

**»Mladi za napredek Maribora 2017«  
34. srečanje**

**ZAKAJ VSI RASTLINSKI LISTI V JESENI NISO RDEČI?**

Raziskovalno področje: BIOLOGIJA

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

Avtor: JAKOB ANDRIC  
Mentor: ZDENKA KEUC  
Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

**Maribor, 2017**

**»Mladi za napredek Maribora 2017«  
34. srečanje**

**ZAKAJ VSI RASTLINSKI LISTI V JESENI NISO RDEČI?**

Raziskovalno področje: BIOLOGIJA

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO



**Maribor, 2017**

## VSEBINA

---

1 UVOD .....	12
1.1 Raziskovalno vprašanje .....	13
1.2 Hipoteze .....	14
1.2.1 Razlaga hipotez .....	14
2 TEORETIČNO OZADJE .....	15
2.1 Odpadanje listov .....	15
2.1 Asimilacijski pigmenti – klorofili .....	16
2.1.1 Feofitini .....	19
2.2 Karotenoidi .....	19
2.3 Antocianidini .....	20
2.4 Škodljivo delovanje svetlobe .....	22
2.4.1 Odvajanje presežka energije .....	23
3 DOLOČANJE KLOROFILOV IN KAROTENOIDOV Z UV-VIS SPEKTROSKOPIJO IN FLUOROMETRIJO .....	24
3.1 UV-VIS spektroskopija .....	24
3.1.1 Interpretacija podatkov uv-vis spektroskopije .....	25
3.2 Fluorimetrija .....	25
3.3 Kvantifikacija rastlinskih barvil .....	27
3.4 Kromatografske metode .....	27
3.5 Meritev koncentracije nitratov in nitritov v ekstraktih listnih barvil ...	28
3 PRAKTIČNI DEL .....	29
3.1 Ekstrakcija listnih barvil .....	30
3.2 Tankoplastna kromatografija – ločitev listnih barvil .....	32
3.3 Meritev koncentracije nitratov in nitritov v ekstraktih listnih barvil..	33
4 REZULTATI .....	34
4.1 Identifikacija listnih barvil in koncentracija nitratov ter nitritov v posameznih ekstraktih .....	34
4.1.1 Ambrovec .....	34
4.1.2 Zimzelena magnolija .....	35
4.1.3 Navadna ciklama .....	35

4.2 UV-VIS analiza vzorcev in določitev listnih barvil.....	35
4.2.1 UV-VIS spektri ekstraktov in rastlinskih barvil.....	35
4.3 Meritve absorpcij za posamezna listna barvila.....	38
4.4 Izračun koncentracije posameznih listnih barvil .....	39
4.6 Spreminjanje koncentracije posameznih barvil v preučevanih listih rastlin.....	41
4.6.1 Ambrovec.....	41
4.6.2 Navadna ciklama.....	42
4.6.3 Zimzelena magnolija .....	44
4.7 Kolorimetrična določitev vrednosti nitratov v ambrovcu, magnoliji in ciklami.....	48
4.7.1 Ambrovec.....	48
4.7.2 Navadna ciklama.....	51
4.7.3 Zimzelena magnolija .....	51
4.8 Meritve fluorescence.....	51
5 RAZPRAVA .....	54
5.1 Ekstrakcija in TLC analiza .....	54
5.2 koncentracija listnih barvil .....	54
5.3 Meritve skupnih nitratov .....	56
5.4 Meritve fluorescence .....	58
5.5 Vpliv pH na fluorescenco ekstraktov listnih barvil .....	60
6 ZAKLJUČKI .....	60
7 DRUŽBENA ODGOVORNOST .....	64
8 UPORABLJENI VIRI .....	65
9 PRILOGA.....	68

## KAZALO ORGANIGRAMOV

ORGANIGRAM 1. Načrt dela .....	29
--------------------------------	----

## KAZALO PREGLEDNIC

PREGLEDNICA 1. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v posameznih ekstraktih (ambrovec, 2.11.2016).....	34
--	----

PREGLEDNICA 2. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v zimzeleni magnoliji (2.11.2016).....	35
PREGLEDNICA 3. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v gozdni ciklami (28.11.2016) .....	35
PREGLEDNICA 4. Absorbance posameznih klorofilov pri njihovih značilnih valovnih dolžinah (vzorec listi ambrovca) .....	38
PREGLEDNICA 5. Absorbance karotenoidov in antocianov pri njihovih značilnih valovnih dolžinah za ambrovec .....	38
PREGLEDNICA 6. Absorbance klorofilov pri njihovih značilnih valovnih dolžinah za zimzeleno magnolijo .....	38
PREGLEDNICA 7. Absorbance karotenoidov in antocianov pri njihovih značilnih valovnih dolžinah za zimzeleno magnolijo.....	39
PREGLEDNICA 8. Absorbance klorofilov pri njihovih značilnih valovnih dolžinah za ciklamo .....	39
PREGLEDNICA 9. Absorbance karotenoidov in antocianov pri njihovih značilnih valovnih dolžinah za ciklamo .....	39
PREGLEDNICA 10. koncentracija klorofil a in b listih ambrovca.....	41
PREGLEDNICA 11. Klorofil a in b izražena v mg/g rastlinskih listov ter skupni klorofili	41
PREGLEDNICA 12. Skupna količina karotenov, antocianinov in klorofilov v listih ambrovca.....	41
PREGLEDNICA 13. Količina klorofila a in b v navadni ciklami .....	42
PREGLEDNICA 14. Klorofil a in b, izražena v mg/g rastlinskih listov ter skup. klorofili..	43
PREGLEDNICA 15. Skupna količina karotenov, antocianinov in klorofilov v listih navadne ciklame .....	43
PREGLEDNICA 16. Količina klorofila a in b v zimzeleni magnoliji.....	44
PREGLEDNICA 17. Klorofil a in b izražena v mg/g rastlinskih listov ter skupni klorofili v zimzeleni magnoliji.....	45
PREGLEDNICA 18. Skupna količina karotenov, antocianinov in klorofilov v listih zimzeleni magnoliji.....	45
PREGLEDNICA 19. Vsebnost nitratov v <b>zelenih</b> listih ambrovca.....	48
PREGLEDNICA 20. Vsebnost nitratov v <b>rumenih</b> listih ambrovca.....	48
PREGLEDNICA 21. Vsebnost nitratov v <b>oranžnih</b> listih ambrovca.....	48

PREGLEDNICA 22. Vsebnost nitratov v <b>rdečih</b> listih ambrovca .....	48
PREGLEDNICA 23. Vsebnost nitratov v <b>rdeče-zelenih</b> listih ambrovca .....	49
PREGLEDNICA 24. Gibanje koncentracije nitratov v vseh listih ambrovca v novembru 2016.....	49
PREGLEDNICA 25. Vsebnost nitratov pri navadni ciklami.....	51
PREGLEDNICA 26. Vsebnost nitratov pri zimzeleni magnoliji .....	51
PREGLEDNICA 27. Fluorescenca klorofila pri ambrovcu.....	53
PREGLEDNICA 28. Fluorescenca klorofila pri zimzeleni magnoliji.....	53
PREGLEDNICA 29. Fluorescenca klorofila pri navadni ciklami.....	53
PREGLEDNICA 30. Meritve aktivnosti fluorescence pri različnih pH vrednostih .....	53
PREGLEDNICA 31. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v posameznih ekstraktih (ambrovec, 5. 11. 2016).....	69
PREGLEDNICA 32. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v posameznih ekstraktih (ambrovec, 9. 11. 2016).....	70
PREGLEDNICA 33. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v posameznih ekstraktih (ambrovec, 11. 11. 2016) .....	71
PREGLEDNICA 34. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v posameznih ekstraktih (ambrovec, 20. 11. 2016).....	72
PREGLEDNICA 35. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v posameznih ekstraktih (ambrovec, 28.11.2016) .....	72
PREGLEDNICA 36. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v zimzeleni magnoliji (28. 11. 2016) .....	73
PREGLEDNICA 37. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v zimzeleni magnoliji (9. 11. 2016) .....	73
PREGLEDNICA 38. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v zimzeleni magnoliji (11. 11. 2016) .....	73
PREGLEDNICA 39. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v zimzeleni magnoliji (5.11.2016).....	74
PREGLEDNICA 40. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v navadni ciklami (20. 11. 2016).....	74
PREGLEDNICA 41. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v navadni ciklami (11. 11. 2016).....	74

PREGLEDNICA 42. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v navadni ciklami (9. 11. 2016).....	74
PREGLEDNICA 43. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v navadni ciklami (5. 11. 2016).....	75

## KAZALO SLIK

SLIKA 1. Razgradnja klorofila (povzeto Joseph s sod., 1999).....	15
SLIKA 2. Shematski prikaz svetlobnih reakcij fotosinteze (pov. po Neil s sod., 2002).....	17
SLIKA 3. Zgradba klorofilov in njihova absorpcija (100 % metanol). (A) Kemijska zgradba klorofila <i>a</i> in strukturne razlike v primerjavi z drugimi klorofili. (B) Absorbance klorofila <i>d</i> in <i>f</i> v primerjavi s klorofilom <i>a</i> . (C) Absorbance klorofila <i>b</i> in <i>8-vinil klorofila a</i> v primerjavi s klorofilom <i>a</i> . (povzeto po Chen, Scheer, 2013).....	18
SLIKA 4. Klorofil <i>a</i> in klorofil <i>b</i> (Boh, 2000).....	18
SLIKA 5. Klorofil in njegovi razgradni produkti (Jacobson, 1976).....	19
SLIKA 6. Feofitin (Plantagea, 2016).....	19
Slika 7. Absorpcijski spektri klorofila <i>a</i> , klorofila <i>b</i> in karotenoidov višjih rastlin (Likar, 2016).....	20
SLIKA 8. Strukturna formula $\beta$ -karotena .....	20
SLIKA 9. Strukturna formula ksantofila luteina (Yang s sod., 2012).....	20
Slika 10. Odpadli listi nepozebnika ( <i>lat. Hamamelis Virginiana</i> ); levo. Pri sekciji lista (desno; 250-kratna povečava) opazimo, da je večina rumenega pigmenta shranjenega v kloroplastih, kjer se je razpad klorofila zgodil skoraj v celoti (Gould, 2002).....	21
SLIKA 11. (Levo) listi rdečega javorja ( <i>lat. Quercus Rubra</i> ) in sekcija lista (desno), ki kaže, da so antociani locirani v vakuolah palisadnih celic v listnem epidermisu, tik pod površino(Gould, 2002). Pri rdečih listih klorofil v kloroplastih razpada, vendar se hkrati kopičijo rdeči antociani v vakuoli.....	21
SLIKA 12. Navadna ciklama( <i>Cyclamen purpurascens</i> ).....	22
SLIKA 13. Vzbujanje klorofila in oddajanje energije s fluorescenco. Desno je prikazan absorpcijski spekter klorofila in spekter oddane svetlobe (fluorescenca) (prirejeno po Taiz in Zeiger, 1998).....	27

