce (Rice, 2006). Natkriven je poklopcem koji je često crveno obojen i pokriven brojnim žlijezdama čime privlači plijen (Slika 1). Uloga poklopca je i sprječavanje ulijevanja kišnice u cijev vrča kako vrč ne bi postao pretežak, a služi i kao „platforma“ za slijetanje kukaca. Da bi poklopac mogao vršiti svoju funkciju, neophodan je vrat poklopca koji omogućuje održavanje poklopca u gotovo uspravnom položaju iznad otvora vrča. Vrčevi kod vrsta roda *Sarracenia* sadrže i „krilo“ čija je uloga uglavnom u dovođenju kukaca do otvora vrča (Slika 1). Kukci najčešće prate pružanje žlijezda koje izlučuju nektar duž cijelog vrča, a djelomično i uz „krilo“. Dolaskom do skliskog djela vrča pokrivenog nektarom, kukac se ne može oduprijeti i upada u zamku (D`Amato, 2013).

Cjevolovke nastanjuju pretežito vlažna i kisela staništa u kojima nema dovoljno mineralnih tvari. Uglavnom preferiraju sunčana staništa, a ne sjenovita mjesta ispod drveća (D`Amato, 2013).

Biljke započinju svoj razvoj iz sjemenki koje se raznose uglavnom u jesen dok u kasnu zimu ili rano proljeće već počinju klijati. Krajem prve godine njihovog rasta počinju se razvijati mali vrčevi veličine 2,5 - 5 centimetara, a da bi biljka postigla zrelost mora proći oko 8 godina. Većina biljaka razvija razgranati rizom iz kojeg se razvija nekoliko točaka rasta. Godišnji ciklus biljke započinju nakon zimske dormancije, a većina biljaka sezonu počinje cvjetanjem. Prvi vrč razvit će se ubrzo nakon prvog cvjetnog pupa. Međutim, biljka će procvjetati prije otvaranja bilo kojeg vrča kako oprašivači, najčešće pčele, ne bi upali u zamke. Vrste roda *Sarracenia* cvjetaju u različito vrijeme u razdoblju između kasne veljače i svibnja. Na taj se način nastoji izbjeći unakrsno oprašivanje između vrsta. Međutim, ponekad se događa da vrste cvjetaju u isto vrijeme što dovodi do nastajanja hibridnih potomaka koji su raspršeni ili pak do nastajanja „roja“ odnosno velikog broja hibrida (D`Amato, 2013).

Veliki broj hibrida unutar roda *Sarracenia* javlja se u divljini, ali i u uzgoju. Dobivanje hibrida je važna aktivnost u hortikulturi koja se provodi s ciljem dobivanja jedinki željenih značajki, a posebno s ciljem razvitka otpornosti na različite klimatske uvjete (Rice, 2006). Križanjem vrsta unutar roda *Sarracenia* 50% potomaka izgledom će biti „intermedijer“ roditeljskih jedinki, dok će ostatak ličiti više na jednu ili drugu roditeljsku jedinku. Za stvaranje hibrida karakteristična je velika varijabilnost. Jedan od najpoznatijih i najčešćih hibrida je onaj dobiven križanjem vrsta *Sarracenia purpurea* i *Sarracenia flava*. Spomenuti

hibrid nije najučinkovitiji u hvatanju kukaca, a vrč se često može prevrnuti ukoliko se napuni kišnicom. Poznat je i hibrid nastao križanjem vrsta *Sarracenia purpurea* i *Sarracenia leucophylla* koji je vrlo sličan prethodno spomenutom hibridu, međutim poklopac je izraženije obojen sa čestim bijelim, ružičastim i crvenim mrljama i šarama. Osim spomenutih, postoji još veliki broj hibrida roda *Sarracenia* s različitim jedinstvenim karakteristikama (D`Amato, 2013).

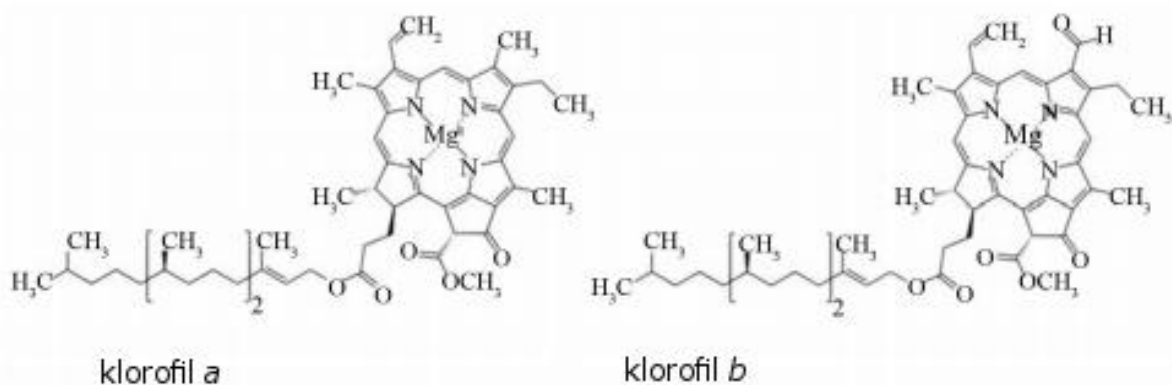
## 1.2. FOTOSINTEZA

Jedan od najvažnijih procesa koji omogućuje život svim živim bićima je proces fotosinteze. Proces fotosinteze je višestruko reguliran, a sastoji se od velikog broja koraka: primanje Sunčeve svjetlosne energije, prijenos ekscitacijske energije, pretvorba svjetlosne energije u kemijsku, prijenos elektrona od molekule vode do  $\text{NADP}^+$  i nastanak NADPH, stvaranje molekula ATP-a te serija enzimskih reakcija koje omogućuju asimilaciju ugljičnog dioksida i sintezu ugljikohidrata (Tanaka i Makino, 2009).

### 1.2.1. Fotosintetski pigmenti

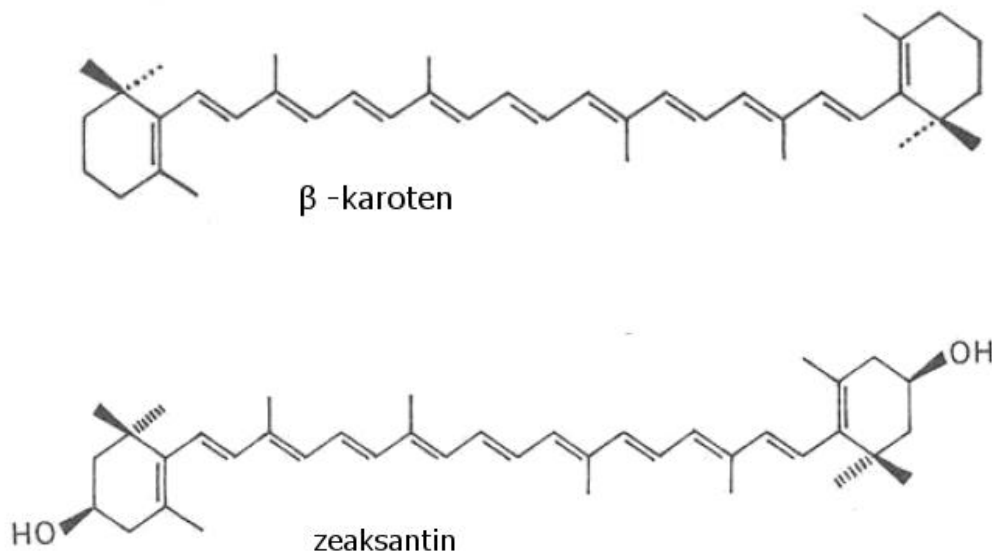
Fotosintetski pigmenti mogu se podijeliti u dvije skupine, klorofile i karotenoide. U klorofile se ubrajaju klorofil *a* i klorofil *b* dok karotenoidi obuhvaćaju karotene i ksantofile.

Klorofil se sastoji od porfirinskog prstena koji je građen od četiri pirolska prstena međusobno povezana metilnim skupinama. U sastav klorofila ulazi i atom magnezija koji se nalazi u središtu porfirinskog prstena, a na porfirinski prsten se nastavlja lipofilni fitolski rep. Klorofil *a* se od klorofila *b* razlikuje po tome što na drugom pirolskom prstenu sadrži metilnu skupinu dok klorofil *b* na spomenutom mjestu sadrži aldehidnu skupinu (Slika 3). Klorofil *a* apsorbira svjetlost valnih duljina 430 nm i 662 nm, a klorofil *b* svjetlost valnih duljina 453 nm i 642 nm (Pevalek-Kozlina, 2003).



**Slika 3.** Građa molekule klorofila *a* i klorofila *b* (preuzeto i prilagođeno iz članka: Hsu i sur., 2013).

Karotenoidi su linearni ugljikovodici koji se sastoje od izoprenskih jedinica, a sadrže veliki broj konjugiranih dvostrukih veza (Slika 4). To su lipofilni spojevi koji apsorbiraju valne duljine od 380 do 550 nm (plavi dio spektra), a obuhvaćaju dvije skupine spojeva: karotene i ksantofile. Karoteni su obično narančaste boje dok su ksantofili žute boje (Goodwin, 1980).



**Slika 4.** Građa  $\beta$ -karotena i ksantofila zeaksantina (preuzeto i prilagođeno iz knjige: Goodwin, 1980).

Klorofili i karotenoidi služe kao antenske molekule koje primaju svjetlosnu energiju u procesu fotosinteze te je prenose na druge molekule pigmentata sve do klorofila *a* u reakcijskom središtu (Karlson, 1993). Jedino klorofil *a* sudjeluje u fotokemiji odnosno nalazi se u reakcijskom središtu gdje dolazi do razdvajanja naboja i svjetlosna energija se pretvara u kemijsku. Klorofil *b* i karotenoidi se nazivaju pomoćnim pigmentima zato što oni proširuju spektar valnih duljina za fotosntezu (Pevalek-Kozlina, 2003).

Osim što služe kao antenske molekule, karotenoidi imaju važnu ulogu u zaštiti biljke od svjetlosnog stresa. Naime, pod utjecajem visokog intenziteta svjetlosti dolazi do stvaranja singletnog kisika koji može izazvati oštećenja kod biljaka. Karotenoidi predstavljaju prvu liniju obrane na način da „gase“ tripletni kisik, a istovremeno „gase“ tripletni klorofil koji je glavni izvor singletnog kisika u lišću biljaka (Ramel i sur., 2012).

### **1.2.2. Tijek procesa fotosinteze**

Proces fotosinteze sastoji se od svjetlosnih (primarnih) reakcija i sekundarnih reakcija (Calvinov ciklus) fotosinteze. Svjetlosne reakcije se odvijaju u tilakoidnim membranama kloroplasta dok se sekundarne reakcije odvijaju u stromi kloroplasta. Da bi se proces fotosinteze mogao normalno odvijati, neophodno je postojanje antenskih molekula, klorofila i karotenoida, koje primaju svjetlosnu energiju od Sunca. Antenske molekule smještene su u dva fotosistema (fotosistem I i fotosistem II). Uloga antenskih molekula je primanje svjetlosne energije i njezino prenošenje do klorofila *a* koji se nalazi u reakcijskom središtu fotosistema. Primanjem svjetlosne energije klorofil *a* se oksidira, a izbačeni elektron se prenosi na specijaliziranu molekulu, primarni akceptor elektrona. Elektron, koji je izbačen djelovanjem svjetlosti iz fotosistema II (P680), nadomještava se elektronom iz vode, a pri tome se oslobađa molekula kisika. Izbačeni elektron se transportnim lancem elektrona prenosi do fotosistema I (P700) iz kojega se prethodno osvjetljavanjem oslobađaju elektroni koji reduciraju  $\text{NADP}^+$  do NADPH. Transportni lanac elektrona istovremeno dovodi i do stvaranja gradijenta protona koji pokreće ATP-azu pri čemu dolazi do stvaranja molekula ATP-a (Pevalek-Kozlina, 2003).

Za odvijanje sekundarnih reakcija fotosinteze (Calvinov ciklus) neophodan je enzim RUBISCO (ribuloza-1,5-difosfat-karboksilaza-oksigenaza) smješten u stromi pomoću kojeg se fiksira ugljikov dioksid. Calvinov ciklus može se podijeliti u nekoliko dijelova: fiksacija



ugljkovog dioksida (karboksilacija akceptora CO<sub>2</sub> odnosno ribuloze-1,5-difosfat), redukcija karboksilne kiseline do ugljikohidrata, koja obuhvaća nastajanje 1,3-difosfoglicerata iz 3-fosfoglicerata te potom nastajanje gliceraldehid-3-fosfata redukcijom 1,3-difosfoglicerata, i regeneracija akceptora CO<sub>2</sub>. Molekule NADPH i ATP koje nastaju u svjetlosnim reakcijama fotosinteze sadrže pohranjenu kemijsku energiju te se koriste u Calvinovom ciklusu kao izvor energije i reducirajuće snage (Pevalek-Kozlina, 2003).

Asimilacija ugljikovog dioksida može se odvijati na tri načina. Većina biljaka ima C3 put asimilacije ugljikovog dioksida pri čemu nastaje primarni produkt asimilacije CO<sub>2</sub> s 3 ugljikova atoma. Osim C3 puta asimilacije ugljikovog dioksida postoje još dva tipa, a to su C4 i CAM put asimilacije ugljikovog dioksida. Kod C3 biljaka fiksacija CO<sub>2</sub> se odvija u mezofilnim stanicama, a pri visokim koncentracijama kisika stvara se manje šećera zbog odvijanja fotorespiracije (Bueckert, 2013).

### **1.2.3. Čimbenici koji utječu na stopu fotosinteze**

Učinkovitost procesa fotosinteze može se iskazati stopom fotosinteze koja se može izmjeriti na temelju izmijenjenog ugljikovog dioksida ili akumulacije suhe mase po jedinici lisne površine. Na stopu fotosinteze utječu brojni okolišni i unutarnji čimbenici. Od okolišnih čimbenika, snažan utjecaj ima svjetlost, koncentracija ugljikovog dioksida, strujanje zraka, temperatura i drugi. Od unutarnjih faktora, utjecaj ima otvorenost i broj puči, sadržaj klorofila, način asimilacije ugljikovog dioksida i drugo (Neales i Incoll, 1968).

Na stopu fotosinteze snažno utječe kvaliteta i količina svjetlosti. Povećanjem intenziteta osvjtljenja brzina fotosinteze raste, ali do određene granice. Nakon toga zadržava se na konstantnoj vrijednosti pa kažemo da je fotosintetski aparat zasićen svjetlošću. Kod biljaka koje žive u sjenovitom području (biljke sjene) zasićenje se pojavljuje brže u odnosu na biljke koje su izložene suncu (biljke sunca). Kod biljaka sunca zasićenje se pojavljuje tek pri vrlo visokom intenzitetu osvjtljenja budući da su građom i funkcijom fotosintetskog aparata prilagođene višim intenzitetima svjetlosti. Ukoliko je intenzitet svjetlosti previsok, može doći do oštećenja fotosintetskog aparata pri čemu intenzitet fotosinteze počinje padati. Biljke sunca i sjene međusobno se razlikuju po građi lista na način da listovi sunca imaju višeslojni palisadni parenhim koji omogućuje iskorištavanje velikog dijela upadne svjetlosti dok listovi sjene imaju jednoslojni palisadni parenhim (Pevalek-Kozlina, 2003). Također, listovi sjene

sadrže više ukupnog klorofila po reakcijskom središtu, više klorofila *b* u odnosu na klorofil *a* te su tanji od listova sunca. Sve prilagodbe koje imaju biljke sjene javile su se s ciljem što boljeg iskorištavanja dostupne količine svjetlosti. Upravo zato je odnos reakcijskih središta fotosistema II i I kod biljaka sjene 3:1 dok je kod biljaka sunca omjer 2:1. S druge strane, listovi sunca sadrže više enzima RUBISCO i topivih proteina, imaju visoku točku svjetlosne kompenzacije, stoga i visoku stopu fotosinteze i stopu disanja (Pevalek-Kozlina, 2003).

Stopa fotosinteze ovisi i o koncentraciji ugljikovog dioksida koji iz atmosfere mora difundirati do karboksilacijskog mjesta enzima RUBISCO. Većina biljaka s porastom koncentracije ugljikovog dioksida pokazuje i veću stopu fotosinteze, međutim ta stopa fotosinteze raste do određene konstantne vrijednosti. CO<sub>2</sub> za ulazak koristi puči, dakle isti put za difuziju kao vodena para. Primanje CO<sub>2</sub> će ovisiti o uvjetima relativne vlage pri čemu je u uvjetima visoke relativne vlage difuzijski gradijent koji tjera otpuštanje vode puno veći od onog koji tjera primanje CO<sub>2</sub> (Pevalek-Kozlina, 2003).

#### **1.2.4. Fluorescencija klorofila *a***

Sunčeva svjetlost apsorbirana pomoću molekula klorofila može se iskoristiti na tri načina. Apsorbirana svjetlost jednim dijelom se iskorištava za proces fotosinteze dok se višak energije oslobađa u obliku topline ili u obliku svjetlosti (fluorescencije). Spomenuta tri procesa su međusobno povezana tako da se mjerenjem fluorescencije klorofila *a* mogu dobiti informacije o uspješnosti procesa fotosinteze (Maxwell i Johnson, 2000).

U funkcionalnom fotosintetskom aparatu 95% apsorbirane energije se prenosi na susjedne molekule pigmenta i koristi za fotokemijske reakcije fotosinteze. Međutim u stresnim uvjetima efikasnost procesa fotosinteze se može smanjiti pa će se veći udio energije oslobađati fluorescencijom što se pomoću osjetljivog uređaja može izmjeriti (Maxwell i Johnson, 2000). Fluorescentna svjetlost ima veću valnu duljinu od apsorbirane svjetlosti pa je stoga i maksimum fluorescencijskog spektra klorofila pri nešto većoj valnoj duljini od maksimuma apsorpcijskog spektra. Fluorescencijski spektar klorofila ima maksimum u crvenom području (Vidaković- Cifrek i sur., 2013).

Mjerenje fluorescencije klorofila *a in vivo* temelji se na izlaganju lista svjetlosti određene valne duljine i mjerenju reemitirane svjetlosti pri većim valnim duljinama (Maxwell i Johnson, 2000). Proces mjerenja fluorescencije klorofila provodi se uz pomoć fluorimetra te

se na taj način mogu izračunati različiti fluorescencijski parametri koji ukazuju na učinkovitost fotosistema II (Lichtenthaler i Babani, 2004). Izmjerena fluorescencija u listovima potječe od fotosistema II. Utvrđeno je da se prilikom prenošenja fotosintetskog materijala iz tame na svjetlo može uočiti porast fluorescencije klorofila, kao posljedica redukcije akceptora elektrona (odnosno plastokinona) u transportnom lancu elektrona. Naime, jednom kada fotosistem II apsorbira svjetlo i plastokinon se reducira, on ne može primiti slijedeći elektron sve dok se nalazi u reduciranom stanju budući da se u kratkom vremenu ne stigne pokrenuti transportni lanac elektrona i ostali fotosintetski procesi. Za vrijeme spomenutog perioda može se reći da je reakcijski centar zatvoren, a suvišak apsorbirane energije oslobađa se u obliku fluorescencije (Maxwell i Johnson, 2000). Potom dolazi do aktivacije transportnog lanca elektrona koji od reduciranih akceptora elektrona preuzima elektron, otvara se reakcijski centar fotosistema II te intenzitet fluorescencije počinje padati sve do ravnotežnog stanja (Lichtenthaler i sur., 2005).