SLIKA 14. sistem enačb za izračun koncentracije klorofila a, b in karotenoidov (povzeto po Lichtenthaler in Buschmann, 2001).....	27
SLIKA 15. Reakcija nitritnih ionov z benzen sulfonilno kislino (Cotič Gabrijel, 2012) .....	28
SLIKA 16. listi in drevo ambrovca ( <i>Liquidambar styraciflua</i> ) (levo – november 2016 in desno januar 2017).....	30
SLIKA 17. Zimzelena magnolija ( <i>Magnolia grandiflora</i> ) lesno – november 2016 in desno januar 2017 .....	30
SLIKA 18. Navadna ciklama ( <i>Cyclamen purpurascens</i> ); november 2016 (levo) in januar 2017 (desno) .....	31
SLIKA 19. Ekstrakcija in filter papirji po ekstrakciji .....	32
SLIKA 20. Od leve proti desni; razvijanje kromatograma (TLC) in kromatogrami lista ambrovca (zeleni, rumeni, oranžni, rdeči in zeleno-rdeči).....	32
SLIKA 21. Kromatogram ekstrakta ciklame levo in zimzelene magnolije desno.....	33
SLIKA 22. Ekstrakti ločenih barvil po TLC (navadna ciklama).....	33
SLIKA 23. Fotometer PF-11 za določanje koncentracije nitratov in nitritov.....	33
SLIKA 24. Fluorescenca klorofila vzbujanja pri 500 nm in eksitacijo pri 510 nm (ambrovec, 11.11 2016). .....	52
SLIKA 25. Fluorescenca klorofila vzbujanja pri 500 nm in eksitacijo pri 510 nm (magnolija, 11.11. 2016).....	52
SLIKA 26. Fluorescenca klorofila vzbujanja pri 500 nm in eksitacijo pri 510 nm (ciklama, 11. 11. 2016).....	52
SLIKA 27. Fluorescenca klorofila v Spectro VIS fluorometru.....	58

## KAZALO GRAFOV

GRAF 1. VIS spekter ekstrakta ambrovca (zeleni listi ambrovca; 2.11. 2016) in tipična območja absorpcijskih vrhov treh vrst rastlinskih barvil (VERNIER SPECTROVIS).....	36
GRAF 2. VIS spekter zimzelene magnolije (20.11. 2016) .....	36
GRAF 3. VIS spekter navadne ciklame (20.11. 2016).....	37
GRAF 4. VIS spekter karotenoidov ekstrakta ambrovca (zeleni listi ambrovca 4 x razredčenje; vzorec: 11. 11. 2016).....	37



GRAF 5. VIS spekter antocianov ekstrakta ambrovca; rdeči listi (4 x razredčenje; levo vzorec 11.11. 2016 in desno 20.11. 2016).....	37
GRAF 6. VIS spekter klorofil <i>a</i> ambrovca (vzorec 20.11. 2016) .....	38
GRAF 7. Spreminjanje koncentracije skupnih klorofilov in karotenoidov v listih ambrovca v novembru 2016.....	42
GRAF 8. Spreminjanje koncentracije antocianov v listih ambrovca v novembru 2016...	42
GRAF 9. Spreminjanje koncentracije klorofila <i>a</i> in <i>b</i> listih navadne ciklame v novembru 2016.....	43
GRAF 10. Spreminjanje skupnih klorofilov in karotenoidov v listih navadne ciklame v novembru 2016 .....	44
GRAF 11. Spreminjanje koncentracije antocianov v listih navadne ciklame v novembru 2016.....	44
GRAF 12. Spreminjanje koncentracije klorofila <i>a</i> in <i>b</i> listih zimzelene magnolije v novembru 2016 .....	45
GRAF 13. Spreminjanje skupnih klorofilov in karotenoidov v listih zimzelene magnolije v novembru 2016 .....	46
GRAF 14. Spreminjanje koncentracije antocianov v listih zimzelene magnolije v novembru 2016 .....	46
GRAF 15. Spreminjane koncentracije skupnih klorofilov v preučevanih rastlinah.....	47
GRAF 16. Spreminjane koncentracije skupnih karotenoidov v preučevanih rastlinah ...	47
GRAF 17. Spreminjanje koncentracije antocianov v preučevanih rastlinah.....	47
GRAF 18. Spreminjanje koncentracije nitratov v listih, ki niso rdeče obarvani.....	49
GRAF 19. Gibanje koncentracije skupnih nitratov v vseh listih ambrovca v novembru 2016.....	50
GRAF 20. Kolorimetrične meritve nitratov (rumeni listi levo in rdeči skrajno desno)....	50
GRAF 21. Gibanje jutranjih temperatur v novembru 2016 (na mestu rastišča rastlinskih vzorcev) .....	50
GRAF 22. Korelacija med spreminjanjem vsebnosti skupnih klorofilov in skupnih nitratov v listih ambrovca.....	57

## POVZETEK

V nalogi smo preučevali kako se spreminja vsebnost klorofilov, karotenoidov in antocianov v listih ambrovca (*Liquidambar styraciflua*), zimzelene magnolije (*Magnolia grandiflora*) in navadne ciklame (*Cyclamen purpurascens*), v obdobju pozne jeseni (od 1.11. do 20.1 1. 2016) in ali obstaja povezava med vsebnostjo količine določenih barvil s količino dušikovih spojin pri omenjenih rastlinah? Ugotovili smo, da se je skupna količina klorofilov s starostjo listov ambrovca zmanjševala od 0,252 mg/g listne mase na 0,048 mg/g (zmanjšanje za 81 %). Pri zimzeleni magnoliji je bilo zmanjšanje skupnih klorofilov bistveno manjše, od 0,384 mg/g do 0,290mg/g in najmanj pri navadni ciklami (med 0,370 mg/g do 0,4446 mg/g). Pri ambrovcu je bila razgradnja klorofila *b* mnogo hitrejša kot razgradnja klorofila *a*, pri ostalih dveh vzorcih rastlin porušeni razmerij med obema klorofiloma nismo opazili. Količino skupnih nitratov v ambrovcu je v povezavi z barvo listov. Najvišje koncentracije smo zabeležili pri rdečih in zeleno rdečih listih ter najmanjše pri rumenih. S padanjem koncentracije skupnih klorofilov, pada tudi koncentracija nitratov. Pri antocianih je trend obraten. Višja kot je vsebnost antocianov, višje so koncentracije skupnih nitratov.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici za pomoč in nasvete pri nastajanju raziskovalne naloge, šoli, da mi je omogočila uporabo laboratorija.

## 1 UVOD

---

Jesen nas v našem podnebnem pasu vsako leto znova navduši s svojo barvitostjo. Listavci dvokaličnic žarijo v vseh odtenkih – od zelene, rumene preko oranžne do rdeče ali celo vijolične. Če izvzamemo zimzelene grme in drevesa, ki listov pred zimo ne odvržejo in pri katerih ne pride do razgradnje klorofila (npr. zimzelena magnolija – lat. *Magnolia grandiflora*), doživimo v jesenskem času pravi ognjemet barv, ki preseneča v več pogledih. Razlage za ta pojav niso enotne.

Vse razlage vključujejo rastlinska barvila. Danes vemo, da rdeča barvila ne nastanejo kot razpadni produkt klorofila (Vilhar, 2007a) in celoten proces »obarvanja« ne gre vselej skozi vse barvne odtenke. Nekateri listavci nikoli ne razvijejo oranžnih ali rdečih odtenkov (npr. ginko – lat. *Ginkgo biloba*). Pri tistih, kjer je barvitost izjemna (npr. ambrovec – lat. *Liquidambar styraciflua*, rdeči hrast – lat. *Quercus rubra*) opazimo, da se proces »obarvanja« ne dogaja pri vseh listih istočasno in niti ne nujno skozi vse barvne odtenke. Eni listi ostanejo do odpada rumeno-zeleni.

Teorija pravi, da je odpadanje listov programiran in uravnavan proces, ki je povezan s strategijo preživetja listopadnih dreves in grmov (Delpech, 2000; Vilhar, 2007a). Široki (ploščati) listi niso odporni na zmrzal, na njih bi se lahko nabiral sneg in veje bi se pod težo snega lahko zlomile. Zato je zima za drevo obdobje mirovanja. Vendar tudi v našem podnebnem pasu so drevesa in grmi, ki preživijo neugodne zimske razmere, kljub velikim listnim površinam (npr. zimzelena magnolija – lat. *Magnolia grandiflora*, bršljan – lat. *Hedera helix*).

Pri rastlinah, ki se ob razpadu klorofila obarvajo rdeče gre za nastanek povsem novih barvil – antocianov (Matile s sod., 1992; King, 1997; Kozłowski in Pallardy, 1997; Matile, 2000). Antociani so vodotopni flavonoidi, ki najprej nastanejo v citoplazmi in se nato transportirajo v vakuole (Harborne, 1988; Mars s sod., 1995; Shirley, 1996). To se zdi nekoliko nelogično, če upoštevamo, da je odpadanje listov povezano s preživetjem rastline v zanjo zelo neugodnih vremenskih razmerah, za sintezo antocianov rastlina porabi veliko energije in organskih snovi, liste pa v zelo kratkem času po sintezi odvrže (Mohr in Schopfer, 1994; Archetti, 2000; Matile, 2000).

Jesenska obarvanost ni povezana z raznašanjem semen oziroma razmnoževanjem, lahko pa bi bila pomembna za zaščito listov. Lee in Gould (2002) navajata, da izrazita rdeča barva odganja insekte, škodljivce in mikrobe ter tako list ohrani dalj časa nepoškodovan, kar pomeni, da bi se lahko večina hranilnih snovi varno odložila v olesenele dele in bila na razpolago v pomladnem času. Po Matile (2000) so antociani le končni produkt flavonoidov in rezultat aktivnega recikliranja fotosintetskih proteinov. Ford (1986) navaja, da antociani predstavljajo sistem za izločanje toksinov v listih, ki bodo kmalu odvrženi. Hipoteza, da so antociani nefunkcionalni stranski produkt listov, je še vedno prevladujoča (Mohr in Schopfer, 1994; Archetti, 2000; Matile, 2000).

Kaj se dogaja v enakih klimatskih razmerah v zimzelenih rastlinah, ki ne proizvajajo antocianov? Vemo, da se pri zimzelenih rastlinah preko različnih mehanizmov (voskasti listi, igličasi listi, zvijanje listnih površin, itd.) listna površina »zaščiti« pred večjo izgubo vode ter nizkimi temperaturami, vendar klorofili svojo asimilacijsko vlogo opravljajo dalje. Kaj se v tem času s karotenoidi spremeni? Vprašanj, ki so povezana z razpadom (ali ohranjanjem) rastlinskih barvil, je veliko.

V nalogi želim raziskati, kako se spreminja vsebnost klorofilov, karotenoidov in antocianov v rastlinskih listih ambrovca (lat. *Liquidambar styraciflua*) – listopadnega drevesa pisanih jesenskih barv, zimzelene magnolije (lat. *Magnolia grandiflora*) – drevesa bleščečih velikih zimzelenih listov in navadne ciklame (lat. *Cyclamen purpurascens*) – cvetnice, ki ima liste na zgornji strani obarvane zeleno in spodaj škrlatno rdeče in tudi v neugodnih zimskih razmerah listov ne odvrže; zanimalo me je tudi, kako se v povezavi z listnimi barvili spreminja vsebnost dušikovih spojin, ki jih bom določal preko skupnih nitratnih(V) in nitritnih(III) ionov.

## 1.1 RAZISKOVALNO VPRAŠANJE

---

Kako se spreminja vsebnost klorofilov, karotenoidov in antocianov v listih rastlin ambrovca (*Liquidambar styraciflua*), zimzelene magnolije (*Magnolia grandiflora*) in navadne ciklame (*Cyclamen purpurascens*) v obdobju pozne jeseni (od 1.11. do 20.1 1. 2016) in ali obstaja povezava med vsebnostjo količine določenih barvil s količino dušikovih spojin pri omenjenih rastlinah?

## 1.2 HIPOTEZE

---

H1. Skupna količina klorofilov se bo s starostjo listov pri *Liquidambar styraciflua* manjšala. V listih drugih dveh testnih rastlin (*Magnolia grandiflora* in *Cyclamen purpurascens*) bo količina klorofilov v območju pričakovanega nihanja, vendar trendov povečevanja ali zmanjševanja ne bomo izmerili.

H2. Ker sta si *klorofil a* in *klorofil b* strukturno različna (*klorofil a* je manj polaren), bo razgradnja *klorofila b* hitrejša kot razgradnja *klorofila a*, saj razpad klorofilov spremlja kislinska hidroliza.

H3. Razgradnja klorofilov (a in b) bo v kislem mediju hitrejša kot v nevtralnem ali bazičnem.

H4. Količina antocianov se bo s starostjo listov pri *Liquidambar styraciflua* povečevala in bo v obratnem sorazmerju s količino izmerjenih skupnih nitratov.

H5. Količina antocianov se s starostjo listov pri *Cyclamen purpurascens* v opazovanem obdobju ne bo spreminjala.

H6. *Magnolia grandiflora* v opazovanem obdobju ne razvije antocianov.

H7. Funkcionalni pomen antocianov v jesenskih listih se nanaša na transport hranil, zato bodo v različno obarvanih listih pri *Liquidambar styraciflua* prisotne razlike v količini med nitrati ( $\text{NO}_3^-$ ) in nitriti ( $\text{NO}_2^-$ ).

H8. S staranjem listov se bo količina nitratov v listih *Liquidambar styraciflua* zmanjševala, pri ostalih dveh testnih rastlinah se ne bo spreminjala (*Magnolia grandiflora* in *Cyclamen purpurascens*).

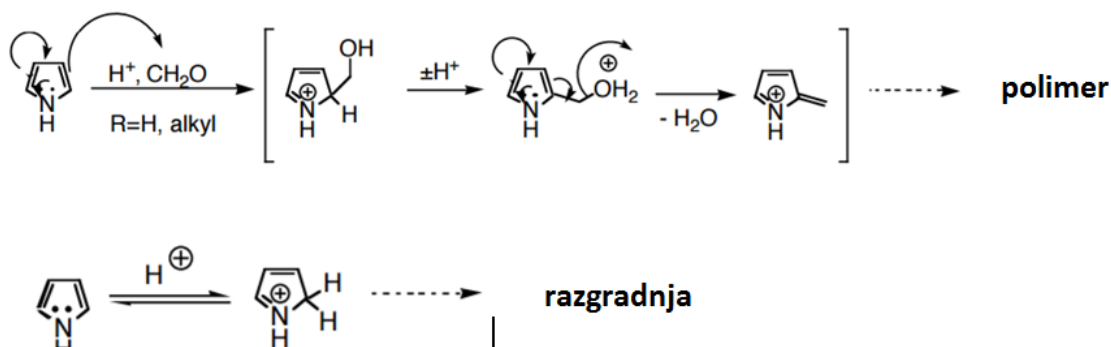
---

### 1.2.1 RAZLAGA HIPOTEZ

---

Dejstvo je, da okoljski dejavniki v ambrovcu sprožijo razpad klorofilov do feofitina (glej sliko 5), kjer klorofili izgubijo  $\text{Mg}^{2+}$  ion; nastanejo feofitini, ki se dalje razgradijo do pirofeofitina (odcep  $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ ). Predvidevamo, da se v procesu razgradnje zniža tudi pH, kar sproži nadaljnje razpadne procese klorofilov ter sintezo antocianov, ki so stabilnejši v kislem pH. Zakisanje lumna tilakoid in porušeno razmerje med porabo ATP in možnostjo

njegove sinteze privede do popolnega razpada klorofilov. Molekula, grajena iz štirih pirolskih obročev se razgradi do pirola, ki je v kislem okolju zelo dovzeten za reakcijo z elektrofili ( $H^+$ ). Nastane iminijev kation, ki se v zelo kislem okolju lahko povsem razgradi (do amonijevih spojin) ali pa z odcepom vode polimerizira (Joseph s sod., 1999). V bazičnem mediju bi lahko zopet nastali porfirinski obroči. Teh pojavov v *Magnolia grandiflora* in *Cyclamen purpurascens* ne pričakujemo, kar pomeni, da bi morala biti sestava rastlinskih barvil v *Magnolia grandiflora* in *Cyclamen purpurascens* bolj odporna na spremembe pH (dodatna zaščita) ali pa so spremembe genetsko pogojene na ravni rastline in isti okoljski dejavniki ne povzročijo razpad klorofilov, niti ne vplivajo na transport hranljivih snovi (koncentracijo dušikovih spojin).



SLIKA 1. Razgradnja klorofila (povzeto Joseph s sod., 1999)

Na celoten proces vpliva tudi vsebnost vode. Ko se proces razgradnje začne, večja vsebnost vode proces razgradnje pospeši, saj je vodotopnost razgradnih produktov klorofilov višja kot topnost klorofilov.

## 2 TEORETIČNO OZADJE

### 2.1 ODPADANJE LISTOV

Drevesa v jeseni v olesenelih delih pripravijo zaloge hranil (pretežno škrob in dušikove spojine), ki so nujni za preživetje rasti mladih listov v spomladanskem času; prvi, majhni, svetlo zeleni listi še ne opravljajo fotosinteze (Vilhar, 2007b).

Ko klorofil razpade, postanejo vidni rumeni karotenoidi, ki služijo kot pomožna fotosintetska barvila (Vilhar, 2007b) in so prisotni v vseh listavcih. Celice na območju, kjer

se bo list ločil od drevesa, oplutenijo, kar pomeni, da v svoje stene naložijo vodoodporno in neprepustno snov, imenovano suberin, nato pa od mreže (Vilhar, 2007a). Drevo s posebnimi izrastki iz živih celic zamaši velike traheje v ksilemu, nato se v plasti celic na mestu ločitve lista od drevesa razgradijo osrednje lamele, s katerimi so celice zlepljene med seboj in list odpade. Na mestu njegove pritrditve ostane zaprta listna brazgotina. V listu, ki je odpadel, ostane celuloza, tanini (ki dajejo rjavo barvo), preostanki barvil in drugih snovi. Organizmi v tleh ta listni odpad pretvorijo v manjše molekule ali v ionsko obliko, ki predstavlja dodatna hranila v novi rastni sezoni.

Lev-Yadun in Holopainen (2011) pravita, da rumeno obarvani listi nimajo enakega signalnega pomena za rastlinojede insekte kot rdeče obarvani. Trdita, da imajo rumeni več dušikovih spojin kot rdeči in so zato bolj privlačni za insekte. Trenutno je premalo dokazov o povezavi med genetsko pogojenimi variacijami jesenskih barv listov ter številčnosti rastlinojedih insektov (Simms s sod., 1996), zato je odnos med rastlinami in insekti, ki živijo v njihovi bližini, še vedno vroča tema ekologov.