Jedan od parametara fluorescencije je stopa smanjenja fluorescencije klorofila ( $R_{Fd}$ ). Ovaj parametar je direktno povezan sa samom stopom fotosinteze te se koristi kao indikator fiksacije ugljikovog dioksida (Lichtenthaler i Babani, 2004). Određuje se mjerenjem inducirane fluorescencije klorofila *a*, a definira se kao stopa smanjenja fluorescencije klorofila do stabilnog stanja,  $F_s$ , nakon početka procesa fotosinteze.  $R_{Fd}$  parametar ukazuje na moguće modifikacije u sastavu fotosintetskih pigmenata i fotosintetske aktivnosti za vrijeme vegetacijskog razdoblja i razdoblja stresa. Ovaj parametar zapravo pokazuje je li potencijalni fotosintetski kapacitet, izražen preko parametra  $F_v/F_0$ , dostignut i održan za vrijeme stabilnog stanja u kojem se ustalila određena stopa prijenosa elektrona i dinamika odvijanja Calvinovog ciklusa, ovisno o uvjetima u kojima je rasla biljka. Naziva se još i indeks vitalnosti fotosintetskog aparata zato što ukazuje na funkcionalnost cjelokupnog procesa fotosinteze od primanja svjetlosne energije pa do fiksacije ugljikovog dioksida nakon uspostavljanja stabilnog stanja (Lichtenthaler i Babani, 2004).

U sklopu ovog diplomskog rada korištena je metoda mjerenja fluorescencije klorofila metodom prema Lichtenthaleru i Babaniju (2004) kako bi se utvrdila uspješnost procesa fotosinteze u različitim dijelovima vrča.

### 1.2.5. Proces fotosinteze kod mesojednih biljaka

Još od Darwinovih istraživanja pretpostavljalo se da mesojedne biljke nedostatka mineralnih tvari nadoknađuju hvatanjem i probavljanjem kukaca. Usprkos tome, nije se znalo da spomenuta skupina biljaka može preživjeti i bez hvatanja plijena. Brojna istraživanja pokazala su da hvatanje plijena uz pomoć zamki daje određenu prednost mesojednim biljkama i to u smislu povećanja biomase, povećanja koncentracije hranjivih tvari i povećanja kapaciteta razmnožavanja. Međutim, manje je poznato kako nadoknađivanje nedostatka hranjivih tvari na spomenuti način utječe na provođenje procesa fotosinteze kod mesojednih biljaka (Bruzzese i sur., 2010). Utvrđeno je da hvatanje plijena dovodi do povećanih količina minerala dušika i fosfora, ali da se ugljikohidrati stvaraju isključivo procesom fotosinteze (Adamec, 2010).

Mesojedne biljke naseljavaju pretežito vlažna sunčana staništa i svjetlost je važan i ograničavajući čimbenik koji utječe na njihov opstanak (Zamora i sur., 1998). Utvrđeno je kako mesojedne biljke trpe energetski gubitak vezan uz dostupnost potrebnih mineralnih tvari, iskorištavanje mineralnih tvari i proces fotosinteze u odnosu na biljke koje nisu mesojedne, a žive na sličnim staništima (Ellison, 2006). Mesojedne biljke pripadaju C3 tipu biljaka prema fiksaciji ugljikovog dioksida i utvrđeno je da nedostatak hranjivih tvari i kvaliteta staništa može utjecati na proces fotosinteze. Dok je rast biljaka pozitivno povezan s dostupnošću plijena, stopa fotosinteze je u nekim slučajevima povećana, a u nekim slučajevima smanjena. Općenito je kod mesojednih biljaka utvrđena niža stopa fotosinteze u odnosu na ostale biljke. Niža stopa fotosinteze utvrđena je u listovima mesojednih biljaka te osobito u zamkama u odnosu na listove što se povezuje s velikim troškom karnivorije (Bruzzese i sur., 2010). Spomenuta skupina biljaka ima veliki energetski trošak zbog ulaganja energije u zamke čime se povećava metabolička aktivnost, a smanjuje stopa fotosinteze. Sve zamke mesojednih biljaka, bez obzira na strukturu i funkciju, sadrže različite žlijezde zbog čega su zamke obično metabolički više aktivne u odnosu na tkivo listova. Trošak karnivorije ovisi i o tipu zamke. Mesojedne biljke koje imaju složenije zamke imat će veći energetski gubitak zbog ulaganja u održavanje zamki. Kod roda *Nepenthes* utvrđeno je da listovi, koji nisu uključeni u probavu, imaju veću fotosintetsku učinkovitost u odnosu na vrčeve (Adamec, 2010). Dakle, vrčevi roda *Nepenthes* sadrže ujedno i manji udio klorofila *a* i *b* u odnosu na listove (Pavlovič, 2011). Osim što sadrže veliki broj žlijezda, vrčevi roda *Nepenthes* mogu imati povećane količine pigmenta kao što je na primjer antocijan koji im daju različitu obojenost, što uz miris tekućine iz unutrašnjosti vrča privlači kukce (Moran i sur., 1999). Kod roda *Sarracenia* je

plijen obično privučen crvenim žilama koje karakteriziraju određene dijelove vrča. Spomenute crvene žile produciraju nektar i reflektiraju UV-svjetlo pa stoga dijelovi vrča pokriveni crvenim žilama više privlače kukce (Newell i Nastase, 1998). Kod roda *Darlingtonia* utvrđeno je da cijev vrča, koja je ujedno i zelena, sadrži znatno viši udio klorofila u odnosu na poklopac koji sadrži veliki broj aureola i nije zelen. Također, dijelovi vrča kod roda *Darlingtonia*, kao što su poklopac i „privjesak“, koji sadrže ekstrafloralne nektarije, sadrže ujedno i niži udio fotosintetskih pigmenta (Ellison i Farnsworth, 2005). Istraživanja kod roda *Sarracenia* su pokazala da neke vrste pokazuju značajnu razliku u metaboličkoj aktivnosti „krila“ vrča i stijenki vrča što ukazuje i na razliku u fotosintetskoj aktivnosti (Adamec, 2010).

### **1.3. FENOLNI SPOJEVI**

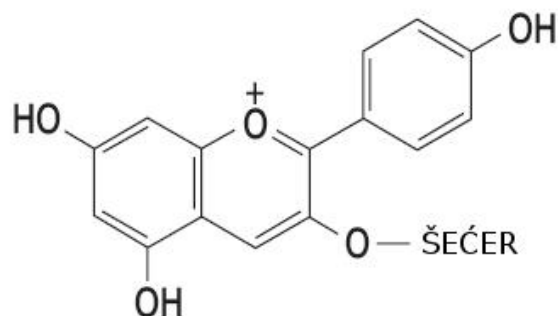
Fenolni spojevi se ubrajaju u skupinu sekundarnih metabolita kod biljaka. To je heterogena skupina spojeva koja sadrži fenolnu skupinu, a mogu biti topivi u organskim otapalima ili u vodi. Uloge fenolnih spojeva su različite, od obrane od herbivora, mehaničke potpore, privlačenja oprašivača i rasprostranjivača sjemenki do redukcije rasta susjednih biljaka. U fenolne spojeve ubrajaju se tanini, jednostavni fenilpropani, flavonoidi i drugi spojevi. U svojem istraživanju proučavala sam razliku u udjelu fenolnih spojeva u različitim dijelovima vrčeva biljaka iz roda *Sarracenia* L. te povezanost udjela fenolnih spojeva s obojenosti pojedinog dijela vrča i sudjelovanjem u privlačenju i hvatanju plijena.

#### **1.3.1. Flavonoidi**

Flavonoidi predstavljaju jednu od najbrojnijih skupina heterocikličkih spojeva kod biljaka, a gradi ih kostur od 15 ugljikovih atoma. Mogu imati različite uloge, a jedna od uloga flavonoida je obojenost cvjetova kod biljaka. Dije se na nekoliko skupina kao što su antocijani, flavonoli, flavoni i izoflavoni.

Antocijani su važni pigmenti odgovorni za obojenost cvjetova čime privlače kukce odnosno oprašivače. Crvena boja listova također potječe od prisutnosti antocijana, a otkrivena je i zaštitna uloga antocijana i drugih flavonoida u slučajevima djelovanja vanjskog stresa

(Jaakola i sur., 2004). Antocijani su po svojoj strukturi obojani flavonoidni glikozidi sa šećerom na položaju 3 (Slika 5).



**Slika 5.** Opća strukturna formula antocijanina (preuzeto i prilagođeno iz knjige: Pevalek-Kozlina, 2003).

Osim za crvenu boju, antocijani su odgovorni i za ružičastu i plavu boju. Dolaze u različitim oblicima koji se međusobno razlikuju po supstituentu vezanom na jedan prsten, a prema tome razlikuju se i po boji. Na obojenost antocijana utječe broj hidroksilnih i metoksilnih skupina vezanih na prsten, pH-vrijednost vakuole, prisutnost nekih metala te prisutnost flavona i flavonskih kopigmenata (Pevalek-Kozlina, 2003).

U vrstama roda *Sarracenia* za obojenost vrčeva i cvjetova odgovorne su tri vrste pigmentata: klorofili, karotenoidi i flavonoidi. Crvena boja vrčeva i cvjetova kod vrsta roda *Sarracenia* može se pripisati prisustvu flavonoida i to ponajprije antocijana. Intenzivna crvena obojenost vrčeva omogućuje uspješno primamljivanje kukaca (Sheridan i Griesbach, 2001).

Flavoni i flavonoli su skupina flavonoida koji apsorbiraju svjetlost kraćih valnih duljina od antocijana (Pevalek-Kozlina, 2003). Nalaze se u cvjetovima, listovima i stabljikama, a utvrđeno je da imaju važnu ulogu u zaštiti biljaka od oštećenja pod utjecajem UV-zračenja (Jaakola i sur., 2004).

### 1.3.2. Fenolni spojevi kao antioksidansi

Dugo se smatralo kako su jedine uloge sekundarnih biljnih metabolita privlačenje oprašivača i odbijanje herbivora. Novijim istraživanjima je utvrđeno kako fenolni spojevi mogu imati važnu ulogu u zaštiti biljaka od oštećenja pod utjecajem visokog intenziteta vidljive i UV svjetlosti. Kada količina apsorbirane energije premaši količinu energije iskorištene za proces fotosinteze i one koja se može iskoristiti u različitim procesima zaštite od svjetlosti, dolazi do stvaranja visoko reaktivnih kemijskih vrsta kao što su singletni kisik, tripletni klorofil i hidroksilni radikali. Spomenute kemijske vrste mogu dovesti do različitih oštećenja i oksidacije važnih biomolekula. Kako bi se zaštitile od stvaranja takvih kemijskih vrsta, biljke stvaraju antioksidativne molekule koje mogu „ugasiti“ reaktivne kemijske vrste. Utvrđeno je kako veliki broj fenolnih spojeva ima ulogu u „gašenju“ reaktivnih kemijskih vrsta. Flavonoidi su važni antioksidansi, a antioksidacijska aktivnost utvrđena je i za antocijane. Utvrđeno je kako koncentracija fenolnih spojeva raste u uvjetima visokog intenziteta osvjjetljenja i nedostatka hranjivih tvari (Close i McArthur, 2002).

Jednostavna, brza i dovoljno osjetljiva metoda za mjerenje antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima biljaka je DPPH metoda. Spomenuta metoda temelji se na korištenju slobodnog radikala 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hidrata (DPPH). U prisutnosti nekog antioksidansa, DPPH radikal se reducira odnosno prima još jedan elektron. U etanolnoj otopini DPPH daje ljubičasto obojenje koje u prisutnosti antioksidansa polako nestaje (Mensor i sur., 2001). Vrijednost apsorbancije počinje padati što se može izmjeriti spektrofotometrom. U zadnje vrijeme uočena je povezanost udjela flavonoida i fenolnih spojeva s antioksidacijskom aktivnosti pa će tako biljke s višim udjelom flavonoida i fenolnih spojeva imati i višu antioksidacijsku aktivnost (Pourmorad i sur., 2006).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Vrste roda *Sarracenia* ubrajaju se u skupinu mesojednih biljaka koje žive u staništima u kojima nema dovoljno potrebnih mineralnih tvari. Kako bi nadoknadile taj nedostatak, ove su biljke razvile odgovarajuće prilagodbe odnosno zamke pomoću kojih love kukce i nadoknađuju nedostatak dušika i fosfora. Budući da su kod biljaka iz roda *Sarracenia* listovi preobraženi u zamke te obavljaju dvostruku funkciju - fotosintezu i probavljanje plijena, stopa fotosinteze, udio fenolnih spojeva i fotosintetskih pigmenata te antioksidacijska aktivnost neće biti jednaka u svim dijelovima vrčeva. Također, unutar roda *Sarracenia* javlja se veliki broj hibrida koji se međusobno razlikuju morfološki i fiziološki.

Ovim istraživanjem pokušat ću utvrditi kako se morfološki različiti hibridi iz roda *Sarracenia*, međusobno razlikuju u udjelu fotosintetskih pigmenata i fenolnih spojeva, fotosintetskoj učinkovitosti i antioksidacijskoj aktivnosti u različitim dijelovima vrčeva. Također, dobivene rezultate pokušat ću povezati s obojanošću pojedinih dijelova vrčeva i njihovim sudjelovanjem u hvatanju kukaca. Pretpostavka je da će dijelovi vrča različitih hibrida iz roda *Sarracenia* koji su crveno obojani i sudjeluju u privlačenju i hvatanju kukaca imati nižu stopu fotosinteze i manji udio fotosintetskih pigmenata, a veći udio fenolnih spojeva. Antioksidacijska aktivnost trebala bi biti veća u dijelovima vrča i onim hibridima u kojima je utvrđen viši udio fenolnih spojeva i flavonoida.



### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. BILJNI MATERIJAL**

Istraživanje sam provela na tri morfološki različita hibrida iz roda *Sarracenia* L. Za svaku vrstu hibrida uzela sam tri reprezentativna i morfološki slična vrča s kojih sam potom uzimala uzorke za provođenje pokusa.

Korištene biljke uzgajane su u čistom tresetu u plastičnim posudama. Svakodnevno su zalijevane vodom bez minerala, odnosno kišnicom i vodom dobivenom postupkom reverzne osmoze, tako da je na dnu posude uvijek bila prisutna određena količina vode u visini od 2-3 centimetara. Biljke su tijekom proljeća i ljeta bile smještene na balkonu gdje je za vrijeme podneva prosječno fotosintetski aktivno zračenje i UV-zračenje iznosilo oko 2000  $\mu\text{mol}$  fotona  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  odnosno  $30 \text{ W m}^{-2}$ . Prosječne dnevne i noćne temperature zraka iznosile su  $26 \pm 3$  °C. Biljke su za istraživanje uzete krajem 9. mjeseca 2014. godine.

##### **3.1.1. Morfološke karakteristike istraživanih hibrida**

Tri istraživana hibrida međusobno su se razlikovali po morfološkim karakteristikama. Tri različita hibrida nazvala sam hibrid A, hibrid B i hibrid C. Za svaki hibrid uzela sam tri primjerka vrča koje sam potom koristila za provođenje pokusa. Svakome primjerku vrča koji je pripadao istom hibridu pridružila sam brojevnu oznaku 1, 2 i 3 kako bih ih prilikom mjerenja lakše raspoznavala. Pripadnici iste vrste hibrida trebali su biti približno jednaki što sam nastojala uvažiti prilikom odabira vrčeva, međutim, sitne razlike koje sam uočila na vrčevima unutar istog hibrida omogućile su mi da ih lakše raspoznam.

Kod svih hibrida može se uočiti da su poklopac i cijev vrča u gornjem dijelu crveno obojani, dok su „krilo“ i donji dio cijevi vrča većinom zeleno obojani. Također, na poklopcu se može uočiti središnja žila koja je crvene boje. Osim središnje žile na poklopcu, mogu se uočiti žile po cijelom poklopcu i u gornjem dijelu vrča. Hibridi se međusobno razlikuju po obliku poklopca, intenzitetu crvenog obojenja poklopca i gornjeg dijela vrča, veličini i drugim karakteristikama.

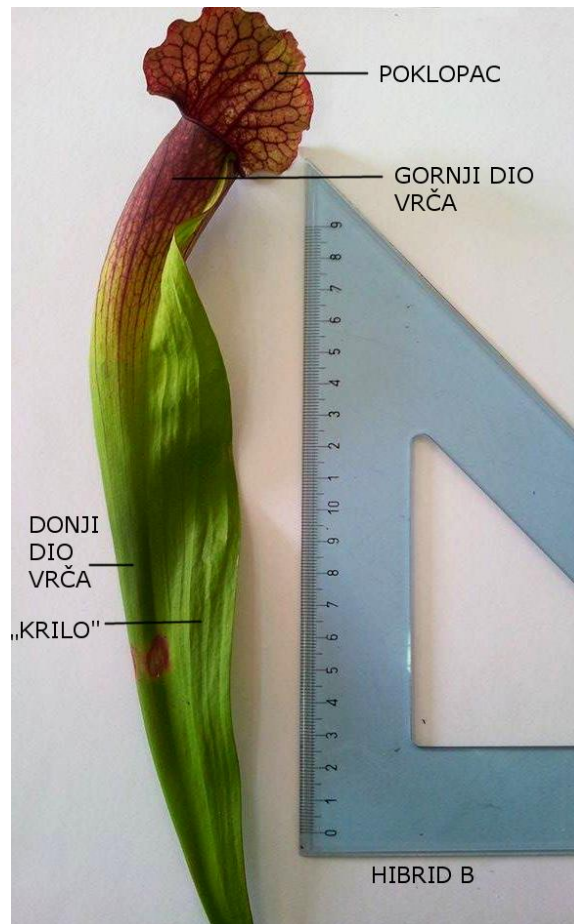
Hibrid A ističe se u odnosu na hibride B i C drugačijom građom i bojom poklopca. Naime, kod hibrida A lijevi i desni rub poklopca se nalaze vrlo blizu jedan drugome i gotovo se spajaju. Upravo zato je otvor vrča kod sva tri primjerka hibrida A puno manji u odnosu na

otvor druga dva hibrida. Također, poklopac i gornji dio vrča hibrida A imaju izražene crvene žile između kojih se mogu uočiti dijelovi koji su puno svjetliji, gotovo bijeli, u odnosu na hibride B i C. Spuštajući se od gornjeg dijela vrča prema nižim dijelovima vrča, crvene žile više nisu izražene tako da je veći dio vrča u donjem dijelu i „kriilo“ gotovo potpuno zeleno (Slika 6). Veličinom se hibrid A (oko 28 cm) nalazi između hibrida B (oko 35 cm) i C (oko 23 cm).