---

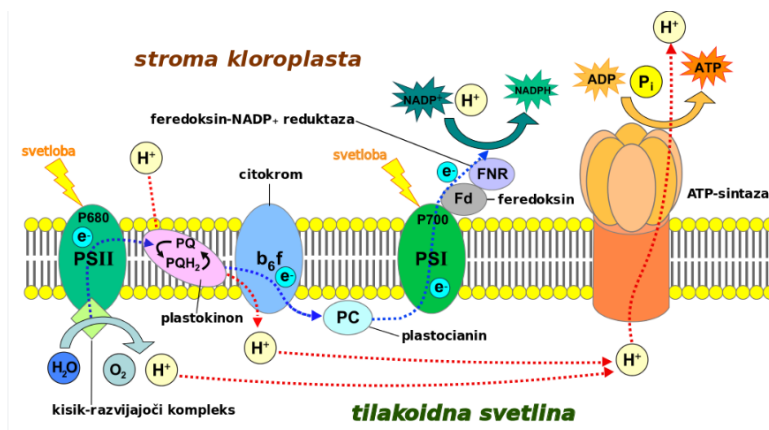
## 2.1 ASIMILACIJSKI PIGMENTI – KLOROFILI

---

Sončno sevanje, ki ga prejme Zemlja, je relativno konstantno. Zemljo doseže povprečno 47 % celotnega sevanja, ki ima na nivoju morske gladine vrednost  $1 \text{ kJ/m}^2\text{s}$ . Vsi danes znani evkariontski fotosintetski organizmi v glavnem uporabljajo valovne dolžine od 400 do 700 nm, kar predstavlja 43 % celotnega sončnega sevanja. To območje se imenuje fotosintetsko aktivno območje (ang. *PAR - photosynthetic active radiation*) z ocenjenim tokom  $1,05 \times 10^{21}$  fotonov  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Energija te svetlobe je dovolj visoka za katalitično razgradnjo vode in s tem nastanek kisika. Pri kateri valovni dolžini se začne fotosintetska aktivnost, je odvisno predvsem od rastlinskih barvil. Ta sodelujejo pri absorpciji, prenosu in pretvorbi energije fotosintetsko aktivnega sevanja za potrebe asimilacije  $\text{CO}_2$  in njegove fotosintetske redukcije. Kemijsko so fotosintetska barvila zelo različna. *Klorofila a in b*, ki sta najpomembnejša, imata svoje absorpcijske maksimume v modrem delu elektromagnetnega valovanja (v nadaljevanju EMV), to je v pasu od 430 do 455 nm in rdečem območju, to je od 645 do 670 nm. Fotoni, zbrani s klorofiloma *a in b*, zagotavljajo dovolj močan redoks potencial za oksidacijo vode (Chen s sod., 2010, 2011, 2013).



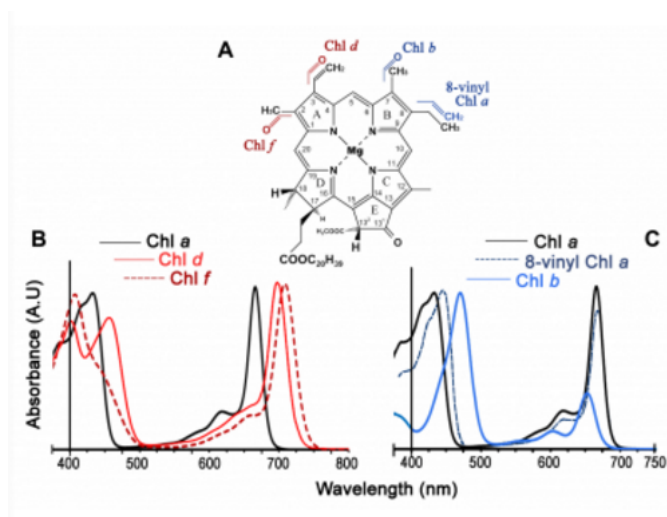
V celici se barvila nahajajo v tilakoidnih membranah kloroplastov, kjer so skupaj s proteinskimi molekulami povezane v *fotosistemu I (PSI)* in v *fotosistemu II (PSII)*. Sestavni del vsakega fotosistema sta antenski kompleks, ki služi lovljenju svetlobe in reakcijski center, v katerem se vrši fotokemično delo. V antenskem kompleksu PSII sodeluje okrog 250 molekul *klorofila a* in *klorofila b* in več molekul *ksantofilov*.<sup>1</sup> Vsi ti pigmenti po absorpciji svetlobe prenašajo energijo do reakcijskega centra, ki ga predstavlja glavni asimilacijski pigment, povezan s proteini. Pri rastlinah je to *klorofil a*. Skupna značilnost vseh asimilacijskih pigmentov je prisotnost konjugiranih dvojnih vezi v molekuli ( $\pi$ -molekulske orbitale). Elektroni teh orbital lahko ob absorpciji fotona preidejo v višje nezasedene orbitale, pomožni asimilacijski pigmenti pa lahko po vzburjanju prenesejo energijo na druge pigmentne molekule preko resonance konjugiranih  $\pi$  vezi. Vzburjena molekula inducira vzburjeno stanje v sosednji molekuli. V končni fazi se energija prenese na *klorofil a*, to je reakcijski center, ki odda energijo v obliki fotokemičnega dela, tj. odda elektron, ki se v tilakoidi prenaša na druge prejemnike elektrona. Gre za transport elektronov proti redoks gradientu, kar omogoča nastajanje NADPH in  $H^+$  ionov ter ATP v kasnejših (svetlobnih) fazah fotosintetskih reakcij (Likar, 2016).



SLIKA 2. Shematski prikaz svetlobnih reakcij fotosinteze (povzeto po Neil s sod., 2002)

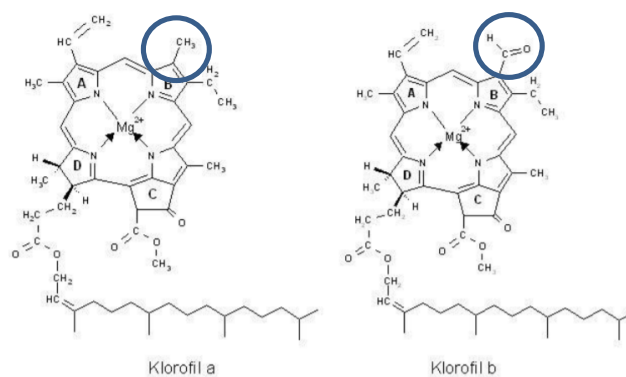
Funkcija pomožnih pigmentov ni samo prenos energije do *klorofila a*, ampak tudi večja absorpcijska izkoriščenost svetlobnega spektra in obenem zaščita fotosintetskega aparata pri previsokih jakostih sevanja (Likar, 2016).

<sup>1</sup> Za fotosintezo sta najbolj pomembni modra in rdeča svetloba, ki ju pigmenti najbolje absorbirajo. Najmanj je pomembna zelena svetloba, ki se skoraj v celoti reflektira nazaj v okolje.



SLIKA 3. Zgradba klorofilov in njihova absorpcija (100 % metanol). (A) Kemijska zgradba klorofila *a* in strukturne razlike v primerjavi z drugimi klorofili. (B) Absorbance klorofila *d* in *f* v primerjavi s klorofilom *a*. (C) Absorbance klorofila *b* in 8-vinil klorofila *a* v primerjavi s klorofilom *a*. (povzeto po Chen, Scheer, 2013)

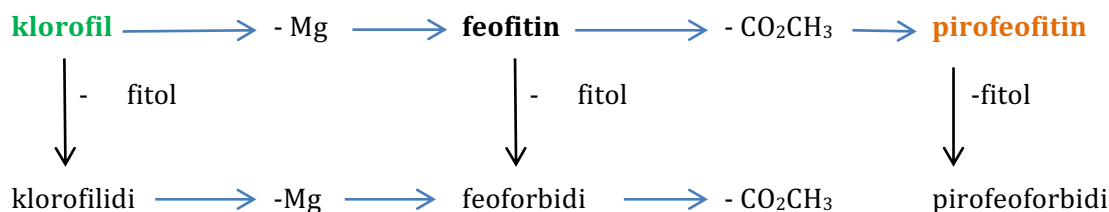
Posledica različne kemijske strukture pri različnih asimilacijskih pigmentih so tudi razlike v absorpciji svetlobe. Ker se *klorofila a* in *b* razlikujeta v skupinah na obroču (molekula klorofila *a* ima pripeto metilno (-CH<sub>3</sub>) skupino, molekula *b* pa aldehydno (-CHO) skupino), se razlikujeta v polarnosti. Metilna skupina je manj polarna od aldehydne, zato je klorofil *a* bolj topen v nepolarnih topilih kot klorofil *b*. Na osnovi različne polarnosti ju lahko ločimo s kromatografijo (Boh, 2000).



SLIKA 4. Klorofil *a* in klorofil *b* (Boh, 2000).

Erge s sod. (2008) je preučevala termično razgradnjo skupnih klorofilov pri grahu. Razgradnjo so preučevali pri 70°, 80°, 90° in 100°C. Razgradnja klorofila *a* in klorofila *b* je bila prvega reda. Izračunali so aktivacijske energije, in sicer za *klorofil a* 47.78 kJ mol<sup>-1</sup> in *klorofil b* 26.77 kJ mol<sup>-1</sup>.

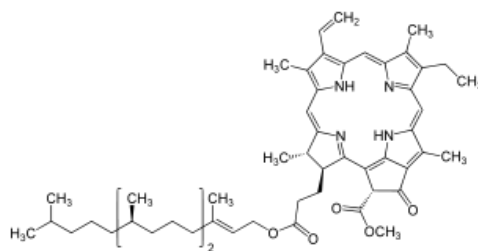
Klorofil v procesu razgradnje razpade v več različnih razgradnih produktov, ki so prikazani na spodnji shemi.



SLIKA 5. Klorofil in njegovi razgradni produkti (Jacobson, 1976)

### 2.1.1 FEOFITINI

Če centralni  $\text{Mg}^{2+}$  iona v klorofilu nadomestimo z dvema  $\text{H}^+$  ionoma, dobimo feofitin.



SLIKA 6. Feofitin (Plantagea, 2016)

Klimov (2003) navaja, da so feofitini, kot nekovinski derivati klorofila, soudeleženi kot primarni sprejemniki elektronov v fotosistemu I. Pri termični obdelavi je predpostavljeno, da klorofil razpade preko feofitina v pirofeofitin. Schwarz in Elbe (1983) poročata, da se pH pri 60 min kuhanju listov špinacije pri  $121^\circ\text{C}$  zniža od 7.06 do 5.65 predvsem zaradi razgradnje klorofila.

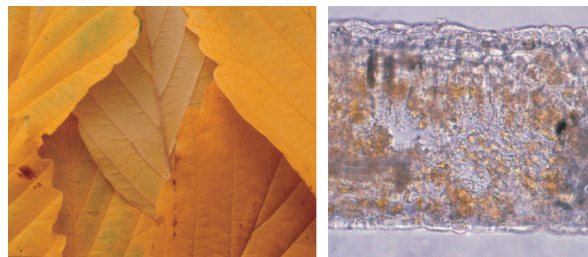
### 2.2 KAROTENOIDI

Karotenoidi so tetraterpeni, ki absorbirajo v modrem delu spektra med 400 in 520 nm (imajo tipičen trojni vrh). Karotenoide delimo na karotene (ogljikovodike) in ksantofile (oksidirane derivate karotenov). Med oranžno rdečimi karoteni je najpomembnejši  $\beta$ -karoten, ksantofili so rumeni do rdeči. Karotenoidi so dobro topni v maščobah (lipidih) in v nepolarnih topilih, mnogo manj v vodi. Prisotnost kisikovih atomov daje ksantofilom nekoliko bolj polarni značaj od karotenov, kar omogoča kromatografsko ločitev obeh

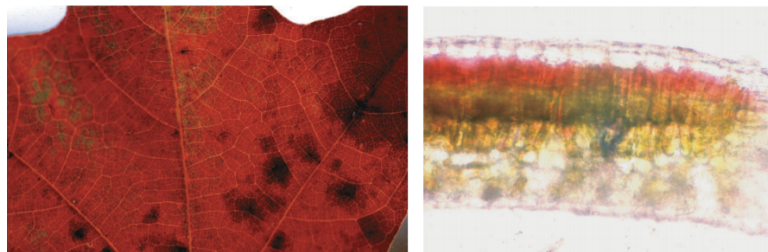


mezofil, delujejo pa tudi kot antioksidanti (Harborne, 1988). Danes poznamo okoli 300 antocianov. Na njihovo stabilnost vplivajo pH, prisotnost kisika, temperatura, encimi ter kovinski ioni (Boh, 2000).

Antociani imajo svoj absorpcijski maksimum v modro-zelenem delu spektra (Neill and Gould, 1999; Simms s sod., 1996; Brown s sod., 2001; Merzlyak in Chivkunova, 2000). Absorpcija antocianov tako posredno vpliva na kvaliteto in kvantiteto svetlobe, ki jo prejmejo klorofili in karotenoidi v procesu staranja lista.



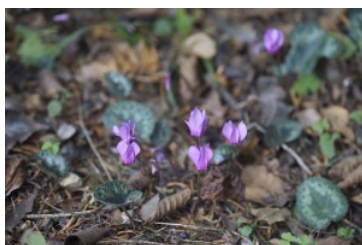
SLIKA 10. Odpadli listi nepozebnika (*lat. Hamamelis Virginiana*); levo. Pri sekciji lista (desno; 250-kratna povečava) opazimo, da je večina rumenega pigmenta shranjenega v kloroplastih, kjer se je razpad klorofila zgodil skoraj v celoti (Gould, 2002)



SLIKA 11. (Levo) listi rdečega javorja (*lat. Quercus Rubra*) in sekcija lista (desno), ki kaže, da so antociani locirani v vakuolah palisadnih celic v listnem epidermisu, tik pod površino (Gould, 2002). Pri rdečih listih klorofil v kloroplastih razpada, vendar se hkrati kopičijo rdeči antociani v vakuoli.

Field s sod. (2001) meni, da antociani ščitijo list, ki izgublja klorofile, pred nastajanjem prostih radikalov. Le-ti lahko poškodujejo celične membrane in genetski material. Ker se rdeča obarvanost listov pojavi po obdobju močne osvetljenosti, znižanja dnevnih in nočnih temperatur ter delne izsušenosti (Kozlowski in Pallardy, 1997; Dodd s sod., 1998; Chalker-Scott, 1999), ti pogoji privedejo do potrebe po dodatni zaščiti (Demmig-Adams in Adams, 1992; Matile s sod., 1999) kloroplastov, saj ti isti pogoji sprožijo tudi razpad klorofilov. Antociani naj bi preko absorpcije predvsem modrega dela svetlobe preprečili tudi razpad različnih encimov, ki razgrajujejo snovi v listu in sodelujejo pri njihovem

transportu v olesenele dele rastline. To bi lahko pojasnilo njihovo fiziološko vlogo, vendar še vedno ostaja vprašanje, zakaj se to dogaja samo pri nekaterih listavcih in zakaj tudi na posameznem drevesu, ne pri vseh listih istočasno oziroma sploh ne pri vseh. Bohova (2000) navaja, da je intenzivnost obarvanja pogojena z zalogami glukoze v listih in temperaturnimi razlikami med dnevom in nočjo. Vendar ne moremo prezreti dejstva, da je pri posameznih vrstah akumulacija rdečih barvil (antocianov) v vakuolah, tik pod listnim epidermisom, izjemno velika in da se to pojavi tik predno drevo liste odvrže, pri drugih listih iste rastline pa do obarvanosti sploh ne pride. Ob tem se postavi vprašanje, kaj se dogaja v rastlinah, ki so rdeče le na eni strani listne ploskve, na drugi pa zelene in takšne ostanejo celo zimo, npr. navadna ciklama (lat. *Cyclamen purpurascens*).



SLIKA 12. Navadna ciklama (*Cyclamen purpurascens*)

---

## 2.4 ŠKODLJIVO DELOVANJE SVETLOBE

---

Valovne dolžine svetlobe, ki niso primerne za fotosintezo, predstavljajo predvsem temperaturni stres. UV-svetloba, poleg termične motnje, s svojo energijo škoduje tudi zgradbi celičnih struktur (med drugimi kloroplastom). Prevelika količina svetlobe s preobremenitvijo fotosinteznega aparata inhibira proces fotosinteze (*fotoinhibicija*) in s tem rast ter razvoj rastlin. Destruktivni učinek ultravijoličnega sevanja pri rastlini z visoko ravno strpnosti do sevanja sproži procese, ki vodijo k zaščiti in prilagajanju rastline na sevanje. Pri občutljivejših rastlinah pride do poškodb celične zgradbe in oviranja življenjskih procesov (Vass, 2011). Posledica absorpcije intenzivne sončne svetlobe v listih je povečan nastanek reaktivnih kisikovih oblik in prostih radikalov (molekule z neparnimi elektroni), kot so prosti kisik, superoksid ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) in zelo toksični

hidroksilni radikal<sup>3</sup>, •OH. UV-svetloba neposredno fotokemično deluje na nukleinske kisline, na jedrno in mitohondrijsko DNK. Poškodbe nukleinskih kislin spremenijo potek biokemijskih in fizioloških reakcij, manj pogosto pa pride do mutacij (Teramura in Caldwell, 1981, cit. Po Trošt, 2005).

Rastline tekom razvoja in rasti razvijejo raznovrstne prilagoditve, ki jim pomagajo preživeti v okoljih z močno jakostjo ultravijoličnega sevanja. Spremembe, ki veljajo za prilagoditve rastline na povečano sevanje UV-B, so: zmanjšanje listne površine, povečanje listne debeline, povečano nalaganje epikutikularnih voskov, naraščanja vsebnosti nekaterih flavonoidov in drugih antioksidantov ter fotosinteznih barvil in encimov s popravljalno vlogo.<sup>4</sup> Rastline poškodovana mesta popravljajo preko fotoreaktivacije ali z izrezovanjem (Larcher, 2001). Fotoinhibicija združuje vse omejitvene dejavnike procesa fotosinteze in se načeloma vedno pojavi v prisotnosti močne svetlobne jakosti ter ob nezmožnosti sekundarnih procesov fotosinteze, da bi normalno delovali, npr. ob pomanjkanju vode ali CO<sub>2</sub> (Taiz in Zeiger, 2010).

---

#### 2.4.1 ODVAJANJE PRESEŽKA ENERGIJE

---

V rastlinah je eden od glavnih načinov preprečevanja kopičenja odvečne ekscitacijske energije v fotosinteznem aparatu odvajanje te energije v obliki toplote s pomočjo ksantofilnega cikla in to še pred nastankom škodljivih oksidantov. Karotenoidi so v primeru stresa bolj izpostavljeni kot klorofili, saj predstavljajo prvo obrambno linijo, kot dušilci triplet stanja klorofila in odstranjevalci singletnega kisika (Demmig-Adams in Adams, 1996). Poškodbe reakcijskega centra fotosistema II povzročajo prekinitev transporta elektronov in zmanjšanje učinkovitosti izrabe energije. Ko je transport elektronov onemogočen, se klorofil lahko vrne v nevzbujeno stanje tudi s fluorescenco ali

---

<sup>3</sup> Prostih radikali so lahko vključeni tudi v normalno tvorbo ligninov, ki krepijo celične stene ali pomenijo boj proti patogenom, vendar njihova koncentracija ne sme preseči sposobnost naravnih antioksidantov, da njihova visoka koncentracija ne privede do celične smrti (opomba avtorja).

<sup>4</sup> Ključni antioksidant v kloroplastih in mitohondrijih je *superoksid dismutaza*. Pomembni encimi, ki sodelujejo v procesih odstranjevanja aktiviranih oblik kisika, so *askorbat peroksidaza*, *dehidroaskorbat reduktaza* in *glutation reduktaza*, *α-tokoferol* je lovilec prostih radikalov v lipidni plasti membran, *halkon sintaza* je glavni zaščitni encim v citoplazmi (Strid in sod., 1996).

oddajanjem toplote in tako zmanjša obseg škode zaradi močne svetlobe. Odvajanje energije zmanjša učinkovitost fotosinteze.

Poleg ksantofilnega cikla delujejo fotozaščitno tudi drugi procesi fotosinteze, npr. svetlobno dihanje, ciklični transport elektronov in Mehlerjeva reakcija (Zaletel, 2011).

### 3 DOLOČANJE KLOROFILOV IN KAROTENOIDOV Z UV-VIS SPEKTROSKOPIJO IN FLUOROMETRIJO

---

Kvantitativna določitev klorofila *a* in *b* ter karotenoidov v zelenih rastlinah z UV-VIS spektroskopijo je pogojena z vzorcem, topilom in uporabljenim spektrofotometrom. Različni rastlinski pigmenti absorbirajo svetlobo v območjih, ki se med seboj prekrivajo, kar otežuje njihovo določitev in tudi kvantifikacijo (uporaba Beer -Labertovega zakona).

Klorofil je molekula, ki fluorescira, zato lahko za določanje aktivnosti klorofila uporabimo tudi fluorometrijo. Prednost fluorometrije je v njeni izjemni občutljivosti. Spektrofotometrično določanje klorofila vključuje filtracijo, razkroj celic in ekstrakcija klorofila, ki mu sledi meritev absorbanc. Ta vzorec se lahko uporabi tudi za fluorometrično določanje s prednostjo večje občutljivosti in s tem potrebe manjših vzorcev.

V nalogi bosta uporabljeni obe metodi.