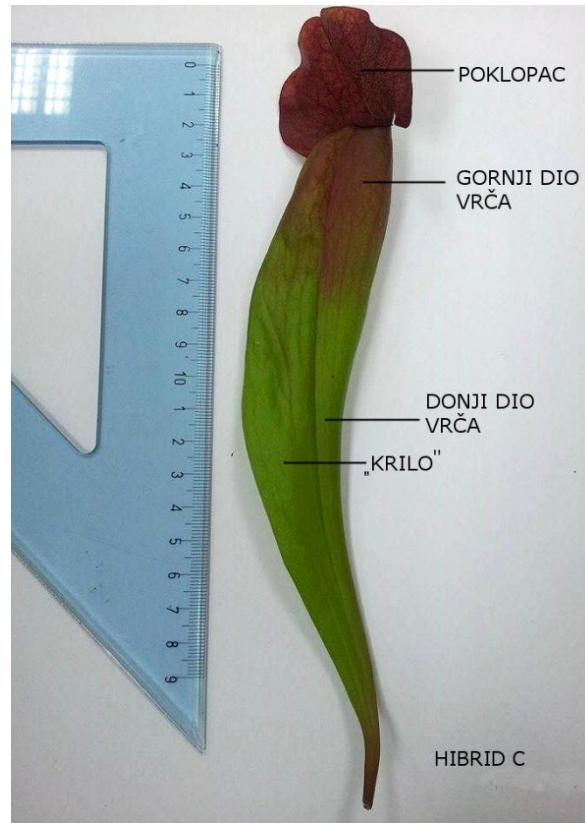
**Slika 6.** Hibrid A analiziran u pokusu (autor fotografije: Martina Tušek).

Hibrid B ističe se u odnosu na hibride A i C svojom duljinom (oko 35 cm). Poklopac mu je lepezastog oblika i valovitih rubova čime se razlikuje od poklopca hibrida A i C. Također, kod poklopca hibrida B jasno se uočavaju crvene žile koje se protežu i u gornji dio vrča. Prostori između žila su crveno-zelene boje, a ne bijele kao kod hibrida A. Donji dio vrča i „kriilo“ su zelene boje, a „kriilo“ je znatno veće u odnosu na isti dio vrča kod hibrida A i C (Slika 7).



**Slika 7.** Hibrid B analiziran u pokusu (autor fotografije: Martina Tušek).

Hibrid C najmanji je od analiziranih hibrida (oko 23 cm), a osim veličinom razlikuje se i po drugim karakteristikama. Poklopac je izraženije crvene boje u odnosu na poklopac kod ostala dva hibrida. Također, rubovi poklopca hibrida C manje su valoviti u odnosu na hibrid B. Crvena boja se osim na gornji dio vrča proteže i prema nižim dijelovima vrča što nije bio slučaj kod hibrida A i hibrida B. „Kriilo“ je gotovo potpuno zelene boje i šire u odnosu na „kriilo“ hibrida A, ali manje u odnosu na „kriilo“ hibrida B (Slika 8).



**Slika 8.** Hibrid C analiziran u pokusu (autor fotografije: Martina Tušek).

### 3.1.2. Priprema biljnog materijala za izvođenje pokusa

Mjerenja sam provodila na četiri različita dijela vrča hibrida iz roda *Sarracenia* L. Kako bih se lakše snalazila prilikom mjerenja i kako bih dobivene rezultate mogla klasificirati i analizirati, četiri različita dijela vrča nazvala sam: poklopac (P), gornji dio vrča (G), donji dio vrča (D) i krilo (K). Poklopac se odnosi na uzorke biljnog tkiva koje sam uzela s područja poklopca, gornji i donji dio vrča odnose se na uzorke biljnog tkiva koje sam uzela s odgovarajućeg dijela cijevi vrča, a krilo se odnosi na uzorke biljnog tkiva koje sam uzela s područja „krila“.

Kako bih dobila odgovarajuće biljno tkivo za mjerenja bilo je potrebno s vrčeva uzeti uzorke. Uzorci biljnog tkiva korišteni za mjerenja bili su površine oko  $2 \text{ cm}^2$  i mase 50 mg. S poklopca sam uzela četiri uzorka biljnog tkiva na način da sam s lijeve i desne strane glavne žile izrezala podjednaki dio poklopca te potom ispod odrezanog dijela poklopca uzela još dva uzorka. S poklopca sam uzela četiri uzorka biljnog tkiva i svaki je bio otprilike jednake veličine. Prije uzimanja uzoraka s cijevi vrča, vrč sam prethodno otvorila zarezivanjem

okomite ravne linije na vrču u blizini „krila“ vrča. Uzorke biljnog tkiva gornjeg dijela vrča uzela sam s lijeve i desne strane glavne žile na udaljenosti od 1 cm od gornjeg ruba vrča. Dodatna dva uzorka izrezala sam neposredno ispod prethodno uzetih uzoraka. Četiri uzorka s područja donjeg dijela vrča uzela sam na udaljenosti od 2-3 cm iznad i ispod polovice duljine biljke (prethodno sam ravnalom označila polovicu duljine biljke). „Krilo“ sam uzorkovala otprilike u istome području gdje sam uzela uzorke s područja donjeg dijela vrča.

Sa svakog dijela vrča uzela sam ukupno četiri uzorka spomenute površine, od čega sam jedan uzorak svakog dijela vrča odmah koristila za mjerenje fluorescencije klorofila *a* u uvjetima *in vivo* i kasnije za određivanje udjela fotosintetskih pigmenata. Preostale uzorke sam spremila u aluminijsku foliju i stavila na -20 °C dok ih nisam koristila za određivanje udjela fenolnih spojeva. Dakle, uzela sam po dva uzorka biljnog tkiva s tri različita vrča svakog od analiziranih hibrida za određivanje fenolnih spojeva i fotosintetskih pigmenata što znači da sam analizirala ukupno šest uzoraka za svaki od četiri analiziranih dijelova vrča. Za mjerenje fluorescencije klorofila *a* u uvjetima *in vivo* koristila sam tri uzorka.

## **3.2. METODE**

Na različitim hibridima iz roda *Sarracenia* određivala sam fotosintetsku učinkovitost, udio fotosintetskih pigmenata i fenolnih spojeva te antioksidacijsku aktivnost. Za određivanje fotosintetske učinkovitosti koristila sam metodu mjerenja fluorescencije klorofila u uvjetima *in vivo*, a za mjerenje antioksidacijske aktivnosti koristila sam DPPH metodu.

### **3.2.1. Mjerenje fluorescencije klorofila *a* u uvjetima *in vivo***

Fluorescenciju klorofila *a* u uvjetima *in vivo* mjerila sam pomoću Qubit sustava (Kanada) metodom koju su opisali Lichtenthaler i Babani (2004) te Lichtenthaler i sur. (2005). Prije nego što sam krenula s mjerenjem fluorescencije klorofila, uzorak vrča, kojemu sam trebala mjeriti fluorescenciju, sam stavila na vlažan filter papir u tamu na 20 minuta. U tami, molekule plastokinona su sve u oksidiranom stanju, a suradnja dva fotosistema je smanjena. Nakon ponovnog izlaganja svjetlu potrebno je nekoliko minuta kako bi se ponovno uspostavila suradnja između dva fotosistema.

Mjerenje fluorescencije klorofila započela sam postavljanjem uzorka dijela vrča na stalak fluorimetra, na filter papir prethodno navlažen destiliranom vodom, te izlaganjem uzorka crvenoj svjetlosti niskog intenziteta ( $1 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) pri čemu je zabilježena minimalna vrijednost fluorescencije  $F_0$ . Potom sam uzorak izložila bijeloj svjetlosti visokog intenziteta (aktinično svjetlo,  $1\ 500 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) u trajanju od 5 minuta. Primjenom bijele svjetlosti fluorescencija klorofila je porasla od  $F_0$  do  $F_m$  (maksimalna vrijednost fluorescencije) te u slijedećih 5 minuta padala do ravnotežnog stanja fluorescencije  $F_s$ . Nakon 5 minuta isključila sam bijelo osvjetljenje nakon čega je list ostao osvijetljen crvenom svjetlošću čime je ciklus mjerenja za jedan uzorak završen. Po završetku mjerenja fluorescencije, isti je uzorak iskorišten za mjerenje udjela fotosintetskih pigmenta.

Fluorimetar je povezan s računalom na kojem se uz pomoć programa Logger Pro 3.2 bilježe rezultati u obliku grafičkih prikaza u kojima se na apscisu nanosi vrijeme, a na ordinatu relativni intenzitet fluorescencije. Podatke koje sam očitavala iz dobivenih grafičkih prikaza u koordinatnom sustavu bili su  $F_0$ ,  $F_m$  i  $F_s$ , a iz iščitanih podataka računala sam parametre  $R_{Fd}$ ,  $F_v/F_m$  i  $F_v/F_0$  uz pomoć programa Microsoft Excel 2007 prema formulama 1, 2 i 3 (Lichtenthaler i sur., 2005):

#### OMJER VARIJABILNE I MAKSIMALNE FLUORESCENCIJE ( $F_v/F_m$ )

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m \quad (\text{FORMULA 1})$$

#### OMJER VARIJABILNE I MINIMALNE FLUORESCENCIJE ( $F_v/F_0$ )

$$F_v/F_0 = (F_m - F_0)/F_0 \quad (\text{FORMULA 2})$$

#### STOPA SMANJENJA FLUORESCENCIJE KLOROFILA ( $R_{Fd}$ )

$$R_{Fd} = (F_m - F_s)/F_s \quad (\text{FORMULA 3})$$

gdje je:

- $F_0$ - minimalna vrijednost fluorescencije
- $F_m$ - maksimalna vrijednost fluorescencije
- $F_v$  - varijabilna fluorescencija
- $F_s$ - fluorescencija stabilnog stanja

### 3.2.2. Priprema ekstrakata biljnog tkiva i određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenta

U ohlađenom tarioniku homogenirala sam 50 mg biljnog tkiva u 0,75 mL ohlađenog 80%-tnog acetona uz dodatak male količine kalcijevog karbonata. Ekstrakcija biljnog tkiva treba se provoditi u ohlađenom tarioniku uz pomoć ohlađenog tučka kako bi se spriječilo isparavanje acetona koji je hlapljiva tekućina te kako bi se smanjilo raspadanje pigmenta. Dobiveni homogenat prelila sam u ohlađenu i označenu smeđu plastičnu epruvetu. Potom sam u tarionik dodala još 0,75 mL ohlađenog 80%-tnog acetona kako bih ostatak homogenata isprala te na taj način spriječila gubitak biljnog tkiva za analizu. Isprani sadržaj sam prelila u istu ohlađenu plastičnu epruvetu u koju sam stavila prvu količinu homogenata. Dobiveni uzorak sam centrifugirala 10 minuta pri 5 000 g i temperaturi +4 °C. Dobiveni supernatant sam prelila u čiste i označene plastične epruvete i nadopunila acetonom do 1,0 mL. Slijedilo je mjerenje apsorbancije UV/VIS spektrofotometrom Specord (Analytik Jena) na tri valne duljine: 470 nm, 646 nm i 663 nm.

Maseni udio fotosintetskih pigmenta određivala sam prema formulama 4, 5 i 6 (Lichtenthaler, 1987, Wellburn, 1994):

SADRŽAJ KLOOROFILA *a* :

$$c_a = \frac{12,21 \times A_{663} - 2,81 \times A_{646}}{l \times 1000 \times m} \times V \quad (\text{FORMULA 4})$$

SADRŽAJ KLOOROFILA *b* :

$$c_b = \frac{20,13 \times A_{646} - 5,03 \times A_{663}}{l \times 1000 \times m} \times V \quad (\text{FORMULA 5})$$

SADRŽAJ UKUPNIH KAROTENOIDA :

$$c_k = \frac{(1000 \times A_{470} - 3,27 \times c_a - 104 \times c_b) / 198}{l \times 1000 \times m} \times V \quad (\text{FORMULA 6})$$

gdje je:

$A_x$  – apsorbancija uzoraka pri određenim valnim duljinama

$V$  – volumen uzorka (mL)

$l$  – duljina optičkog puta (1 cm)

$m$  – masa uzorka (g)

$c_a$  – udio klorofila *a* (mg/g svježe tvari)

$c_b$  – udio klorofila *b* (mg/g svježe tvari)

$c_k$  – udio ukupnih karotenoida (mg/g svježe tvari)

### 3.2.3. Priprema ekstrakata biljnog tkiva i određivanje udjela fenolnih spojeva

Ekstrakte biljnog tkiva za određivanje sadržaja fenolnih spojeva počela sam pripremati tako da sam u ohlađeni tarionik stavila 50 mg biljnog tkiva i homogenirala u 0,75 mL 50%-tnog etanola. Kada je tkivo bilo dovoljno homogenizirano prelila sam sadržaj iz tarionika u epruvete za centrifugiranje. Ostatke tkiva u tarioniku isprala sam uz pomoć 0,75 mL 50%-tnog etanola te prelila u istu označenu epruvetu. Dobiveni je homogenat inkubiran u trajanju od 30 minuta na temperaturi od 60 °C u termobloku te nakon toga ohlađen (2 minute u zamrzivaču). Slijedeći korak bilo je centrifugiranje u trajanju od 10 minuta na 12 000 g. Dobivene supernatante prelila sam u graduirane epruvete od 1,5 mL te nadopunila 50%-tnim etanolom do volumena od 1,5 mL.

#### 3.2.3.1. Određivanje udjela ukupnih fenola

U epruvetu za centrifugiranje pipetirala sam 1580 µL destilirane vode, 20 µL ekstrakta biljnog tkiva i 100 µL *Folin–Ciocalteu* reagensa. Slijepa proba pripremi se na isti način kao i uzorci koji sadržavaju ekstrakt samo što se kod pripreme slijepa probe umjesto 20 µL ekstrakta dodaje 20 µL 50%-tnog etanola. Sve uzorke sam zatim kratko promućkala na mućkalici, a potom sam u uzorke dodala 300 µL 1,88 M otopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Uzorke sam nakon toga ponovno promućkala uz pomoć mućkalice te potom inkubirala 60 minuta na 45 °C pri čemu su uzorci lagano poplavili. Uzorke sam prelila u kivete i izmjerila apsorbanciju uz pomoć UV/VIS spektrofotometra pri 765 nm (Singleton i sur., 1999). Kako bih izračunala udio ukupnih fenola u uzorcima biljnog tkiva, pripremila sam baždarnu krivulju galne kiseline. Udio ukupnih fenola izrazila sam u miligramima ekvivalenata galne kiseline po gramu svježe mase tkiva (mg E-GA g<sup>-1</sup><sub>sv.t.</sub>).

#### 3.2.3.2. Određivanje udjela flavonoida

Udio flavonoida određivala sam na način da sam u plastične epruvete za centrifugiranje pipetirala 100 µL ekstrakta, 20 µL 10%-tnog (w/v) AlCl<sub>3</sub> (pripremljenog u destiliranoj vodi), 500 µL 1 M otopine kalijevog acetata i 380 µL destilirane vode. Slijepu probu pripremila sam na način kao i uzorke samo što sam umjesto 100 µL ekstrakta biljnog tkiva dodala 100 µL 50%-tnog etanola. Uslijedilo je miješanje uzoraka pomoću mućkalice, a zatim inkubacija u trajanju od 30 minuta pri sobnoj temperaturi (24 °C). Na kraju sam



izmjerila apsorbanciju uz pomoć UV/VIS spektrofotometra pri 420 nm (Pourmorad i sur., 2006). Udio flavonoida izračunala sam uz pomoć baždarne krivulje kvercetina i izrazila u miligramima ekvivalenata kvercetina po gramu svježe mase tkiva ( $\text{mg E-K g}^{-1}_{\text{sv.t.}}$ ).

### 3.2.3.3. *Određivanje udjela antocijana*

Udio antocijana u biljnom tkivu određivala sam na način da sam u 500  $\mu\text{L}$  ekstrakta biljnog tkiva dodala 500  $\mu\text{L}$  50%-tnog etanola i 84  $\mu\text{l}$  37%-tne klorovodične kiseline. Slijepu probu sam pripremila na isti način kao i uzorke, međutim umjesto 500  $\mu\text{l}$  ekstrakta dodala sam 500  $\mu\text{l}$  50%-tnog etanola. Pripremljene uzorke sam promiješala na mućkalici nakon čega je uslijedila inkubacija na temperaturi od 60 °C u trajanju od 30 minuta u termobloku. Nakon inkubacije sam uzorke prelila u kivete i izmjerila apsorbanciju pri 537 nm pomoću UV/VIS spektrofotometra (Paiva i sur., 2003). Koncentraciju antocijana odredila sam koristeći molarnu masu 449,2  $\text{g mol}^{-1}$  i ekstinkcijski koeficijent cijanidin-3-glukozida,  $\epsilon = 34300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Dobivene rezultate izrazila sam u miligramima ekvivalenata cijanidin-3-glukozida po gramu svježe mase tkiva ( $\text{mg E-C3G g}^{-1}_{\text{sv.t.}}$ ).

### 3.2.4. **Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom**

Antioksidacijsku aktivnost DPPH metodom određivala sam prema metodi Awah i sur. (2012). Prilikom određivanja antioksidacijske aktivnosti uzoraka biljnog tkiva, u epruvete za centrifugiranje sam dodala 950  $\mu\text{L}$  0,1 mM otopine DPPH u etanolu i 50  $\mu\text{L}$  ekstrakta svježeg biljnog tkiva. Za slijepu probu koristila sam 950  $\mu\text{L}$  96%-tnog etanola i 50  $\mu\text{L}$  50%-tnog etanola. Bilo je potrebno pripremiti i kontrolni  $A_0$  uzorak koji će dati maksimalno obojenje otopine DPPH u etanolu pa sam u epruvetu za centrifugiranje pipetirala 950  $\mu\text{L}$  0,1 mM otopine DPPH u etanolu i 50  $\mu\text{L}$  50%-tnog etanola. Uzorke sam promiješala na mućkalici i ostavila stajati 30 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim sam mjerila apsorbanciju uzoraka uz pomoć UV/VIS spektrofotometra pri 517 nm. Iz dobivenih vrijednosti apsorbancije izračunala sam vrijednost  $\Delta A$  za nepoznati uzorak biljnog tkiva koji se dobiva oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije kontrolnog uzorka  $A_0$  da bih konačno došla do vrijednosti % inhibicije DPPH radikala.