#### 3.1 UV-VIS SPEKTROSKOPIJA

---

Vrhovi v absorpcijskem spektru predstavljajo absorpcijske maksimume posameznih barvil in so za njih karakteristični, čeprav so odvisni tudi od vrste uporabljenega topila in deloma od aparature, s katero izvajamo meritev. Če izmerimo absorpcijo ekstrakta pri točno določenih valovnih dolžinah, lahko z uporabo različnih računskih postopkov izračunamo vsebnost določenega pigmenta v ekstraktu. Ti postopki so natančnejše predstavljeni v praktičnem delu naloge.

Če hočemo točno določiti absorpcijski spekter posameznega pigmenta, moramo pigmente najprej ločiti. V ta namen lahko uporabimo različne kromatografske tehnike, od najbolj preprostih (papirna in tankoplastna kromatografija), do tekočinske kromatografije.



Ločene pigmente identificiramo z izračunom retencijskih faktorjev ali retencijskih časov. Če je bila ločitev s kromatografijo uspešna in imamo čist ekstrakt enega pigmenta, dobimo absorpcijske vrhove pri točno določenih valovnih dolžinah. Ločbo in absorpcijo večkrat motijo razgradni produkti asimilacijskih pigmentov, saj pigmenti ob vzorčenju in ekstrakciji zelo hitro razpadajo. Občutljivi so predvsem na svetlobo in visoke temperature, na kar moramo posebej paziti, kadar opravljamo kvantitativno analizo pigmentov (Vilhar, 2007b). Napake v meritvah klorofilov vodijo do napak v določitvi karotenoidov.

---

### 3.1.1 INTERPRETACIJA PODATKOV UV-VIS SPEKTROSKOPIJE

---

Koncentracija *klorofila a in b* lahko izrazimo z različnimi referenčnimi sistemi:

- ✓ mg *klorofila a + b* / m<sup>2</sup> površine listov ;
- ✓ mg *klorofila a + b*/g suhe teže,
- ✓ mg *klorofila a + b* / g sveže mase (manj primeren kot suhe teže).

Za primerjavo rezultatov je zelo pomembno, da imamo enak referenčni sistem. Masno razmerje med *klorofilom a in b* je lahko pokazatelj prilagoditve fotosintskega aparata (Lichtenthaler s sod., 2001). Tako je lahko znižanje razmerja med obema klorofiloma signal za širitev antenskega sistema PS II.

---

## 3.2 FLUORIMetriJA

---

Redke spojine v trdnem, tekočem ali plinastem agregatnem stanju imajo lastnost, da pod vplivom UV-svetlobe ali kratkovalovne vidne svetlobe emitirajo svetlobo. Klorofil je takšna molekula. To lastnost lahko izkoristimo za merjenje njihove koncentracije ali oceno delovanja fotosintetskega aparata. Metoda, s katero merimo takšne snovi, se imenuje fluorometrija. Valovna dolžina svetlobe, ki jo določene snovi oddajajo, je daljša od valovne dolžine svetlobe, s katero vzbujamo molekulo. Vzrok fluorescence je postopno vračanje vzbujenih elektronov preko več energetskih nivojev v nižja energetska stanja. Fluorescirajoča snov odda svetlobo druge valovne dolžine takoj po obsevanju, to je v nekaj

mikrosekundah. Ko prenehamo z obsevanjem, fluorescirajoča snov preneha fluorescirati.<sup>5</sup>

Merjenje fluorescence je 1000-krat do 10000-krat bolj občutljivo od absorbimetričnih metod, saj merimo emitirano svetlobo točno določene valove dolžine, ki jo izoliramo iz spektra fluorescirajoče svetlobe. Tudi pri fluorimetričnih analizah lahko razvijemo enačbo, ki kaže razmerje med fluorescenco in koncentracijo snovi, vendar na fluorescenco vpliva toliko faktorjev<sup>6</sup>, tako da je boljše odčitati rezultate iz umeritvene krivulje. V primeru zelo razredčenih raztopin, ki imajo vrednost absorbance pod 0,05, je odnos med fluorescenco in koncentracijo linearen. Takrat velja enačba (Pivk, 2011):

$$F = K \times c$$

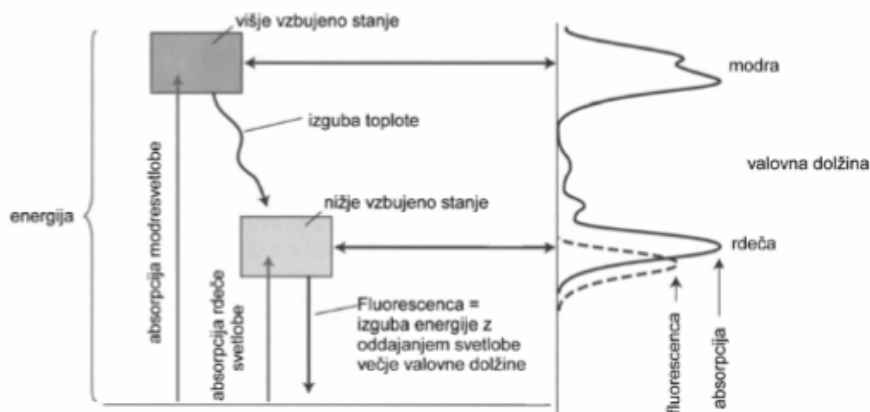
kjer je:  $F$  = fluorescenca,  $c$  = koncentracija in  $K$  = korelacijski faktor.

Če spremljamo fluorescenco klorofila oz. njen delež, lahko dobimo informacijo o učinkovitosti fotokemičnih reakcij in o toplotnih izgubah. V optimalnih razmerah predstavlja fluorescenca 2 do 4 % ekscitacijske energije, v stresnih razmerah, ko se vsa absorbirana svetlobna energija ne more porabiti za fotosintezo, pa se njen delež poveča (Taiz in Zeiger, 1998).

---

<sup>5</sup> Pojav, ko neka snov oddaja svetlobo še nekaj časa potem, ko smo že prenehali z obsevanjem, se imenuje fosforescenca. Fotoluminiscenca je splošen izraz, ki pomeni, da neka snov oddaja svetlobo, če jo obsevamo s svetlobo z dovolj energije. Snovi lahko že po naravi fotoluminisirajo, lahko pa fotoluminiscenco povzročimo sami.

<sup>6</sup> Na meritve fluorescence poleg valovne dolžine vpadne svetlobe in koncentracije vzorca vplivajo tudi številni drugi dejavniki, kot so temperatura, težke kovine, pH vrednost analita, prisotnost raztopljenega kisika in nestabilnost analita. Šele s poznavanjem in upoštevanjem omenjenih vplivov smo lahko prepričani v točnost dobljenih rezultatov.



SLIKA 13. Vzbujanje klorofila in oddajanje energije s fluorescenco. Desno je prikazan absorpcijski spekter klorofila in spekter oddane svetlobe (fluorescenca) (prirejeno po Taiz in Zeiger, 1998).

### 3.3 KVANTIFIKACIJA RASTLINSKIH BARVIL

Osnova za spektroskopsko kvantifikacijo pigmentov je Lambert-Beerov zakon, ki pravi, da je absorbanca direktno proporcionalna koncentraciji snovi, ki absorbira pri določeni valovni dolžini. V tej nalogi si bomo pri izračunih koncentracij *klorofila a in b* ter skupnih karotenoidov bomo pomagali z enačbami, ki veljajo za posamezna topila (povzeto po Lichtenthaler in Buschmann, 2001), ki ga uporabimo z ekstrakcijo. Če je topilo 100 % metanol, veljajo naslednji izračuni:

$$c_a (\mu\text{g/ml}) = 16.72 A_{665.2} - 9.16 A_{652.4}$$

$$c_b (\mu\text{g/ml}) = 34.09 A_{652.4} - 15.28 A_{665.2}$$

$$c_{(\text{skc})} (\mu\text{g/ml}) = (1000 A_{470} - 1.63 c_a - 104.96 c_b) / 221$$

SLIKA 14. sistem enačb za izračun koncentracije klorofila a, b in karotenoidov (povzeto po Lichtenthaler in Buschmann, 2001)

### 3.4 KROMATOGRFSKE METODE

Beseda kromatografija je izpeljana iz grških besed – *chromos* pomeni barva, *grafein* pisati. Pri ločevanju s kromatografijo imamo dve fazi – stacionarno in mobilno. Zmes, ki jo želimo ločiti, naneseemo na stacionarno fazo, ki je lahko tudi filtrirni papir (papirna kromatografija), ali pa prah nekaterih snovi (kolonska kromatografija). Mobilna faza je tekočina, ki potuje po stacionarni fazi. Pri našem delu bomo uporabili tankoplastno kromatografijo (TLC), kjer stacionarno fazo predstavlja tanek nanos silikagela na

aluminijevo ploščo. Na osnovi kromatograma bomo izračunali retencijske faktorje posameznih barvil ( $R_f$ ).

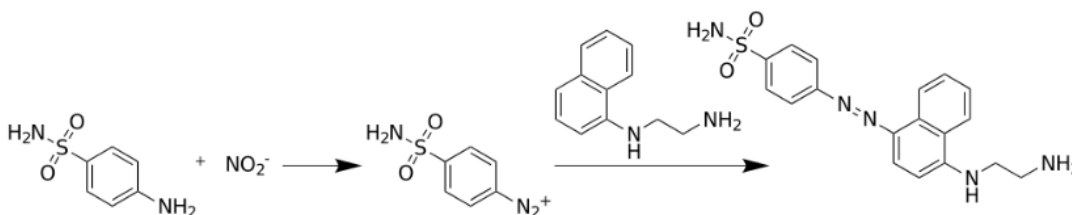
$R_f$  izračunamo kot:

$$R_f = \frac{\text{razdalija, ki jo prepotuje določen pigment}}{\text{razdalija, ki jo prepotuje topilo (mobilna faza)}}$$

### 3.5 MERITEV KONCENTRACIJE NITRATOV IN NITRITOV V EKSTRAKTIH LISTNIH BARVIL

V ta namen bomo v nalogi uporabili fotometer PF-11 (Machery –Nagel), Visocolor program in pripadajoče reagente. Metoda določanja nitratov temelji na redukciji nitrata do nitrita in nadaljnjem določanju koncentracije nitrita. Merimo absorbanco derivata, nastalega po dodatku sulfanilamida in N-(1-naftil)-etilendiamina pri 520 nm (filter 4).

Kolorimetrično določanje nitritnih ( $\text{NO}_2^-$ ) ionov temelji na Griessovi reakciji, ki vključuje spremembo nitrita s pomočjo benezen sulfonilne kisline v 4-diazobenzen sulfonilno kislino. Z dodatkom  $\alpha$ -nafilamina pri pH 2 dobimo rdeče-vijolično raztopino, katere koncentracijo merimo pri valovni dolžini 520 nm.

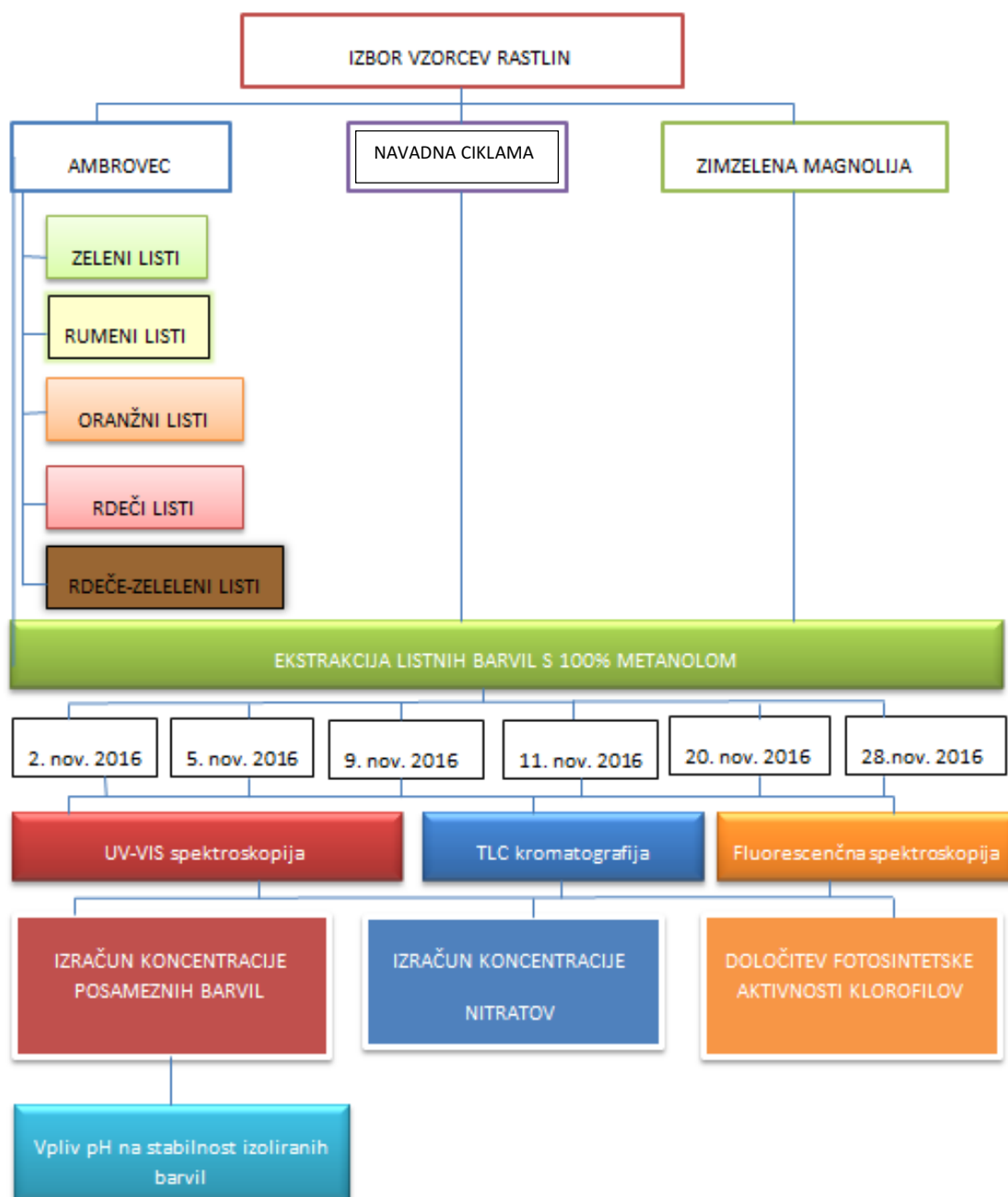


SLIKA 15. Reakcija nitritnih ionov z benzen sulfonilno kislino (Cotič Gabrijel, 2012)

Na rezultat vplivajo spremenljivke, kot so zaporedje mešanja komponent, koncentracije reagentov in temperatura (Cotič, 2012).

Namen nitratnega testa je oceniti koncentracijo nitrata ( $\text{NO}_3^-$  in  $\text{NO}_2^-$ ) v ekstraktu rastlinskih listov. Obe vrsti ionov sta v vodi dobro topni. Koncentracija skupnih nitratov je v neposredni povezavi z oskrbljenostjo rastline z dušikom, poleg tega pa je to tudi odličen pokazatelj za oceno stanja rastline. Metoda, ki smo jo uporabili, je osnovana na direktni reakciji nitratov s specifičnim reagentom, pri čemer nastane obarvan kompleks.

### 3 PRAKTIČNI DEL



ORGANIGRAM 1. Načrt dela

### 3.1 EKSTRAKCIJA PIGMENTOV

---

Vsi listi preučevanih rastlin so bili nabrani na isti strani rastline, obrnjene proti soncu (sončni listi). Vse rastline imajo rastišče na položnem pobočju, lega JV in ležijo v oddaljenosti 10 m druga od druge.

Vzorci listov, ki jih bomo analizirali, so:

1. **Ambrovec** (*lat. Liquidambar styraciflua*) (listopadno drevo).



SLIKA 16. listi in drevo ambrovca (*Liquidambar styraciflua*) (levo – november 2016 in desno januar 2017)

2. **Zimzelena magnolija** (*Magnolia grandiflora*)



SLIKA 17. Zimzelena magnolija (*Magnolia grandiflora*) lesno – november 2016 in desno januar 2017

### 3. Navadna ciklama (*Cyclamen purpurascens*)



SLIKA 18. Navadna ciklama (*Cyclamen purpurascens*); november 2016 (levo) in januar 2017 (desno)

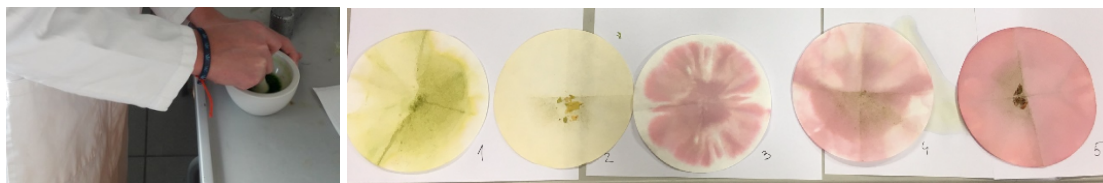
**Potek ekstrakcije** (primer za liste ambrovca, ki smo ga smiselno aplicirali tudi pri zimzeleni magnoliji in ciklami)

1. Vzorce listov smo najprej zložili po njihovi barvi<sup>7</sup> ter jih označili z ustreznimi oznakami:  
1- zeleni, 2- rumeni, 3- oranžni, 4- rdeči in 5- zeleno-rdeči. Vsi listi so bili nabrani direktno z drevesa. V poprečju je maso natehtanega svežega materiala predstavljalo med 5- 8 listov. Vzorec svežega stehtanega rastlinskega materiala ( $5,00 \pm 0,01$  g) smo prenesli v keramično terilnico; dodali smo za noževno konico kremenčevega peska in  $Mg(HCO_3)_2$  ter trli s keramičnim pestilom (30 min). Vzorce tremo najprej na suho in nato v 100%, na 4°C, ohlajenem metanolu (Fluka), dokler ne postanejo homogeni.
2. Ekstrakt nato prefiltriramo v merilno bučko (100 mL). Za filtracijo smo uporabili filter papir Whatman (grade 1; Sigma Aldrich).
3. Vsebino v terilnici spiramo s svežim (hladnim) metanolom tako dolgo, da napolnimo 100 mL merilno bučko.

Ekstrakte listov, ki vsebujejo mešanico rastlinskih pigmentov, smo homogenizirali z metanolom, sledila je filtracija<sup>8</sup>. Ekstrakte smo tako pretvorili v obliko, primerno za spektrofotometrijo. Motnost ekstraktov bi lahko povečala absorpcijo, kar vodi do določitve večjih vsebnosti pigmentov od dejanskih.

<sup>7</sup> To ne velja za primer navadne ciklame in magnolije, kjer so bili vsi listi označeni kot zeleni listi.

<sup>8</sup> Prve ekstrakte smo centrifugirali. Vendar smo kasneje ugotovili, da filtracija daje dobre rezultate, saj smo dobili čiste, transparentne ekstrakte.



SLIKA 19. Ekstrakcija in filter papirji po ekstrakciji (od zelenih listov do rdeče- zelenih).

### 3.2 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA – LOČITEV LISTNIH BARVIL

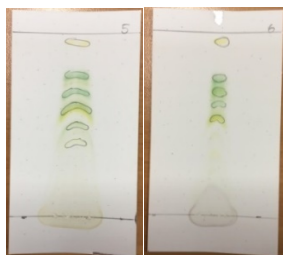
Po ekstrakciji smo posamezna barvila ločili s tankoplastno kromatografijo. V ta namen smo uporabili TLC plošče, prevlečene z 0,20 mm SiO<sub>2</sub> (na aluminijevem nosilcu), dimenzij 5 x 10 cm (Sigma Aldrich). Kot mobilno fazo smo uporabili raztopino *petroleter* : *aceton* : *kloroform* = 3 : 1 : 1 (vse kemikalije so bile p.a. čistoče)<sup>9</sup>. Listna barvila smo nanegli v tanki črti in vsak nanos (skupaj 5) sušili s toplim (vendar ne vročim) fenom. Ločenim barvilom smo izračunali njihove retencijske faktorje ( $R_f$ ) in jih na osnovi barve ter  $R_f$  identificirali. Nato smo jih postrgali s TLC plošč in pigmente z istim  $R_f$  združili in jih raztopili v 5 mL ohlajenega metanola. Sledila je filtracija (odstranitev SiO<sub>2</sub>) ter snemanje VIS spektrov. Za kvantifikacijo posameznih barvil smo vsem barvilom izmerili njihove absorbance pri zanje karakterističnih valovnih dolžinah maksimalnih absorbanc. Za meritev absorbanc smo uporabili Vernierjev Spektrofotometer (SpektroVIS) s kivetami  $l=1$  cm.