Postotak inhibicije DPPH radikala računa se prema formuli :

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100 \quad (\text{FORMULA 7})$$

$A_0$  – apsorbancija kontrole (bez ekstrakta)

$A_t$  – apsorbancija uzorka (s ekstraktom)

### 3.2.5. Statistička obrada podataka

Rezultate sam iskazala kao srednju vrijednost  $\pm$  standardna pogreška od 6 replika za određivanje udjela fenolnih spojeva, fotosintetskih pigmenata i antioksidacijske aktivnosti. Rezultate sam iskazala kao srednju vrijednost  $\pm$  standardna pogreška od 3 replike za određivanje fotosintetske učinkovitosti. Prilikom obrade podataka koristila sam Microsoft Excel 2007 te za usporedbu dobivenih rezultata računalni program Statistica 7.1 (StatSoft Inc., SAD). Statistički značajne razlike između uzoraka odredila sam korištenjem faktorijalne i jednosmjerne analize varijance (ANOVA) uz primjenu post hoc Tukey's HSD testa. Statistički značajnim smatrala sam razlike na razini  $p \leq 0,05$ .

## 4. REZULTATI

Istraživanje sam provela na tri morfološki različita hibrida roda *Sarracenia* pri čemu sam za svaki hibrid uzela tri primjerka vrča, a na svakom primjerku četiri različita dijela vrča. Analizirala sam poklopac, „krilo“, gornji dio vrča i donji dio vrča. Za svaki dio vrča uzela sam četiri uzorka biljnog tkiva, od čega sam dva uzorka koristila za određivanje udjela fenolnih spojeva, a dva za određivanje fotosintetskih pigmenta. Jedan uzeti uzorak sa svakog dijela vrča koristila sam prije svega za mjerenje fluorescencije klorofila *a* u uvjetima *in vivo* te korišteni uzorak kasnije upotrijebila za određivanje fotosintetskih pigmenta. Fluorescenciju klorofila *a* mjerila sam kako bih odredila fotosintetsku učinkovitost različitih dijelova vrčeva različitih hibrida i kako bih uočila javljaju li se razlike u fotosintetskoj učinkovitosti različitih dijelova vrčeva različitih hibrida. Nakon toga sam pripremila ekstrakte tkiva različitih dijelova vrčeva te pomoću spektrofotometra izmjerila i zatim izračunala masene udjele fotosintetskih pigmenta, ukupnih fenola, antocijana i flavonoida te antioksidacijsku aktivnost.

Ovim istraživanjem željela sam utvrditi postoje li razlike u istraživanim pokazateljima u tri morfološki različita hibrida iz roda *Sarracenia*, te postoji li razlika ovisno o analiziranim dijelovima vrčeva budući da su pojedini dijelovi različito obojani i imaju različitu ulogu u kranivoriji. Zato sam prvo provela faktorijalnu analizu varijance da vidim koji faktori imaju značajniji učinak na pojedine istraživane pokazatelje, a zatim sam provela detaljniju jednosmjernu analizu za svaki pojedini pokazatelj.

Faktorijalna analiza varijance je pokazala da vrsta hibrida značajno utječe na parametre  $F_v/F_m$ ,  $F_v/F_0$ ,  $R_{Fd}$ , udio klorofila *a* i *b*, udio ukupnih karotenoida te udio antocijana, a da ne utječe na udio ukupnih fenola, flavonoida i antioksidacijsku aktivnost. Koji dio vrča je analiziran utječe na sve pokazatelje osim na jedan pokazatelj i to  $R_{Fd}$  vrijednost. Interakcija ova dva faktora utječe na sve istraživane pokazatelje osim na antioksidacijsku aktivnost (Tablica 1).

**Tablica 1.** Faktorijalna analiza varijance napravljena za pojedine istraživane pokazatelje ( $F_v/F_m$  – omjer varijabilne i maksimalne fluorescencije,  $F_v/F_0$  – omjer varijabilne i minimalne fluorescencije,  $R_{Fd}$  – stopa smanjenja fluorescencije klorofila, Chla – klorofil *a*, Chlb – klorofil *b*, Car – karotenoidi, UF – ukupni fenoli, Fl – flavonoidi, Ant – antocijani, DPPH – antioksidacijska aktivnost) s obzirom na tip hibrida i dio vrča koji je analiziran odnosno njihovu kombinaciju. Faktori koji značajno utječu na pojedine istraživane parametre prikazani su masno otisnutim brojevima ( $p < 0,05$ ).

| Faktor            | $F_v/F_m$   | $F_v/F_0$   | $R_{Fd}$    | Chla        | Chlb        | Car         | UF          | Fl          | Ant         | DPPH        |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Hibrid            | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | 0,08        | 0,06        | <b>0,01</b> | 0,18        |
| Dio vrča          | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | 0,28        | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> |
| Hibrid × dio vrča | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,03</b> | <b>0,00</b> | 0,85        |

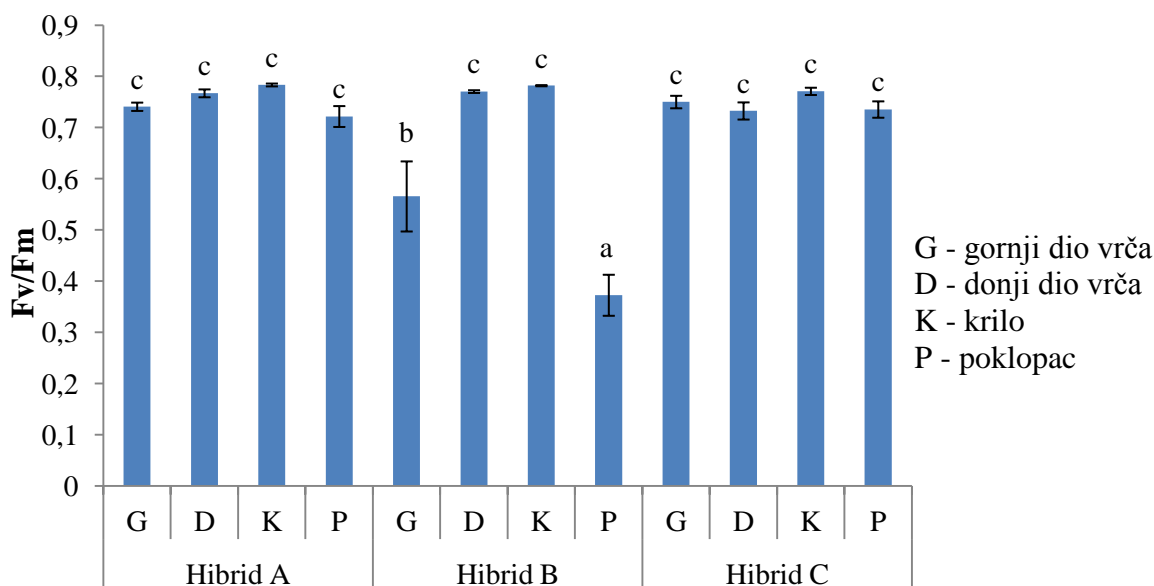
#### 4.1. FLUORESCENCIJA KLOROFILA *a* U UVJETIMA *in vivo*

Za praćenje učinkovitosti fotosistema II koristila sam slijedeće parametre: omjer varijabilne i maksimalne fluorescencije ( $F_v/F_m$ ), omjer varijabilne i minimalne fluorescencije ( $F_v/F_0$ ) i stopu smanjenja fluorescencije klorofila ( $R_{Fd}$ ).

##### 4.1.1. Omjer varijabilne i maksimalne fluorescencije ( $F_v/F_m$ )

Određivanjem optimalne učinkovitosti fotosistema II koristeći parametar  $F_v/F_m$  potvrđena je podjednaka fotosintetska učinkovitost u svim dijelovima vrča analiziranih hibrida, a vrijednosti se kreću između 0,7 i 0,8. Jedino sam u hibrida B uočila statistički značajan pad optimalnog prinosa fluorescencije i to u gornjem dijelu vrča i posebice poklopcu. Smanjenje u gornjem dijelu vrča hibrida B iznosi 25% dok smanjenje u poklopcu iznosi 51% (Slika 9).

Faktorijalna analiza pokazala je da na vrijednost parametra  $F_v/F_m$  utječe tip hibrida i analizirani dio vrča. Hibrid B se razlikuje od hibrida A i C jer ima najniže vrijednosti. Što se tiče dijela vrča svi se međusobno značajno razlikuju samo se donji dio vrča ne razlikuje od krila.

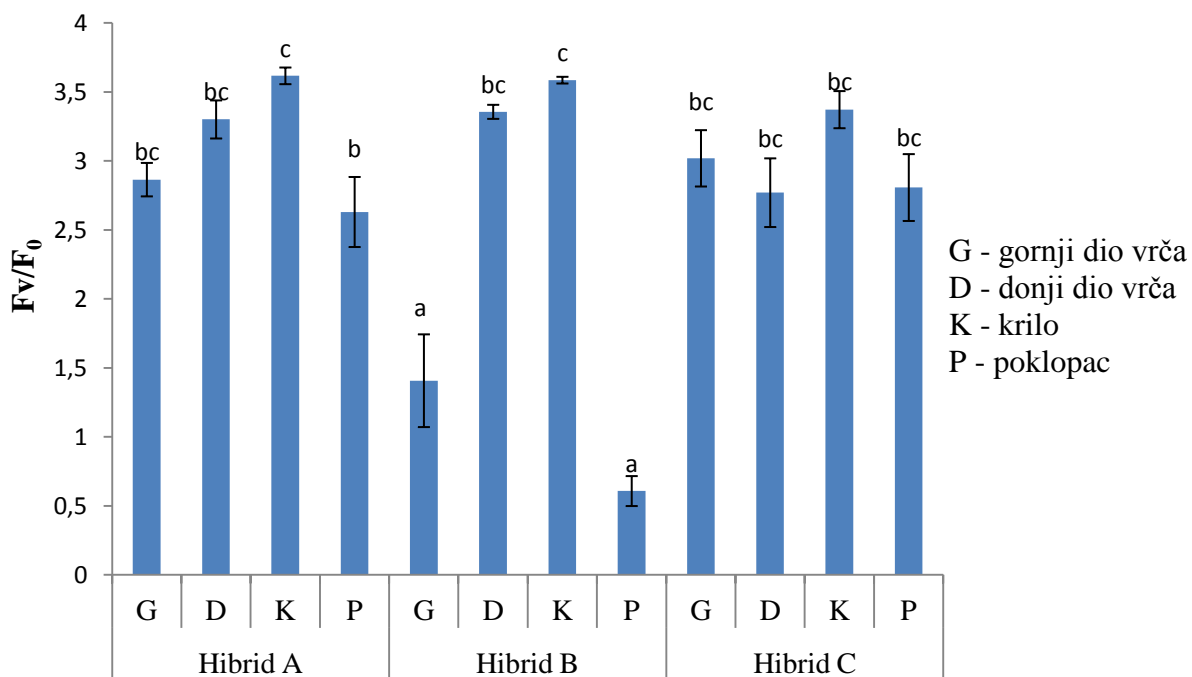


**Slika 9.** Omjer varijabilne i maksimalne fluorescencije ( $F_v/F_m$ ) u tri različita hibrida (A, B i C) roda *Sarracenia*, određen za četiri različita dijela vrča: gornji dio vrča, donji dio vrča, krilo i poklopac. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 3 replike  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.1.2. Omjer varijabilne i minimalne fluorescencije ( $F_v/F_0$ )

Određivanjem optimalne učinkovitosti fotosistema II koristeći parametar  $F_v/F_0$  ponovo se ističe hibrid B s najnižom vrijednosti izmjerenom u poklopcu dok je najviša vrijednost izmjerena u krilu hibrida A. Analiza dijelova vrča hibrida A pokazala je najvišu učinkovitost fotosistema II u krilu u odnosu na ostale dijelove vrča hibrida A. Gornji i donji dio vrča pokazali su nešto niže vrijednosti, no statistički značajno smanjenje u odnosu na krilo prisutno je samo u poklopcu hibrida A. Kod hibrida B vrijednosti su statistički značajno niže u gornjem dijelu vrča i poklopcu u odnosu na donji dio vrča i krilo hibrida B, kao i u odnosu na sve analizirane dijelove vrča hibrida A i C. Kod hibrida C sam najvišu vrijednost ovog parametra uočila u krilu, međutim nema statistički značajne razlike između pojedinih dijelova vrča (Slika 10).

Faktorijalna analiza pokazala je da na vrijednost parametra  $F_v/F_0$  utječe i tip hibrida i analizirani dio vrča. Hibrid B se ponovo razlikuje od hibrida A i C, a što se tiče dijela vrča donji dio vrča se ne razlikuje od krila, a gornji dio vrča se ne razlikuje od poklopca.



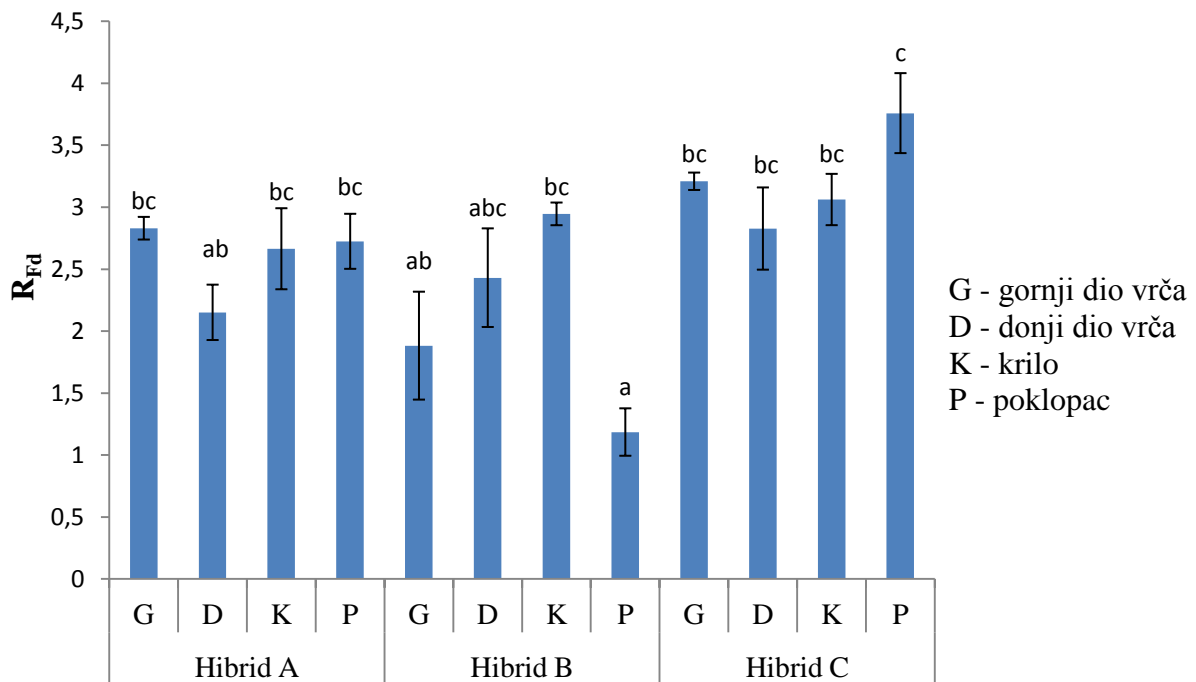
**Slika 10.** Omjer varijabilne i minimalne fluorescencije ( $F_v/F_0$ ) u tri različita hibrida (A, B i C) roda *Sarracenia*, određen za četiri različita dijela vrča: gornji dio vrča, donji dio vrča, krilo i poklopac. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 3 replike  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.1.3. Stopa smanjenja fluorescencije klorofila ( $R_{Fd}$ )

Učinkovitost fotosinteze odredila sam i preko parametra  $R_{Fd}$  koji daje vrlo dobar uvid i u učinkovitost sekundarnih reakcija fotosinteze. Izmjerene vrijednosti kreću se u rasponu od 1,18 do 3,76. Najmanju vrijednost  $R_{Fd}$  sam uočila u poklopcu hibrida B dok je najveća vrijednost prisutna u poklopcu hibrida C koji se međusobno i statistički značajno razlikuju. Kod hibrida A nema statistički značajne razlike u  $R_{Fd}$  vrijednostima između pojedinih dijelova vrča, međutim lagani pad je zabilježen u donjem dijelu vrča. Unutar hibrida B najviša vrijednost prisutna je u krilu. Iako je u gornjem i donjem dijelu vrča zabilježeno sniženje ovog parametra, ono nije statistički značajno u odnosu na krilo. Značajno smanjenje u odnosu na krilo prisutno je samo u poklopcu hibrida B pri čemu to smanjenje iznosi 60%.  $R_{Fd}$  vrijednosti različitih dijelova vrča hibrida C ne razlikuju se međusobno značajno, no lagani porast

zabilježen je u poklopcu. Općenito hibrid C se ističe nešto većim  $R_{Fd}$  vrijednostima u odnosu na ostala dva hibrida (Slika 11).

Faktorijalna analiza je pokazala da na vrijednost parametra  $R_{Fd}$  utječe samo tip hibrida te se svi hibridi međusobno razlikuju s time da hibrid B pokazuje najnižu vrijednost, a hibrid C najvišu.



**Slika 11.** Stopa smanjenja fluorescencije klorofila ( $R_{Fd}$ ) u tri različita hibrida (A, B i C) roda *Sarracenia*, određen za četiri različita dijela vrča: gornji dio vrča, donji dio vrča, krilo i poklopac. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 3 replike  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0.05$ ).

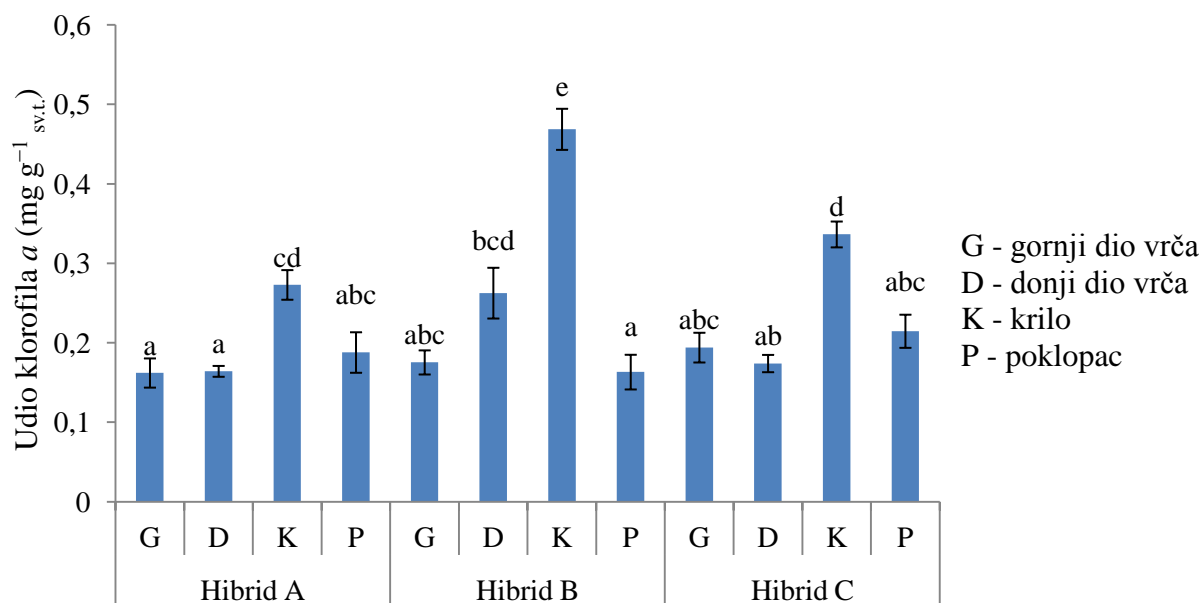
## 4.2. UDIO FOTOSINTETSKIH PIGMENATA U TKIVU

### 4.2.1. Udio klorofila *a*

Najvišu vrijednost udjela klorofila *a* uočila sam u krilu hibrida B dok je najniža vrijednost zabilježena u gornjem dijelu vrča hibrida A pri čemu je ta vrijednost neznatno niža od onih u donjem dijelu vrča hibrida A i poklopcu hibrida B. Kod sva tri hibrida uočila sam visoku vrijednost udjela klorofila *a* u krilu u odnosu na ostale dijelove vrča. Kod hibrida A sam uočila najniže vrijednosti u gornjem i donjem dijelu vrča i one su statistički značajno niže u odnosu na krilo hibrida A dok je vrijednost u poklopcu nešto niža, ali ne statistički značajno u odnosu na krilo. Udio klorofila *a* statistički se značajno razlikuje u krilu hibrida B u odnosu na ostale dijelove vrča hibrida B, ali i u odnosu na ostale dijelove vrča ostalih hibrida. Osim u krilu, visoki udio klorofila *a* kod hibrida B sam uočila i u donjem dijelu vrča, gdje je udio klorofila *a* statistički značajno viši od udjela klorofila *a* u poklopcu hibrida B. Kod hibrida C ponovo se statistički ističe krilo visokim vrijednostima, u odnosu na ostale dijelove vrča, dok se vrijednosti za gornji i donji dio vrča te poklopac statistički međusobno značajno ne razlikuju (Slika 12).

Faktorijalna analiza je pokazala da na vrijednost udjela klorofila *a* utječe i tip hibrida i analizirani dio vrča. Hibrid B se razlikuje od hibrida A i C koji se međusobno ne razlikuju, a što se tiče dijela vrča samo se krilo razlikuje od ostalih dijelova vrča.



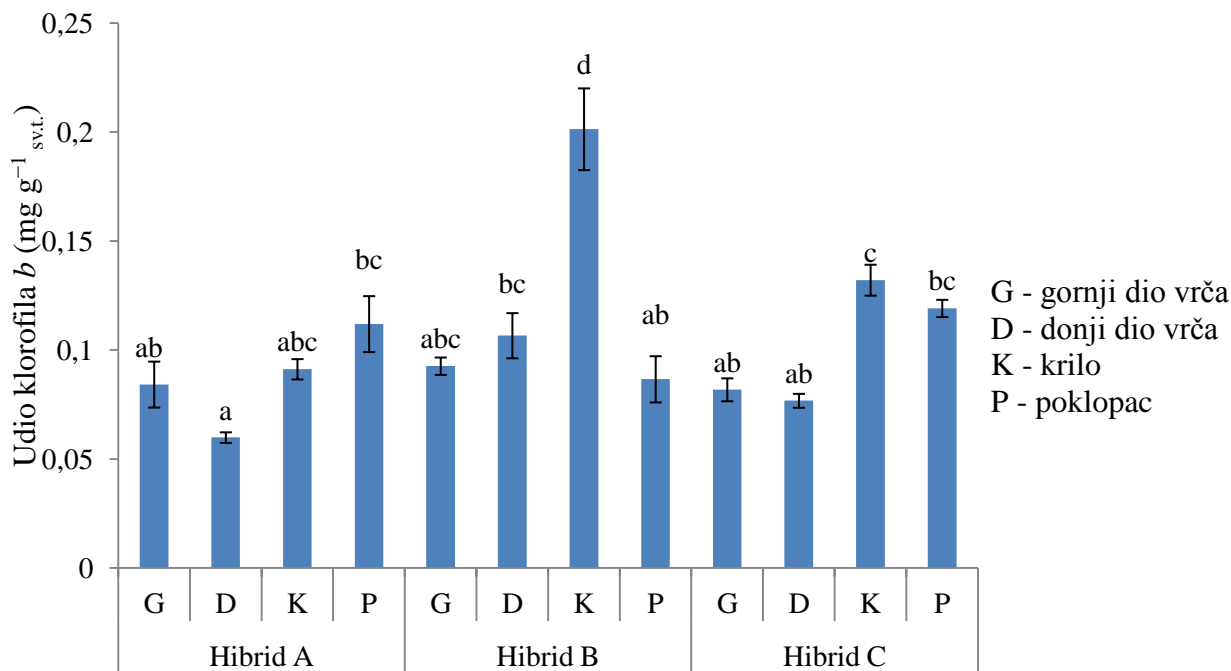


**Slika 12.** Udio klorofila *a* u tri različita hibrida (A, B i C) roda *Sarracenia*, određen za četiri različita dijela vrča: gornji dio vrča, donji dio vrča, krilo i poklopac. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.2.2. Udio klorofila *b*

Po udjelu klorofila *b* ističe se krilo hibrida B s najvišom vrijednosti, dok se po najnižoj vrijednosti ističe donji dio vrča hibrida A. Kod hibrida A sam najvišu vrijednost uočila u poklopcu, međutim statistički se značajno razlikuju samo poklopac i donji dio vrča pri čemu je udio klorofila *b* značajno viši u poklopcu u odnosu na donji dio vrča hibrida A koji ima najnižu vrijednost. Po udjelu klorofila *b* ističe se krilo hibrida B u kojem je udio klorofila *b* statistički značajno viši u odnosu na ostale dijelove vrča hibrida B, ali i u odnosu na dijelove vrča hibrida A i hibrida C. Ostali dijelovi vrča hibrida B imaju podjednake vrijednosti s time da poklopac ima nešto nižu vrijednost. Kod hibrida C uočila sam najveću vrijednost udjela klorofila *b* u krilu, međutim ta vrijednost se statistički značajno ne razlikuje od one u poklopcu, iako je u poklopcu vrijednost nešto niža. Udio klorofila *b* je statistički značajno viši u krilu u odnosu na gornji i donji dio vrča hibrida C (Slika 13).

Faktorijalna analiza pokazala je da na vrijednost udjela klorofila *b* utječe i tip hibrida i analizirani dio vrča te se svi hibridi međusobno značajno razlikuju. Što se tiče dijela vrča samo se donji dio vrča ne razlikuje od gornjeg dok se svi ostali razlikuju.



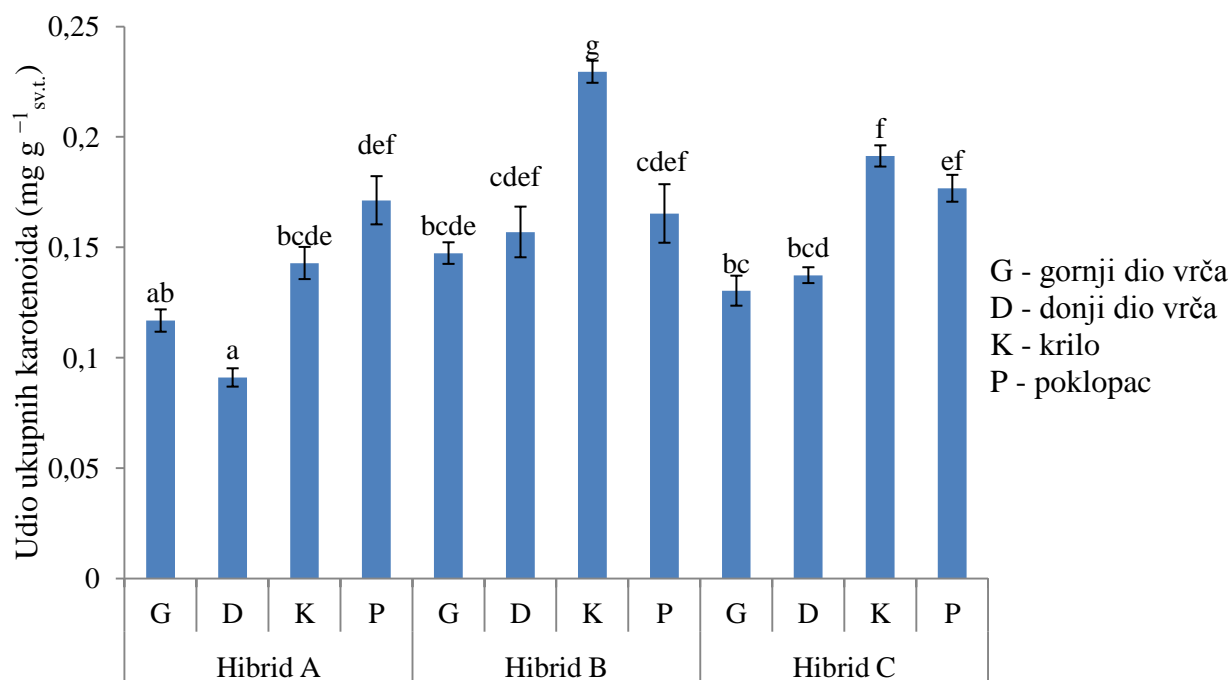
**Slika 13.** Udio klorofila *b* u tri različita hibrida (A, B i C) roda *Sarracenia*, određen za četiri različita dijela vrča: gornji dio vrča, donji dio vrča, krilo i poklopac. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.2.3. Udio ukupnih karotenoida

Najveći udio ukupnih karotenoida uočila sam u krilu hibrida B dok je najniži udio izmjeren u donjem dijelu vrča hibrida A. Kod hibrida A najviši udio ukupnih karotenoida je zabilježen u poklopcu te se statistički značajno razlikuje u odnosu na gornji i donji dio vrča hibrida A gdje je udio ukupnih karotenoida značajno manji. U hibridu B se po udjelu ukupnih karotenoida statistički ističe krilo, koje ima najvišu vrijednost, dok se ostali dijelovi vrča međusobno statistički značajno ne razlikuju. Kod hibrida C zabilježen je najviši udio ukupnih karotenoida u krilu u odnosu na ostale dijelove vrča. Visoki udio ukupnih karotenoida uočila sam i u poklopcu hibrida C. Vrijednost u krilu se statistički značajno razlikuje od onih u gornjem i donjem dijelu vrča dok se značajno ne razlikuje od vrijednosti u poklopcu (Slika 14).

Faktorijalna analiza pokazala je da na vrijednost udjela ukupnih karotenoida utječe i tip hibrida i analizirani dio vrča te se svi hibridi međusobno značajno razlikuju. Što se tiče

dijela vrča samo se donji dio vrča ne razlikuje od gornjeg dok se svi ostali međusobno razlikuju.



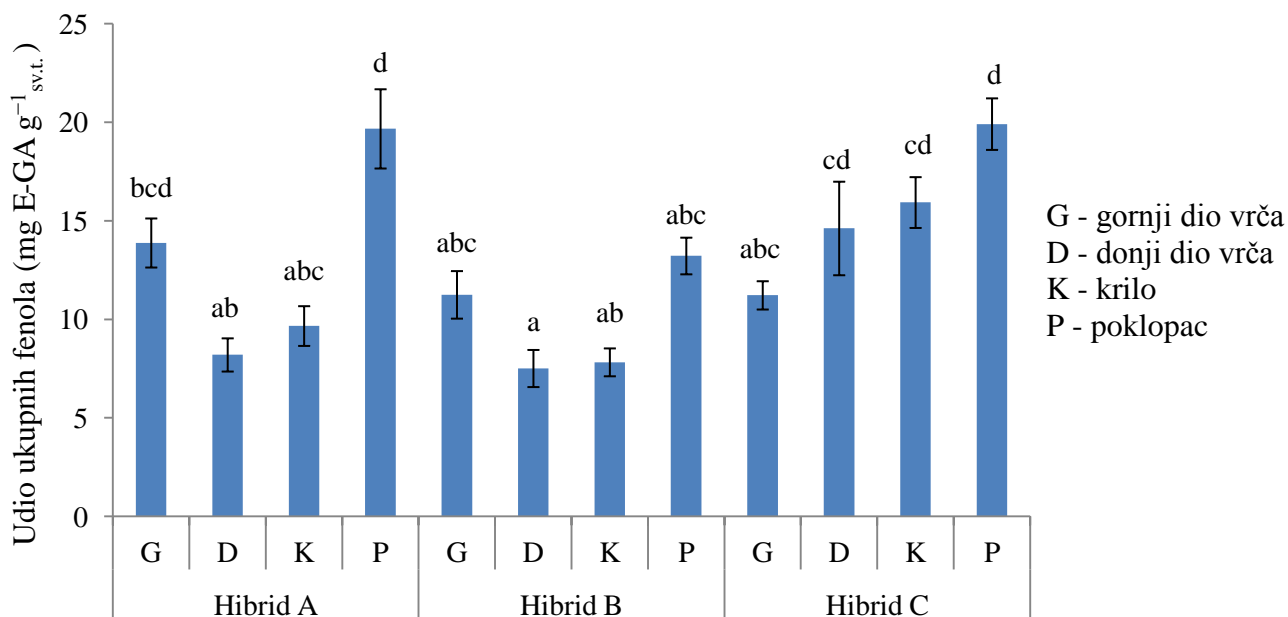
**Slika 14.** Udio ukupnih karotenoida u tri različita hibrida (A, B i C) roda *Sarracenia*, određen za četiri različita dijela vrča: gornji dio vrča, donji dio vrča, krilo i poklopac. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 6 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0.05$ ).

### **4.3. UDIO FENOLNIH SPOJEVA U TKIVU**

#### **4.3.1. Udio ukupnih fenola**

Najvišu vrijednost udjela ukupnih fenola sam uočila u poklopcu hibrida C, a najmanju u donjem dijelu vrča hibrida B. Najviši udio ukupnih fenola uočila sam kod poklopca svih hibrida, u odnosu na ostale dijelove vrča svakog hibrida, pri čemu je udio ukupnih fenola u poklopcu hibrida A i C statistički značajno viši u odnosu na udio ukupnih fenola u poklopcu hibrida B. Kod hibrida A sam osim u poklopcu visoku vrijednost udjela ukupnih fenola uočila i u gornjem dijelu vrča pri čemu se uočena vrijednost statistički značajno ne razlikuje od one u poklopcu. Najnižu vrijednost udjela ukupnih fenola kod hibrida A sam uočila u donjem dijelu vrča, a ta vrijednost se statistički značajno razlikuje od one u poklopcu. Kod hibrida B nema statistički značajne razlike u udjelu ukupnih fenola između pojedinih dijelova vrča, međutim najvišu vrijednost ponovo pokazuje poklopac. Hibrid C također pokazuje najvišu vrijednost udjela ukupnih fenola u poklopcu, međutim ta vrijednost se statistički razlikuje samo od vrijednosti u gornjem dijelu vrča koja je značajno niža (Slika 15).

Faktorijalna analiza pokazala je da na vrijednost udjela ukupnih fenola tip hibrida ne utječe, ali utječe dio vrča pa se tako poklopac razlikuje od svih ostalih dijelova.

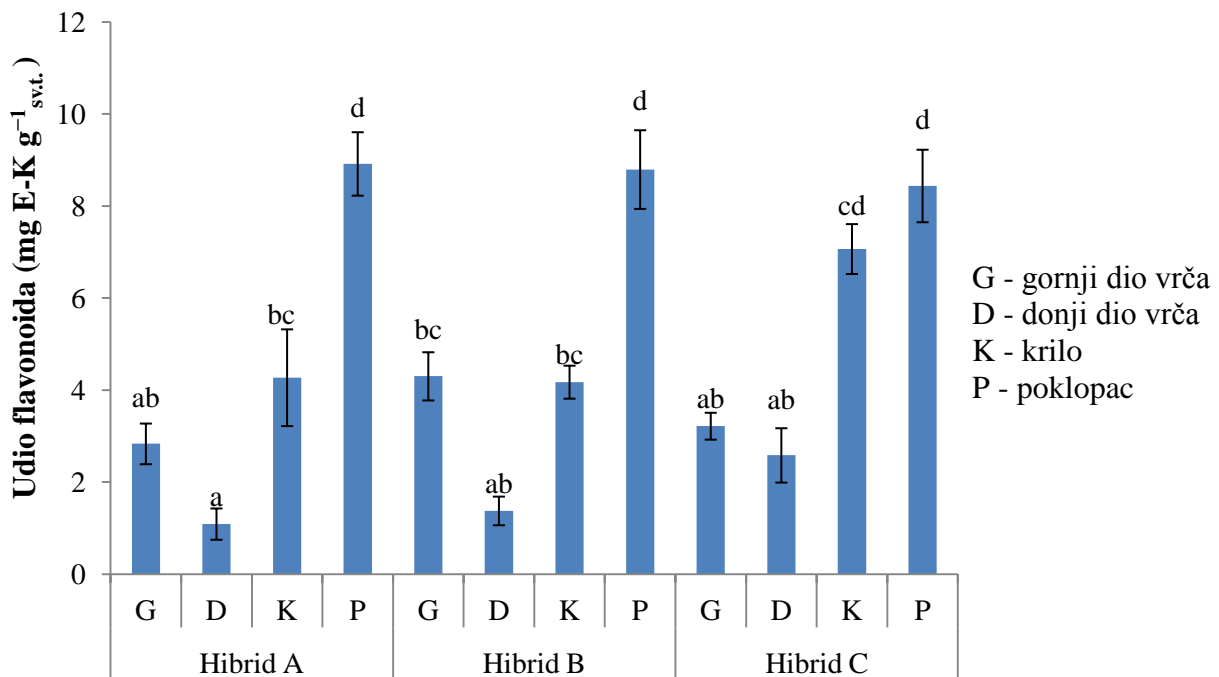


**Slika 15.** Udio ukupnih fenola u tri različita hibrida (A, B i C) roda *Sarracenia*, određen za četiri različita dijela vrča: gornji dio vrča, donji dio vrča, krilo i poklopac. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.3.2. Udio flavonoida

Po udjelu flavonoida se unutar svakog hibrida ističe poklopac pri čemu se kod hibrida A i B poklopac statistički ističe svojom visokom vrijednosti udjela flavonoida u odnosu na ostale dijelove vrča. Među hibridima se po najnižoj vrijednosti udjela flavonoida u svježem tkivu ističe hibrid A i to svojim donjim dijelom vrča. Kod hibrida B i C, također su najniže vrijednosti zabilježene u donjem dijelu vrča, u odnosu na ostale dijelove vrča, ali su te vrijednosti nešto više u odnosu na donji dio vrča hibrida A. Kod hibrida C se uz poklopac statistički ističe i krilo višom vrijednosti udjela flavonoida u odnosu na gornji i donji dio vrča hibrida C (Slika 16).

Faktorijalna analiza je pokazala da na vrijednost udjela flavonoida ne utječe tip hibrida, ali utječe dio vrča te se svi dijelovi vrča međusobno razlikuju.

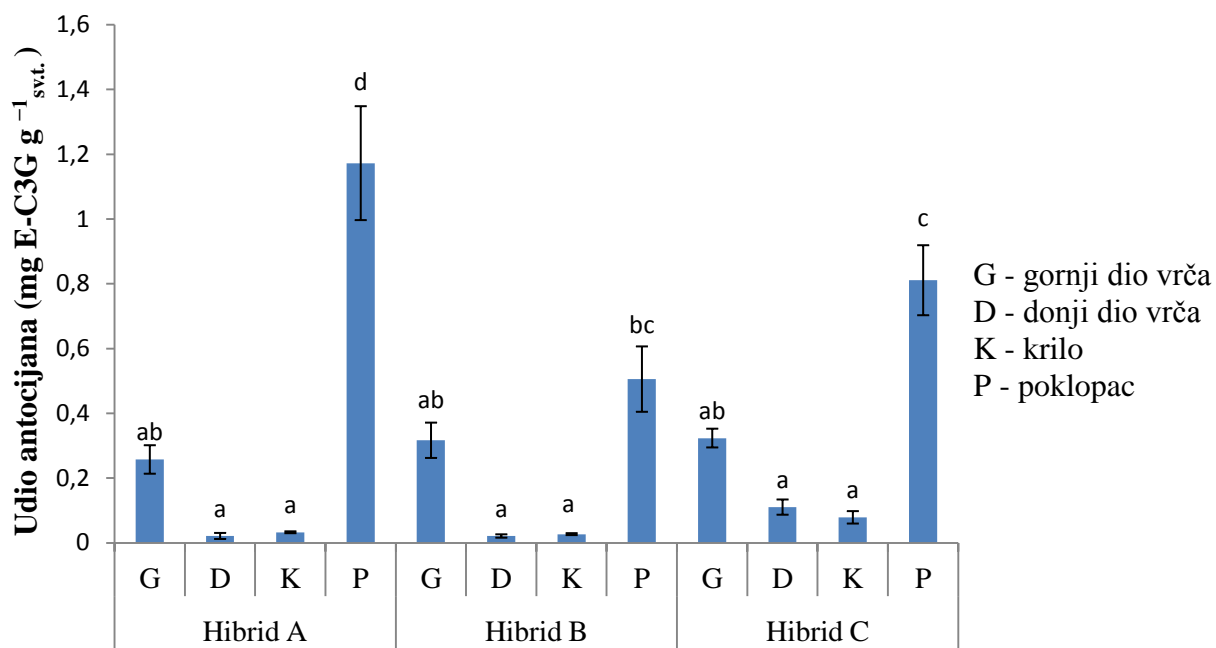


**Slika 16.** Udio flavonoida u tri različita hibrida (A, B i C) roda *Sarracenia*, određen za četiri različita dijela vrča: gornji dio vrča, donji dio vrča, krilo i poklopac. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.3.3. Udio antocijana

Udio antocijana je najviši u poklopcu hibrida A dok sam najniže vrijednosti uočila u donjem dijelu vrča hibrida A i B. Uočila sam da su vrijednosti udjela antocijana najviše u poklopcima svih analiziranih hibrida u odnosu na ostale dijelove vrča, osobito donji dio vrča i krilo. Kod hibrida A statistički se ističe poklopac svojom visokom vrijednosti udjela antocijana u odnosu na ostale dijelove vrča koji pokazuju niže vrijednosti. Osim toga, udio antocijana u poklopcu hibrida A je statistički značajno viši od onog u poklopcu hibrida B i C. Kod hibrida B sam uočila najvišu vrijednost u poklopcu, ali se ona statistički značajno ne razlikuje od one u gornjem dijelu vrča, međutim statistički se značajno razlikuje od udjela antocijana u donjem dijelu vrča i krilu koji pokazuju vrlo niske vrijednosti. Kod hibrida C udio antocijana u poklopcu je statistički značajno viši u odnosu na ostale dijelove vrča istog hibrida (Slika 17).

Faktorijalna analiza je pokazala da na vrijednost udjela antocijana utječe i tip hibrida i analizirani dio vrča. Međusobno se značajno razlikuju hibridi A i B, a po analiziranom dijelu vrča svi se međusobno razlikuju osim krila i donjeg dijela vrča koji se međusobno ne razlikuju.

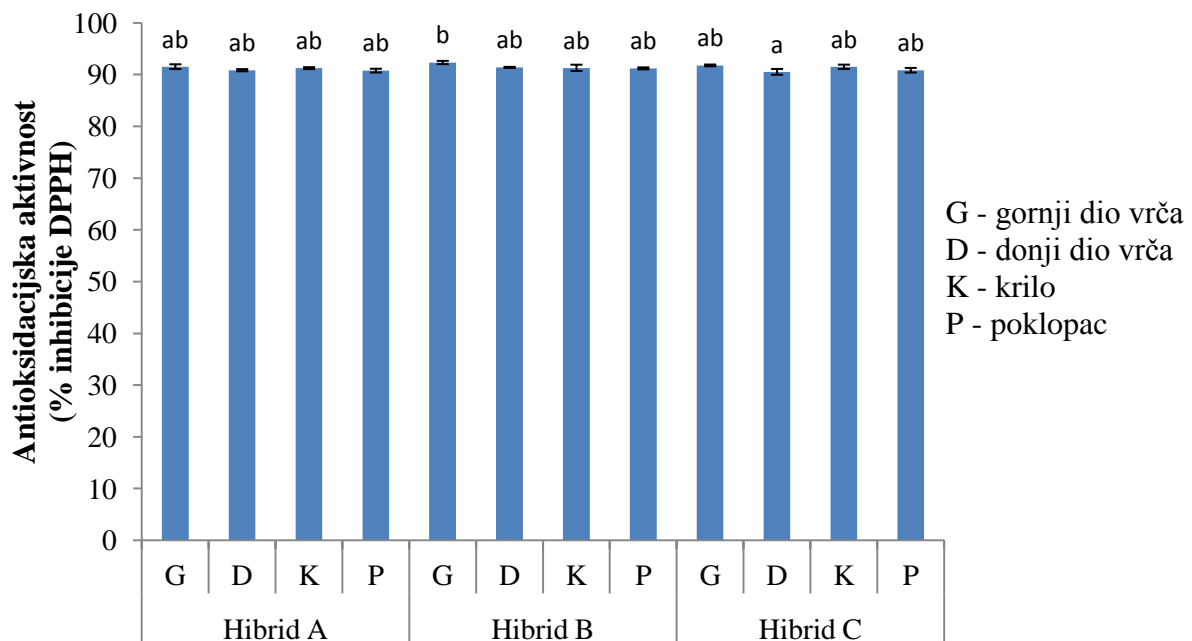


**Slika 17.** Udio antocijana u tri različita hibrida (A, B i C) roda *Sarracenia*, određen za četiri različita dijela vrča: gornji dio vrča, donji dio vrča, krilo i poklopac. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST U TKIVU

Analizom antioksidacije aktivnosti DPPH metodom uočila sam vrlo visoku antioksidacijsku aktivnost svih dijelova vrčeva svih hibrida. Antioksidacijska aktivnost je kod svih analiziranih dijelova vrčeva hibrida bila viša od 90%. Statistički se značajno razlikuju samo gornji dio vrča hibrida B, koji ima najvišu vrijednost antioksidacijske aktivnosti, i donji dio vrča hibrida C koji pokazuje najmanju vrijednost (Slika 18).

Faktorijalna analiza pokazala je da na vrijednost postotka inhibicije DPPH radikala ne utječe tip hibrida nego samo analizirani dio vrča.



**Slika 18.** Antioksidacijska aktivnost izražena preko postotka inhibicije DPPH radikala u tri različita hibrida (A, B i C) roda *Sarracenia*, određen za četiri različita dijela vrča: gornji dio vrča, donji dio vrča, krilo i poklopac. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0.05$ ).



## 5. RASPRAVA

U posljednje vrijeme sve se više istražuje kako karnivorija utječe na stopu fotosinteze kod mesojednih biljaka. Utvrđeno je kako neke vrste mesojednih biljaka često imaju visoku metaboličku aktivnost u zamkama dok je stopa fotosinteze često smanjena (Adamec, 2010). Sa stopom fotosinteze povezan je i udio fotosintetskih pigmenata tako da je kod roda *Nepenthes* utvrđeno da će vrčevi koji imaju manju fotosintetsku učinkovitost imati i manji udio fotosintetskih pigmenata u odnosu na listove (Pavlovič, 2011). Za razliku od roda *Nepenthes* kod kojeg se razlikuju dva dijela lista, vršni preobražen u zamku i sam list koji provodi fotosintezu, kod roda *Sarracenia* listovi preobraženi u vrčeve imaju dvostruku funkciju – služe i za fotosintezu i za hvatanje kukaca (Pavlovič i sur., 2007). Osim toga vrčevi kod vrsta iz roda *Sarracenia* najčešće su crvene, žute ili ljubičaste boje što ima važnu ulogu u privlačenju kukaca (Sheridan, 1997). Za crvenu obojanost vrčeva odgovorni su flavonoidi i to uglavnom antocijani (Sheridan i Griesbach, 2001) koji mogu imati i važnu antioksidacijsku ulogu u zaštiti biljaka od djelovanja slobodnih radikala nastalih pod utjecajem visokog intenziteta osvjjetljenja (Close i McArthur, 2002).

Budući da se unutar roda *Sarracenia* pojavljuje veliki broj hibrida koji se međusobno razlikuju morfološki i fiziološki, ovo istraživanje je provedeno kako bi se utvrdila razlika u fotosintetskoj učinkovitosti, udjelu fotosintetskih pigmenata, udjelu fenolnih spojeva i antioksidacijskoj aktivnosti između tri morfološki različita hibrida roda *Sarracenia*. Osim toga, promatrala su se razlike u spomenutim parametrima između četiri različita dijela vrča svakog od hibrida. Dobivene rezultate nastojala sam povezati s obojanošću pojedinih dijelova vrča i sudjelovanjem u hvatanju kukaca i probavi na način da utvrdim imaju li dijelovi vrča koji više sudjeluju u hvatanju i probavi kukaca ujedno i manju fotosintetsku učinkovitost te niži udio fotosintetskih pigmenata. Također, dijelovi vrča koji sudjeluju u hvatanju i probavi kukaca trebali bi biti crveno obojani zbog privlačenja kukaca te time sadržavati i viši udio fenolnih spojeva i imati višu antioksidacijsku aktivnost. Uočene razlike zatim sam nastojala povezati s morfološkim razlikama između tri različita hibrida roda *Sarracenia*.

Kako bih odredila fotosintetsku učinkovitost pojedinih dijelova vrčeva tri različita hibrida iz roda *Sarracenia*, mjerila sam fluorescenciju klorofila *a* u uvjetima *in vivo*. U ekstraktima biljnog tkiva spektrofotometrijski sam odredila udio fotosintetskih pigmenata, odnosno klorofila *a* i *b* i ukupnih karotenoida. Također, spektrofotometrijski sam odredila

udio ukupnih fenola, flavonoida i antocijana, a antioksidacijsku aktivnost sam određivala mjerenjem postotka inhibicije DPPH radikala.

## 5.1. FOTOSINTETSKA UČINKOVITOST

Za određivanje učinkovitosti fotosinteze koristila sam tri parametra. Za razliku od parametra  $F_v/F_m$  koji govori o optimalnoj učinkovitosti fotosistema II, parametri  $F_v/F_0$  i  $R_{Fd}$  daju uvid i u sekundarne reakcije fotosinteze odnosno Calvinov ciklus (Lichtenthaler i Babani, 2004).

### 5.1.1. Omjer varijabilne i maksimalne fluorescencije ( $F_v/F_m$ )

Fluorescencija klorofila *a* uglavnom potječe od fotosistema II te je optimalna učinkovitost fotosistema II važan pokazatelj fotosintetske učinkovitosti. Parametar koji govori o učinkovitosti fotosistema II je  $F_v/F_m$  te je vrlo važan indikator uspješnosti fotosinteze kod biljaka (Maxwell i Johnson, 2000). Upravo je parametar  $F_v/F_m$  i najčešće korišteni parametar prilikom mjerenja fluorescencije klorofila *a* (Chatzistathis i sur., 2011). Za većinu biljaka omjer varijabilne i maksimalne fluorescencije se kreće od 0,74 do 0,85. Pad u vrijednosti spomenutog parametra ukazuje na pad u fotokemiji fotosistema II i na oštećenje u fotosintetskom aparatu (Lichtenthaler i sur., 2005).

Vrijednosti izmjerene u poklopcu, „krilu“, gornjem i donjem dijelu vrča svakog od analiziranih hibrida tijekom istraživanja bile su u skladu s teorijskim podacima te su za većinu uzoraka iznosile od 0,72 do 0,78. Odstupanja od spomenutih vrijednosti pokazao je samo hibrid B i to u gornjem dijelu vrča, gdje je vrijednost bila značajno niža od teorijske i iznosila 0,57, i poklopcu gdje je vrijednost bila još niža te iznosila 0,37. Niske vrijednosti parametra  $F_v/F_m$  ukazuju na smanjenje učinkovitosti fotosistema II i na fotoinhibiciju (Maxwell i Johnson, 2000). Do smanjenja optimalne učinkovitosti fotosinteze u ovom je slučaju vjerojatno došlo zbog prilagodbe mesojednih biljaka na hvatanje kukaca i apsorpciju hranjivih tvari iz ulovljenog plijena (Bruzzese i sur., 2010). Naime vrčevi su u gornjem dijelu često intenzivno obojani čime privlače kukce te sadrže veliki broj žlijezda za izlučivanje nektara (Rice, 2006). Za crvenu obojanost vrčeva kod roda *Sarracenia* uglavnom su odgovorni flavonoidi i to antocijani (Sheridan i Griesbach, 2001). Poklopac i gornji dio vrča hibrida B su crveno obojani dok su „krilo“ i donji dio vrča zeleno obojani što znači da bi poklopac i gornji dio vrča trebali imati manje fotosintetskih pigmenata koji su neophodni za odvijanje procesa

fotosinteze, a više fenolnih spojeva odgovornih za crvenu obojanost. Manji udio fotosintetskih pigmenta značio bi nižu fotosintetsku učinkovitost. Kao što ću još detaljnije navesti kasnije, udio klorofila je u ovim dijelovima vrča bio niži u odnosu na donji dio vrča te osobito „krilo“ (Slika 12 i Slika 13) dok je udio fenolnih spojeva, osobito antocijana bio veći (Slika 15 i Slika 17).

Kod roda *Darlingtonia* je utvrđeno da dijelovi vrča koji sadrže više ekstrafloralnih nektarija imaju manji udio fotosintetskih pigmenta (Ellison i Farnsworth, 2005) te se stoga može zaključiti da bi uzrok smanjenja optimalne učinkovitosti fotosinteze u gornjem dijelu vrča i poklopcu hibrida B mogla biti i povećana količina žlijezda za izlučivanje nektara. Dijelovi vrča koji su metabolički aktivniji imaju nižu stopu fotosinteze (Adamec, 2010). S obzirom da se žlijezde za izlučivanje nektara u najvećoj količini nalaze upravo u području poklopca te u području savijenog ruba otvora vrča (Plachno, 2007) to objašnjava najnižu izmjerenu vrijednost optimalne učinkovitost fotosistema II u poklopcu. Međutim, zanimljivo je da kod ostalih hibrida nije bilo značajnog pada vrijednosti ovog parametra u tim dijelovima vrča iako su u hibrida A izmjerene nešto niže vrijednosti upravo u gornjem dijelu vrča i poklopcu. Hibrid B se ipak ističe najnižim vrijednostima u odnosu na ostala dva hibrida.

### **5.1.2. Omjer varijabilne i minimalne fluorescencije ( $F_v/F_0$ )**

Parametar  $F_v/F_0$  je puno osjetljiviji od prethodno spomenutog parametra te pokazuje veći opseg promjena pri stresnim uvjetima. U određenim uvjetima stresa  $F_v/F_m$  neće pokazati značajnu promjenu, međutim parametar  $F_v/F_0$  će pokazati određeni pad (Lichtenthaler i sur., 2005). Smanjenje vrijednosti parametra  $F_v/F_0$  ispod kritične vrijednosti koja iznosi 4 ukazuje na smanjenje učinkovitosti fotosistema II (Chatzistathis i sur., 2011). Zanella i sur. (2004) su pokazali da vrijednosti parametra  $F_v/F_0$  u rasponu od 3,8 do 4,3 ne ukazuju na oštećenje fotosintetskog aparata.

U svim analiziranim dijelovima vrčeva svih hibrida je omjer varijabilne i minimalne fluorescencije bio niži od vrijednosti 3,8. Moguće je da su vrijednosti niže zbog općenito niže stope fotosinteze utvrđene u mesojednim biljkama u odnosu na druge vrste biljaka (Bruzese i sur., 2010). U odnosu na druge dijelove vrča kod hibrida A i B niže vrijednosti ovog parametra izmjerene su u poklopcu i gornjem dijelu vrča što se kao i u slučaju parametara  $F_v/F_m$  može povezati s prisutnošću žlijezda koje luče nektar i crvenom obojenošću ovih

dijelova odnosno nižim udjelom klorofila, a većim udjelom fenolnih spojeva. S ovim je u skladu i činjenica da sam najviše vrijednosti parametra  $F_v/F_0$  uočila u „krilu“ svakog od hibrida, u odnosu na ostale dijelove vrča. „Kрила“ su kod sva tri hibrida zelene boje i imaju neznatnu ulogu u privlačenju i hvatanju kukaca. Uloga „krila“ je djelomično u dovođenje kukaca do otvora vrča na način da kukac prati pružanje nektarija duž „krila“ i dolazi do otvora vrča (D'Amato, 2013). Budući da su „krila“ zelene boje može se zaključiti da sadrže više fotosintetskih pigmenata u odnosu na gornji dio vrča i poklopac, koji su crvene boje, te manje žlijezda za izlučivanje nektara. To je i potvrđeno mjerenjem udjela klorofila o čemu ću detaljnije pisati nešto kasnije. Budući da donji dio vrča obuhvaća dio cijevi vrča u kojem se nalazi tekućina u kojoj se kukac utapa te se potom pod utjecajem enzima vrši razgradnja uhvaćenog plijena (D'Amato, 2013), to bi mogao biti jedan od razloga smanjenja učinkovitosti fotosinteze u donjem dijelu vrča u odnosu na „krilo“.

Međutim izuzetno niske vrijednosti spomenutog parametra izmjerene kod hibrida B u gornjem dijelu vrča i poklopcu, koje su statistički značajno niže i u odnosu na iste dijelove vrčeva druga dva hibrida, možda ukazuje da je hibrid B bio izložen stresnim uvjetima. Naime omjer varijabilne i minimalne fluorescencije, puno niži od kritične vrijednosti, ukazuje na izloženost biljke stresnim uvjetima pri čemu je oštećen strukturni i funkcionalni integritet kloroplasta (Chatzistathis i sur., 2011). Visoki intenzitet osvjetljenja može izazvati nastajanje oštećenja kod biljaka. Dostupnost svjetlosti utječe na uspješnost procesa fotosinteze kod biljaka i stvaranje reaktivnih kemijskih vrsta do te mjere da u listovima dolazi do fotoinhibicije i fotooštećenja pod utjecajem viška svjetlosti (Close i McArthur, 2002). Dakle, jedan od mogućih uzroka smanjenja fotosintetske učinkovitosti u poklopcu i gornjem dijelu vrča hibrida B, u odnosu na ostala dva hibrida, bi mogao biti položaj na kojem je uzgajan hibrid B. Naime, moguće da je hibrid B bio smješten na mjestu koje je duže vrijeme bilo obasjano Suncem te je time bio izložen stresnim uvjetima koji su doveli do niže fotosintetske učinkovitosti.

### **5.1.3. Stopa smanjenja fluorescencije klorofila ( $R_{Fd}$ )**

Parametar  $R_{Fd}$  ili stopa smanjenja fluorescencije klorofila je pokazatelj stope fiksacije ugljikovog dioksida i indeks vitalnosti fotosintetskog aparata, a učinkovito ukazuje na moguće promjene u fotosintetskom aparatu (Lichtenthaler i Babani, 2004).  $R_{Fd}$  vrijednost je viša u listovima sunca i iznosi od 3 do 5 dok za listove sjene iznosi od 1,0 do 2,5 što ukazuje

na veći fotosintetski kapacitet i stopu fiksacije ugljikovog dioksida u biljkama sunca (Lichtenthaler i sur., 2005).

Među analiziranim hibridima jedino hibrid C pokazuje  $R_{Fd}$  vrijednosti više od 3 i to za gornji dio vrča, „krilo“ i poklopac dok je vrijednost za donji dio vrča niža od 3. Vrijednosti za ostale dijelove vrča ostala dva hibrida u skladu su s  $R_{Fd}$  vrijednostima za biljke sjene. Mesojedne biljke rastu uglavnom na sunčanim područjima (Zamora i sur., 1998) što znači da bi  $R_{Fd}$  vrijednost trebala biti u rasponu vrijednosti za biljke sunca. Budući da mesojedne biljke imaju prilagodbe za hvatanje i probavu kukaca, obzirom na smanjenu stopu fotosinteze, možemo ih smatrati biljkama sjene. Kako je  $R_{Fd}$  parametar direktno povezan sa stopom fotosinteze (Lichtenthaler i Babani, 2004), za razliku od ostala dva korištena parametra, iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da hibrid C ima nešto višu stopu fotosinteze od ostala dva istraživana hibrida. Zanimljivo je da sam najvišu  $R_{Fd}$  vrijednost uočila u poklopcu hibrida C koji je crveno obojan, ima niži udio klorofila *a*, a veliki udio antocijana. Međutim, u poklopcu sam također izmjerila relativno veliki udio klorofila *b* i karotenoida koji također mogu sudjelovati u apsorpciji svjetlosne energije. Kod hibrida B sam najnižu vrijednost zabilježila u poklopcu, a najvišu vrijednosti u „krilu“. Najniža  $R_{Fd}$  vrijednost u poklopcu hibrida B me nije iznenadila budući da su i prethodna dva parametra fluorescencije klorofila ukazala na smanjenje učinkovitosti fotosinteze u poklopcu. Budući da je parametar  $R_{Fd}$  direktno povezan sa stopom fotosinteze, smanjenje stope fotosinteze u poklopcu može se pripisati jednom od trošaka karnivorije. Naime, troškom karnivorije smatra se zamjena stanica koje sadrže klorofil žlijezdama koje imaju važnu ulogu u hvatanju i probavi kukaca te niski udio klorofila i dušika (Hájek i Adamec, 2010). To bi mogao biti jedan od razloga smanjenja stope fotosinteze u poklopcu hibrida B. Zato sam bila iznenađena visokom stopom fotosinteze u poklopcu hibrida C budući da je poklopac hibrida C intenzivnije crveno obojen od poklopca hibrida B te sam stoga očekivala da će i stopa fotosinteze biti niža. Također, zanimljivo je da su  $R_{Fd}$  vrijednosti u svim dijelovima vrča hibrida A bile više manje podjednake s time da je najniža vrijednost izmjerena u donjem dijelu vrča koji, iako je zelen, sadrži nešto manje klorofila *a* u odnosu na „krilo“ koje je isto zeleno. To je vjerojatno također posljedica karnivorije jer se u tom dijelu vrča nalaze probavne žlijezde.

## 5.2. UDIO FOTOSINTETSKIH PIGMENATA

Za odvijanje procesa fotosinteze neophodno je postojanje zelenih pigmenata, klorofila koji apsorbiraju sunčevu svjetlost. Od klorofila koji sudjeluju u procesu fotosinteze najvažniji je klorofil *a*, koji je plavozelene boje, a prisutan je i klorofil *b* i to u koncentraciji koja može biti trećina koncentracije klorofila *a*. Klorofil *b* je žutozelene boje (Pevalek-Kozlina, 2003).

U svakom od tri analizirana hibrida najviši udio klorofila *a* ima „krilo“ u odnosu na druge dijelove vrča unutar istog hibrida. Visoki udio klorofila *a* u „krilu“ u odnosu na ostale dijelove vrčeva nije me iznenadio budući da je „krilo“ zelene boje i najmanje sudjeluje u privlačenju i probavi kukaca. Naime, kao što je već ranije utvrđeno, jednim od troškova karnivorije smatra se zamjena stanica, koje sadrže klorofil, žlijezdama koje imaju važnu ulogu u privlačenju i probavi kukaca (Hájek i Adamec, 2010). Budući da se žlijezde koje izlučuju nektar nalaze u području poklopca i savijenog ruba otvora vrča (Plachno, 2007) znači da je količina žlijezda manja u području „krila“ u odnosu na gornji dio vrča i poklopac. Stoga „krilo“ može sadržavati više fotosintetskih pigmenata odnosno klorofila *a* i *b*. Kod roda *Sarracenia* važnu ulogu u privlačenju kukaca imaju crvene žile koje produciraju nektar i reflektiraju UV-svjetlo (Newell i Nastase, 1998). Crvene žile su uglavnom raspoređene u području poklopca i gornjeg dijela vrča gdje imaju važnu ulogu u privlačenju kukaca. Prema tome, to može biti jedan od razloga statistički značajno nižeg udjela klorofila *a* u gornjem dijelu vrča u odnosu na „krilo“ sva tri hibrida. Kod hibrida B se statistički značajno od „krila“ razlikuje i poklopac po niskom udjelu klorofila *a* što se može pripisati izrazitim crvenim žilama prisutnim u poklopcu ovog hibrida, što također doprinosi i ranije spomenutoj vrlo niskoj fotosintetskoj učinkovitosti ovog dijela vrča (Slika 9 i Slika 11).

Po udjelu klorofila *b* u odnosu na klorofil *a* razlikuje se samo hibrid A kod kojega sam uočila viši udio klorofila *b* u poklopcu u odnosu na „krilo“ te hibrid C u kojem je udio klorofila *b* u poklopcu vrlo sličan onom u „krilu“ što je vjerojatno povezano s većim  $R_{Fd}$  vrijednostima izmjerenim u poklopcu ta dva hibrida u odnosu na onu u poklopcu hibrida B. Među analiziranim dijelovima vrčeva hibrida „krilo“ hibrida B ima najviši udio klorofila *a* i *b* u odnosu na „krila“ hibrida A i C. Iako nisam primijetila značajnije morfološke razlike između „krila“ istraživanih hibrida, hibrid B je najveći u odnosu na ostala dva hibrida pa prema tome ima i najveće „krilo“. Utvrđeno je da postoji pozitivna korelacija između veličine vrča kod vrsta iz roda *Sarracenia* i količine uhvaćenog plijena (Green i Horner, 2009). Također, povećana količina plijena povezana je s većim udjelom klorofila u vrčevima roda

*Sarracenia* (Farnsworth i Ellison, 2008) pa bi jedan od razloga povećanog udjela klorofila *a* i *b* u „krilu“ hibrida B mogla biti i veća količina kukaca u vrču koji je veći u odnosu na vrčeve hibrida A i C. Kod hibrida B sam uočila i viši udio klorofila u donjem dijelu vrča u odnosu na isti dio vrča ostala dva hibrida što se također može objasniti na isti način.

Karotenoidi su važni pomoćni pigmenti koji primaju svjetlosnu energiju i prenose je do klorofila *a* u reakcijskom središtu (Pevalek-Kozlina, 2003). Uglavnom su slabije djelotvorni prenositelji energije u odnosu na klorofile (Goodwin, 1980). Među analiziranim dijelovima vrčeva hibrida A, B i C statistički se ističe „krilo“ hibrida B po visokom udjelu ukupnih karotenoida u odnosu na ostale dijelove vrča hibrida B, ali i u odnosu na dijelove vrčeva hibrida A i C. Karotenoidi imaju važnu ulogu u fotosintezi budući da su povezani s proteinima antena i dio su tilakoidnih membrana (Pevalek-Kozlina, 2003). Budući da i karotenoidi sudjeluju u primanju svjetlosne energije u svjetlosnim reakcijama fotosinteze, povećani udio karotenoida može biti povezan s povećanom količinom klorofila u „krilu“ hibrida B. Udio ukupnih karotenoida se uglavnom poklapa s rezultatima za klorofil *b* što se opet može povezati s činjenicom da su karotenoidi i klorofil *b* pomoćni pigmenti (Pevalek-Kozlina, 2003). Kod hibrida C udio klorofila *b* i karotenoida, koji je nešto veći u poklopcu u odnosu na gornji i donji dio vrča, zasigurno doprinosi i većoj stopi fotosinteze u ovom dijelu vrča.

Prema Ramel i sur. (2012) karotenoidi imaju i vrlo važnu zaštitnu ulogu. Naime, slobodni radikali koji nastaju u biljkama pod utjecajem UV-zračenja mogu štetno djelovati na biljku i uzrokovati oštećenja makromolekula kao što su lipidi i proteini što posljedično dovodi do smanjenja fotosintetske učinkovitosti i smanjenja rasta. Karotenoidi predstavljaju prvu liniju obrane od spomenutih vrlo reaktivnih kemijskih vrsta (Ramel i sur., 2012). Kod hibrida A udio karotenoida je statistički značajno viši u poklopcu u odnosu na gornji i donji dio vrča hibrida A što se može objasniti činjenicom da je poklopac najviše izložen sunčevoj svjetlosti pa bi zaštita od fotooštećenja mogla biti uzrok povećanog udjela karotenoida u poklopcu hibrida A. Kod hibrida C se „krilo“ i poklopac statistički ističu visokim udjelom ukupnih karotenoida, u odnosu na gornji i donji dio vrča, pri čemu je vrijednost u „krilu“ nešto viša, ali ne statistički značajno u odnosu na poklopac. Visoka vrijednost u poklopcu hibrida C bi također mogla biti povezana sa zaštitom od fotooštećenja.

### 5.3. UDIO FENOLNIH SPOJEVA

Fenolni spojevi se ubrajaju u skupinu sekundarnih metabolita kod biljaka koji imaju važnu ulogu u zaštiti biljke od herbivora, obojenosti cvjetova i listova, ali i brojne druge uloge (Pevalek-Kozlina, 2003). Jedna od uloga fenolnih spojeva je i zaštita od oštećenja pod utjecajem UV i vidljivog dijela spektra te antioksidacijska zaštita (Close i McArthur, 2002). U ovom istraživanju određivala sam udio ukupnih fenola, flavonoida i antocijana u različitim dijelovima vrčeva tri analizirana hibrida iz roda *Sarracenia*.

Udio ukupnih fenola je u ovome istraživanju bio najviši u poklopcu u odnosu na ostale dijelove vrča svakog pojedinog hibrida. Istraživanja su pokazala kako brojni fenolni spojevi imaju antioksidacijski potencijal i mogu zaštititi biljku od fotooštećenja pod utjecajem visoko reaktivnih kemijskih vrsta kao što su singletni kisik, tripletni klorofil i hidroksilni radikali (Close i McArthur, 2002). Budući da je poklopac „najviši“ dio vrča kod vrsta iz roda *Sarracenia*, visoki udio ukupnih fenola može se pripisati zaštiti od nastajanja slobodnih radikala koji bi pod utjecajem visokog intenziteta osvjjetljenja mogli nastajati u poklopcu. Visoki udio ukupnih fenola u poklopcu može se povezati i s ulogom obojenih fenolnih spojeva, kao što je antocijan, u privlačenju kukaca na način da dijelovi vrča koji su intenzivnije obojeni više privlače kukce. Udio ukupnih fenola je statistički bio značajno viši u poklopcu hibrida A i C u odnosu na poklopac hibrida B. Budući da poklopac hibrida B ima najviše zeleno obojenih dijelova, pretpostavljam da je to uzrok smanjenog udjela ukupnih fenola u poklopcu hibrida B. Također, kako je u poklopcu hibrida B izmjeren niži udio ukupnih fenola u odnosu na isti dio vrča ostala dva hibrida, znači da je i zaštita od visokog intenziteta svjetlosti bila niža u spomenutom dijelu vrča. Budući da je udio flavonoida u poklopcu hibrida B prilično visok, niži udio ukupnih fenola, a time i smanjena zaštita od visokog intenziteta svjetlosti mogla bi se pripisati nedostatku drugih spojeva koji sudjeluju u zaštiti od UV zračenja kao što su na primjer fenolne kiseline. Brojna istraživanja ukazala su na povezanost akumulacije antioksidacijskih molekula s utjecajem stresnih čimbenika iz okoliša (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011). Fenolne kiseline zajedno s drugim antioksidacijskim molekulama pokazuju značajnu antioksidacijsku aktivnost (Cai i sur., 2004). Budući da je utvrđena niža fotosintetska učinkovitost u gornjem dijelu vrča i poklopcu hibrida B, moguće je da su spomenuti dijelovi vrča bili oštećeni pod utjecajem visokog intenziteta svjetlosti zbog nedostatka fenolnih kiselina.



Utvrđeno je kako je udio klorofila *a* i *b* ponekad obrnuto povezan s udjelom sekundarnih biljnih metabolita na način da ulaganje u sintezu sekundarnih biljnih metabolita negativno utječe na sintezu klorofila (Ibrahim i sur., 2010). Međutim, izmjerene vrijednosti udjela klorofila bile su slične u sva tri hibrida. S druge strane, udio ukupnih fenola je bio niži u „krilu“ u odnosu na poklopac u sva tri hibrida, a ujedno je „krilo“ imalo najviši udio klorofila *a* dok je poklopac imao niže vrijednosti u svakom od analiziranih hibrida. Na temelju toga moglo bi se zaključiti da je viši udio ukupnih fenola u poklopcu povezan s nižim udjelom klorofila u istom dijelu vrča.

Flavonoidi su važna skupina biljnih sekundarnih metabolita koji se ubrajaju u fenolne spojeve. Flavonoidi obuhvaćaju razne skupine spojeva koji imaju zaštitnu ulogu, a udio flavonoida u biljnom tkivu često je povišen u uvjetima stresa kao što su suša, niske temperature, ranjavanje tkiva te oštećenja pod utjecajem suviška UV-svjetla (Jaakola i sur., 2004). Glavna uloga flavonoida je zaštititi biljku od oksidativnog stresa zahvaljujući njihovom antioksidacijskom potencijalu i sposobnosti gašenja slobodnih radikala (Banasiuk i sur., 2012). U skupinu biljnih flavonoida, osim antocijanina se ubrajaju i flavoni i flavonoli koji imaju zaštitnu ulogu od UV-B zračenja (Pevalek-Kozlina, 2003). U provedenom istraživanju uočila sam najviši udio flavonoida u poklopcu svakog od analiziranih hibrida pri čemu su kod hibrida A i B vrijednosti u poklopcu bile statistički značajno više u odnosu na ostale dijelove vrča. Najniže vrijednosti sam uočila u donjem dijelu vrča svakog od hibrida, u odnosu na ostale dijelove vrčeva, pri čemu su te vrijednosti bile statistički značajno niže u odnosu na poklopac. Kako flavonoidi imaju važnu zaštitnu ulogu od visokog intenziteta UV-zračenja, mogući razlog visokog udjela flavonoida u poklopcu bi bila zaštita od direktnog sunčevog svjetla budući da je poklopac najviše izložen direktnoj svjetlosti. Zanimljivo je da sam u „krilu“, osobito u hibrida C i nešto manje u hibrida A, izmjerila viši udio flavonoida u odnosu na donji dio vrča što bi se također moglo objasniti zaštitnom ulogom flavonoida budući da je „krilo“ izloženiije svjetlosti nego donji dio vrča.

Poklopac je prošaran brojnim crvenim žilama koje imaju važnu ulogu u privlačenju kukaca (Newell i Nastase, 1998). Kod vrsta iz roda *Sarracenia* flavonoidi imaju važnu ulogu u obojanosti listova pri čemu se spomenuta uloga pripisuje antocijaninima i kopigmentima (Sheridan i Griesbach, 2001). Visoki udio flavonoida u poklopcima svih hibrida mogao bi se objasniti na način da će crveniji dijelovi vrča kod hibrida iz roda *Sarracenia* imati ujedno i viši udio flavonoida odnosno najviše antocijana. U provedenom istraživanju uočila sam da je najviši udio flavonoida prisutan u poklopcu u odnosu na druge dijelove vrča na temelju čega

bi se moglo zaključiti da postoji određena povezanost između udjela flavonoida i karakteristika vrčeva za što bolje privlačenje kukaca. Kukci su privučeni u područje poklopca koji služi kao „platforma“ za slijetanje (D`Amato, 2013) i u područje savijenog ruba otvora vrča gdje se izlučuje nektar (Rice, 2006). Oni dijelovi vrča koji imaju najvažniju ulogu u privlačenju kukaca imaju ujedno i viši udio flavonoida. Donji dio vrča, koji obuhvaća cijev vrča, ima najmanji udio flavonoida, a to bi se moglo objasniti na način da uloga cijevi vrča nije u privlačenju kukaca nego u razgradnji uhvaćenog plijena (Glenn i Bodri, 2012). Mjerenje udjela antocijana potvrdilo je ove rezultate jer je u odnosu na ostale dijelove vrčeva najviši udio antocijana izmjereno upravo u poklopcu svakog od analiziranih hibrida. Kao što sam već navela, za crvenu obojanost vrčeva kod roda *Sarracenia* odgovorni su upravo antocijani (Sheridan i Griesbach, 2001). Dakle, poklopac i gornji dio vrča koji su kod vrsta iz roda *Sarracenia* crveno obojani trebali bi sadržavati viši udio antocijana u odnosu na donji dio vrča i „krilo“. Dobiveni rezultati su u skladu s time obzirom da sam najveći udio antocijana zabilježila u poklopcu. Po udjelu antocijana, odmah iza poklopca je gornji dio vrča koji se kod hibrida B statistički značajno ni ne razlikuje od poklopca. Istraživanja koja su proveli Ichiishi i sur. (1999) na vrstama iz roda *Drosera* su pokazala kako će biljke koje su crveno obojane ili imaju crveno obojane dijelove više privlačiti plijen od onih zeleno obojanih. Tako će neke vrste iz rodova *Drosera* i *Dionaea* u uvjetima nedostatka potrebnih mineralnih tvari, osobito dušika, povećati intenzitet crvene boje kako bi privukle više plijena. Uočeni obrazac se može primijeniti i na druge crveno obojene vrste mesojednih biljaka pa tako i na vrste iz roda *Sarracenia* (Ichiishi i sur., 1999). Dakle, poklopac i gornji dio vrča, budući da su crveni, sudjeluju u privlačenju plijena što znači da je udio antocijana povezan i s učinkovitosti privlačenja plijena. Najniži udio antocijana među poklopcima hibrida A, B i C sam uočila u poklopcu hibrida B koji je imao najviše zeleno obojanih dijelova u području poklopca. S druge strane, najviši udio antocijana izmjereno je u poklopcu hibrida A što nisam očekivala budući da je poklopac hibrida C intenzivnije crveno obojen, a poklopac hibrida A ima i svijetla područja skoro bijele boje. S obzirom da u antocijane spadaju i leukoantocijani koji nisu obojani moguće je da oni doprinose većem udjelu antocijana. Razlog visokom udjelu antocijana u poklopcu hibrida A bi mogao biti oblik poklopca koji se razlikuje od poklopca hibrida B i C te je time možda izložen većem intenzitetu UV-zračenja. Kako bi se zaštitilo od oštećenja pod utjecajem visokog intenziteta osvjetljenja, tkivo sintetizira više antocijana koji također imaju važnu ulogu u zaštiti biljaka od svjetlosnog oštećenja (Close i McArthur, 2002).

#### 5.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Prema Ledford i Niyogi (2005) u biljkama pod utjecajem stresnih čimbenika iz okoliša dolazi do poremećaja u ravnoteži između količine primljene i količini iskorištene svjetlosti u procesu fotosinteze. To dovodi do stvaranja visoko reaktivnih kemijskih vrsta kao što je singletni kisik koji reagira s važnim biološkim molekulama. Visoko reaktivne kemijske vrste uzrokuju modifikacije proteina, nukleinskih kiselina i lipida. Utvrđeno je kako visoko reaktivne kemijske vrste kisika uzrokuju oštećenje reakcijskog centra fotosistema II i dovode do fotoinhibicije (Ledford i Niyogi, 2005). Biljke sintetiziraju veliki broj spojeva koji djeluju kao antioksidansi i mogu „gasiti“ visoko reaktivne kemijske vrste te na taj način minimalizirati fotooštećenje (Close i McArthur, 2002).

U provedenom istraživanju uočila sam antioksidacijsku aktivnost višu od 90% u svim dijelovima vrčeva svih analiziranih hibrida. Dakle, antioksidacijska aktivnost je bila vrlo visoka u svim dijelovima vrčeva svih analiziranih hibrida. Statistički se značajno razlikuju jedino gornji dio vrča hibrida B i donji dio vrča hibrida C pri čemu gornji dio vrča hibrida B pokazuje statistički značajno višu vrijednost od donjeg dijela vrča hibrida C. Najvišu antioksidacijsku aktivnost sam očekivala u poklopcu svih hibrida u kojem sam uočila najviši udio antocijana, flavonoida i ukupnih fenola, međutim rezultati se nisu poklapali s očekivanjima. Istraživanja su pokazala kako postoji povezanost u koncentraciji fenolnih spojeva i vezanju slobodnih radikala te da prisutnost fenolnih spojeva znatno pridonosi antioksidacijskom potencijalu biljke (Dudonne i sur., 2009). U skladu s istraživanjima Dudonne i sur. (2009), koji su provodili istraživanja na različitim vrstama biljaka, su razlike u antioksidacijskoj aktivnosti gornjeg dijela vrča hibrida B i donjeg dijela vrča hibrida C. Gornji dio vrča hibrida B je pokazao viši udio flavonoida i antocijana u odnosu na donji dio vrča hibrida C, međutim razlika nije statistički značajna. S obzirom da rezultati ovog istraživanja nisu potvrdili povezanost fenolnih spojeva s antioksidacijskom aktivnošću moguće je da u roda *Sarracenia* i neki drugi spojevi doprinose antioksidacijskoj aktivnosti. Gornji dio vrča hibrida B pokazuje malo viši udio ukupnih karotenoida u odnosu na donji dio vrča hibrida C pa bi to također mogao biti uzrok nešto višem antioksidacijskom potencijalu. Karotenoidi su isto važni antioksidansi te je utvrđeno da biljke koje imaju nedostatak karotenoida ne mogu normalno provoditi fotosintezu te ne podnose čak niti niže intenzitete osvjetljenja (Ledford i Niyogi, 2005).

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata provedenog istraživanja na četiri različita dijela vrča tri morfološki različita hibrida iz roda *Sarracenia* mogu zaključiti slijedeće:

- određivanje fotosintetske učinkovitosti ukazalo je na smanjenje učinkovitosti fotosinteze u gornjem dijelu vrča i poklopcu hibrida B, te na najvišu učinkovitost u „krilu“ svih analiziranih hibrida. Također, utvrđeno je da hibrid C ima višu stopu fotosinteze u odnosu na hibride A i B. Poklopac i gornji dio vrča su crveno obojeni te je dokazano da oni sadrže manje klorofila, a više fenolnih spojeva u odnosu na zeleno „krilo“. Na temelju toga se može zaključiti da je smanjenje učinkovitosti fotosinteze u poklopcu i gornjem dijelu vrča povezano s troškovima karnivorije.
- udio klorofila *a* najviši je u „krilu“ svih analiziranih hibrida u odnosu na ostale dijelove vrča. „Krilo“ hibrida B se svojim visokim vrijednostima udjela klorofila *a* i *b* te ukupnih karotenoida ističe u odnosu na ostale dijelove vrča ovog hibrida, ali i u odnosu na ostale hibride. „Krilo“ je kod svih analiziranih hibrida zelene boje, najmanje sudjeluje u privlačenju i hvatanju kukaca, u odnosu na ostale dijelove vrča, te se na temelju toga može zaključiti da su viši udio fotosintetskih pigmenata te viša fotosintetska učinkovitost u „krilu“ povezani s ulogom ovog dijela vrča u fotosintezi.
- u sva tri hibrida roda *Sarracenia* poklopac vrča ima najviši udio ukupnih fenola, flavonoida i antocijana u odnosu na ostale dijelove vrča. Poklopac hibrida B, koji ima najviše zeleno obojenih dijelova, u odnosu na poklopce hibrida A i C, ima najmanji udio antocijana. U rodu *Sarracenia* poklopac je uglavnom intenzivno crveno obojen i ima važnu ulogu u privlačenju kukaca, a kao „najviši“ dio vrča najviše je izložen svjetlosti pa se stoga može zaključiti da su fenolni spojevi, točnije flavonoidi i antocijani povezani s obojenošću određenih dijelova vrčeva, odnosno privlačenjem kukaca i zaštitom od svjetlosnog oštećenja.
- antioksidacijska aktivnost je visoka u svim dijelovima vrčeva svih hibrida. Među hibridima se ističu jedino gornji dio vrča hibrida B s nešto višom vrijednosti i donji dio vrča hibrida C s nešto nižom vrijednosti. Budući da je antioksidacijska aktivnost visoka u svim dijelovima vrčeva svih hibrida, u ovome istraživanju nije dokazana povezanost antioksidacijske aktivnosti s udjelom fenolnih spojeva.

## 7. LITERATURA

- Adamec, L., (2010): Dark respiration of leaves and traps of terrestrial carnivorous plants: are there greater energetic costs in traps? *Central European Journal of Biology* 5(1): 121 – 124
- Awah, F. M., Uzoegwu, P. N., Ifeonu, P., Oyugi, J. O., Rutherford, J., Yao X., Fehrmann, F., Fowke, K. R., Eze, M. O., (2012): Free radical scavenging activity, phenolic contents and cytotoxicity of selected Nigerian medicinal plants. *Food Chemistry* 131: 1279 – 1286
- Banasiuk, R., Kawiak, A., Królicka, A., (2012): *In vitro* cultures of carnivorous plants from the *Drosera* and *Dionaea* genus for the production of biologically active secondary metabolites. *BioTechnologia* 93(2): 87 – 96
- Bruzzese, B. M., Bowler, R., Massicotte, H. B., Fredeen, A. L., (2010): Photosynthetic light response in three carnivorous plant species: *Drosera rotundifolia*, *D. capensis* and *Sarracenia leucophylla*. *Photosynthetica* 48(1): 103 – 109.
- Bueckert, R. A., (2013): Photosynthetic carbon fixation and crops. *Prairie Soils and Crops* 6: 64 – 77
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H., (2004): Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences* 74: 2157 – 2184
- Chatzistathis, T. A., Papadakis, I. E., Therios, I. N., Giannakoula, A., Dimassi, K., (2011): Is chlorophyll fluorescence technique a useful tool to assess manganese deficiency and toxicity stress in olive plants? *Journal of Plant Nutrition* 34: 98 – 114
- Close, D. C., McArthur, C., (2002): Rethinking the role of many plant phenolics – protection from photodamage not herbivores? *Oikos* 99: 166 – 172
- D'Amato P., (2013): *The savage garden, cultivating carnivorous plants*. Ten Speed Press, New York
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., Mérillon, J.M., (2009): Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(5): 1768 – 1774
- Ellison, A. M., (2006): Nutrient limitation and stoichiometry of carnivorous plants. *Plant Biology* 8: 740 – 747
- Ellison, A. M., Adamec, L., (2011): Ecophysiological traits of terrestrial and aquatic carnivorous plants: are the costs and benefits the same? *Oikos* 120: 1721 – 1731

- Ellison, A. M., Farnsworth, E. J., (2005): The cost of carnivory for *Darlingtonia californica* (Sarraceniaceae): evidence from relationships among leaf traits. *American Journal of Botany* 92(7): 1085 – 1093
- Farnsworth, E. J., Ellison, A. M., (2008): Prey availability directly affects physiology, growth, nutrient allocation and scaling relationships among leaf traits in 10 carnivorous plant species. *Journal of Ecology* 96: 213 – 221
- Ghasemzadeh, A., Ghasemzadeh, N., (2011): Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(31): 6697 – 6703
- Glenn, A., Bodri, M. S., (2012): Fungal Endophyte Diversity in Sarracenia. *PLoS ONE* 7 (3): 1 – 7
- Goodwin, T. W., (1980): The biochemistry of the carotenoids. Vol. 1. Plants. Chapman & Hall, London
- Green, M. L., Horner, J. D., (2007): The relationship between prey capture and characteristics of the carnivorous pitcher plant, *Sarracenia alata* Wood. *American Midland Naturalist* 158: 424 – 431
- Hájek, T., Adamec, L., (2010): Photosynthesis and dark respiration of leaves of terrestrial carnivorous plants. *Biologia* 65(1): 69 – 74
- Hsu, C. Y., Chao, P. Y., Hu, S. P., Yang, C. M., (2013): The Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Chlorophylls and Pheophytins. *Food and Nutrition Sciences* 4: 1 – 8
- Ibrahim, M. H., Jaafar, H. Z. E., Rahmat, A., Rahman, Z. A., (2011): The relationship between phenolics and flavonoids production with total non structural carbohydrate and photosynthetic rate in *Labisia pumila* Benth. under high CO<sub>2</sub> and nitrogen fertilization. *Molecules* 16: 162 – 174
- Ichiishi, S., Nagamitsu, T., Kondo, Y., Iwashina, T., Kondo, K., Tagashira, N., (1999): Effects of macro-components and sucrose in the medium on in vitro red- color pigmentation in *Dionaea muscipula* Ellis and *Drosera spathulata* Labill. *Plant Biotechnology* 16(3): 235 – 238
- Jaakola, L., Määttä – Riihinen, K., Kärenlampi, S., Hohtola, A., (2004): Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta* 218: 721 – 728.
- Johnson, R. L., (2007): Carnivorous plants. Lerner Publications Company, Minneapolis

- Karlson, P., (1993): Biokemija. Školska knjiga, Zagreb
- Ledford, H. K., Niyogi, K. K., (2005): Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant, Cell and Environment* 28: 1037 – 1045
- Lichtenthaler, H. K., (1987): Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Methods in Enzymology* 148: 350 – 382
- Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C., Knapp, M., (2005): How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio RfD of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica* 43(3): 379 – 393
- Lichtenthaler, H. K., Babani, F., (2004): Light adaptation and senescence of the photosynthetic apparatus. Changes in pigment composition, chlorophyll fluorescence parameters and photosynthetic activity. U: Papageorgiou, G. C., Govindjee (ur.) *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*. Springer, The Netherlands, str. 713 – 736
- Maxwell, K., Johnson, G. N., (2000): Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51(345): 659 – 668
- Mensor, L. L., Menezes, F. S., Leitão, G. G., Reis, A. S., dos Santos, T. C., Coube, C. S., Leitão, S. G., (2001): Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research* 15: 127 – 130
- Moran, J. A., Booth, W. E., Charles, J. K., (1999): Aspects of pitcher morphology and spectral characteristics of six Bornean *Nepenthes* pitcher plant species: implications for prey capture. *Annals of Botany* 83: 521 – 528
- Neales, T. F., Incoll, L. D., (1968): The control of leaf photosynthesis rate by the level of assimilate concentration in the leaf: A review of the hypothesis. *The Botanical Review* 34: 107 – 125
- Newell, S. J., Nastase, A. J., (1998): Efficiency of insect capture by *Sarracenia purpurea* (*Sarraceniaceae*), the northern pitcher plant. *American Journal of Botany* 85(1): 88 – 91
- Paiva, E. A. S., Isaias, R. M. D. S., Vale, F. H. A., Queiroz, C. G. D. S., (2003): The influence of light intensity on anatomical structure and pigment contents of *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. *Purpurea Boom* (*Commelinaceae*) leaves. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46: 617 – 624
- Pavlovič, A., (2011): Photosynthetic characterization of Australian pitcher plant *Cephalotus follicularis*. *Photosynthetica* 49(2): 253 – 258

- Pavlovič, A., Masaričova, E., Hudak, J., (2007): Carnivorous syndrome in Asian pitcher plants of the genus *Nepenthes*. *Annals of Botany* 100: 527 – 536
- Pevalek-Kozlina, B., (2003): *Fiziologija bilja*. Profil, Zagreb
- Płachno, B. J., (2007): “Sweet but dangerous”: nectaries in carnivorous plants. *Acta Agrobotanica* 60(2): 31 – 37
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J., Shahabimajd, N., (2006): Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* 5(11): 1142 – 1145
- Ramel, F., Birtic, S., Cuiné, S., Triantaphylidés, C., Ravanat, J. L., Havaux, M., (2012): Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. *Plant Physiology* 158: 1267 – 1278
- Rice, B. A., (2006): *Growing carnivorous plants*. Timber Press. Inc., Portland
- Sheridan, P., (1997): Genetics of *Sarracenia* leaf and flower color. *Carnivorous Plant Newsletter* 26: 51 – 64
- Sheridan, P. M., Griesbach, R. J., (2001): Anthocyanidins of *Sarracenia* L. flowers and leaves. *Hortscience* 36(2): 384
- Sheridan, P. M., Mills, R. R., (1998): Genetics of anthocyanin deficiency in *Sarracenia* L. *Hortscience* 33(6): 1042 – 1045
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M., (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152 – 178
- Slack, A., (2000): *Carnivorous plants*. MIT Press, Yeovil
- Tanaka, A., Makino, A., (2009): *Photosynthetic Research in Plant Science*. *Plant Cell Physiology* 50(4): 681 – 683
- Vidaković – Cifrek, Ž., Pevalek – Kozlina, B., Tkalec, M., Babić, M., Radić Brkanac, S., (2013): *Praktikum iz fiziologije bilja*. Skripta za internu upotrebu. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Wellburn, A. R., (1994): The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144: 307 – 313
- Zamora, R., Gómez, J. M., Hódar, J. A., (1998): Fitness responses of a carnivorous plant in contrasting ecological scenarios. *Ecology* 79(5): 1630 – 1644



- Zanella, F., Watanabe, T. M., da Silva Lima, A. L., Schiavinato, M. A., (2004): Photosynthetic performance in jack bean [*Canavalia ensiformis* (L.) D.C.] under drought and after rehydration. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 16(3): 181 – 184
- Korištene internet stranice:  
<http://www.sarracenia.com/faq/faq5521.html>

## ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: MARTINA TUŠEK  
Adresa: Galovec Začretski 43b, Sv.Križ Začretje 49223  
Datum i mjesto rođenja: 19.10.1991., Zabok  
Telefon: 099/ 684 3988, 049/ 342 524  
e-mail: martina.tusek@hotmail.com

### OBRAZOVANJE:

2010. Fakultet: Prirodoslovno-matematički fakultet – Biološki odsjek, Zagreb  
Smjer: Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije -  
nastavnički smjer  
2006.-2010. Srednja škola Pregrada,  
Smjer: Farmaceutski tehničar  
1998.-2006. Osnovna škola Ljudevit Gaj Krapina

### RADNO ISKUSTVO:

3/2015. – 7/2015. Laboratorijska stručna praksa u Laboratoriju za biljnu fiziologiju, Botanički  
zavod, Biološki odsjek, Prirodoslovno matematički fakultet, Zagreb  
1/2015. – 3/2015. Metodička praksa nastave kemije u Osnovnoj školi Rudeš u Zagrebu  
10/2014. – 12/2014. Metodička praksa nastave biologije u V. gimnaziji u Zagrebu

### STUDENTSKI POSLOVI:

Inventura u Plodinama

### POSEBNE VJEŠTINE:

Strani jezici: Engleski: pasivno u govoru i pismu  
Računala: MS Office, GIMP, Windows Movie Maker  
Vozačka dozvola: B kategorije

### INTERESI I AKTIVNOSTI:

Sviranje flaute u „Gradskom puhačkom orkestru Krapina“

### NAGRADE I PRIZNANJA:

Sudjelovanje na manifestaciji Noć biologije 2012. – 2015. godine