SLIKA 20. Od leve proti desni; razvijanje kromatograma (TLC) in kromatogrami lista ambrovca (zeleni, rumeni, oranžni, rdeči in zeleno-rdeči)

<sup>9</sup> V predhodnih poskusih smo ugotovili, da je ta mobilna faza najustreznejša za klorofile in karotenoide, manj pa za bolj polarne antocianine, kar se vidi tudi iz razvitih kromatogramov.





SLIKA 21. Kromatogram ekstrakta ciklame levo in zimzelene magnolije desno



SLIKA 22. Ekstrakti ločenih barvil po TLC (navadna ciklama).

### 3. 3 MERITEV KONCENTRACIJE NITRATOV IN NITRITOV V EKSTRAKTIH LISTNIH BARVIL

---

V ta namen smo uporabili fotometer PF-11 (Machery –Nagel), Visicolor program in pripadajoče reagente. Tekom določanja vsebnosti nitratov je bila  $T=23-25^{\circ}\text{C}$ , zaporedje mešanja komponent je bilo vedno enako, pazili smo, da je bil tudi čas odčitavanja rezultatov vedno v enaki časovni enoti.



SLIKA 23. Fotometer PF-11 za določanje koncentracije nitratov in nitritov

Fotometer ima omejitve glede koncentracijskih območij meritev. Za nitrite je to:

0.00 do 2.0 mg/L  $\text{NO}_2^-$  in za nitrate od 0,05 do 40.0 mg/L  $\text{NO}_3^-$ .

Omejitev uporabe je tudi relativno velika količina vzorca, ki ga potrebujemo ( $\approx 10$  mL), zato smo delali razredčitve. To se je izkazalo za koristno, saj so vrednosti nitratov in nitratov velikokrat presegale območje meritev, množenje z redčitvenim faktorjem pa je omogočalo bolj natančno določitev koncentracije preučevanih snovi.

## 4 REZULTATI

### 4.1 IDENTIFIKACIJA LISTNIH BARVIL IN KONCENTRACIJA NITRATOV TER NITRITOV V POSAMEZNIH EKSTRAKTIH

Ker je bilo za vse tri rastlinske vzorce opravljenih 35 TLC ločitev listnih barvil, v nadaljevanju navajamo samo en primer analize TLC kromatogramov za vsako rastlinsko vrsto. Preostali so zbrani v Prilogi 1. Primeri kromatogramov so prikazani na slikah 20 in 21 in vseh 35 ne prilagamo k nalogi.

#### 4.1.1 AMBROVEC

PREGLEDNICA 1. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v posameznih ekstraktih (ambrovec, 2.11.2016)

Vzorec	barva	Rf vrednosti	Identifikacija	[NO <sub>3</sub> ], mg/L	[NO <sub>2</sub> ], mg/L
1- zeleni	rumen	0,20	Ksantofili/lutein	18,0	1,8
	modro-zelen	0,48	Klorofil a		
	zelen	0,42	Klorofil b		
	siv	0,78	feofitini		
	Rumeno - oranžen	0,96	B-karoteni		
	vijoličen	≈0,10	antociani		
2- rumeni	Rumeno-oranžen	0,96	karoteni	6	1,1
	siv	0,78	feofitini		
	rumen	0,20	Ksantofili/lutein		
3- oranžni	Rumeno-oranžen	0,96	karoteni	28	1,9
	siv	0,78	feofitini		
	rumen	0,20	Ksantofili/lutein		
	vijoličen	≈0,1	antociani		
4- rdeči	Rumeno	0,20	ksantofili	>40,0	>2,0
	Rumena-zelena	0,95	karoteni		
	vijolična	≈0,1	antociani		
5- rdeče zelen	vijoličen	≈0,1	antociani	>40,0	>2,0
	rumen	0,19	ksantofili/lutein		
	Modro-zelen	0,48	Klorofil a		
	siv	0,79	feofitini		
	Rumeno - oranžen	0,96	karoteni		

---

## 4.1.2 ZIMZELENA MAGNOLIJA

---

PREGLEDNICA 2. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v zimzeleni magnoliji (2.11.2016)

Vzorec	barva	Rf vrednost	Identiteta	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ], mg/L	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ], mg/L
Zim. magnolija	zelen	0,45	Klorofil b	54,0	>4,0
	rumen	0,26	ksantofil		
	Modro zelen	0,59	Klorofil a		
	rumen	0,55	lutein		
	Rumeno - oranžen	0,91	karoten		
	vijolična	≈0,13	antociani		

---

## 4.1.3 NAVADNA CIKLAMA

---

PREGLEDNICA 3. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v navadni ciklami (28.11.2016)

Vzorec	barva	Rf vrednosti	identitete	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ], mg/L	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ], mg/L
Ciklama	zelen	0,42	Klorofil b	24,0	3,00
	Modro zelen	0,59	Klorofil a		
	siv	0,66	feofitin		
	rumen	0,25	ksantofil		
	Rumeno - oranžen	0,97	karoteni		
	vijoličen	≈0,12	antociani		

---

## 4.2 UV-VIS ANALIZA VZORCEV IN DOLOČITEV LISTNIH BARVIL

---

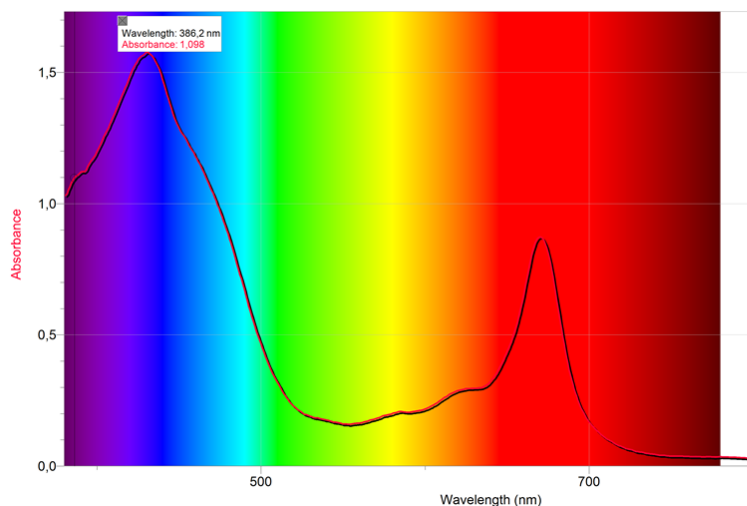
---

### 4.2.1 UV-VIS SPEKTRI EKSTRAKTOV IN RASTLINSKIH BARVIL

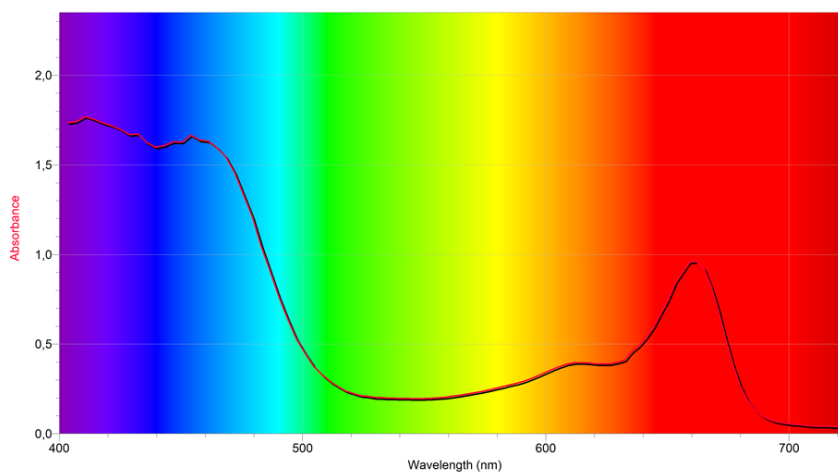
---

Ekstrakti rastlinskih barvil ambrovca, magnolije in ciklame se med seboj že na prvi pogled zelo razlikujejo. Pri zelenih listih ambrovca je predel je absorbcija v antocianskem delu grafa nizka (Graf 1), prav nasprotno pa je to pri ciklami in magnoliji (graf 2 in 3). Tako pri ciklami kot magnoliji so bile pri vseh karakterističnih valovnih dolžinah izmerjene višje absorbance tudi za klorofile in karotenoide (preglednice 3-8). VIS spektri za ločene pigmente imajo nizke absorbance (Graf 6), kar je razumljivo, saj smo jih pridobili iz tankoplastne kromatografije in jih precej razredčili. Večina posnetih spektrov je karakteristična za posamezna barvila, vendar smo opazili, da nam s TLC ločitvijo ni vedno uspelo pridobiti res samo eno barvilo (graf 4). Možno je tudi, da je razgradnja tako hitra,

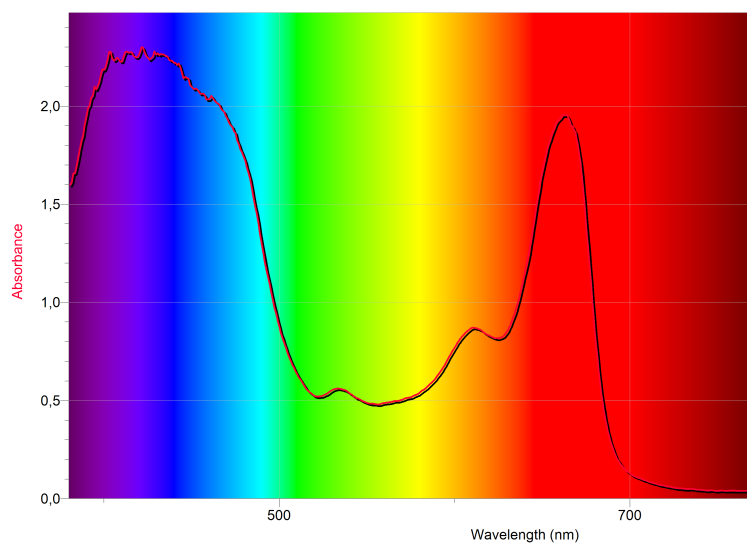
da dobimo mešanico barvila in njegovega razgradnega produkta. Preko meritev absorbanc ločenih barvil smo pridobili podatke za izračun koncentracije posameznih barvil v ekstraktu (poglavje 4.2.2). Pri izračunih smo upoštevali redčitvene faktorje. Vse meritve so bile opravljene v času od 15 min do 1h po izolaciji pigmentov.



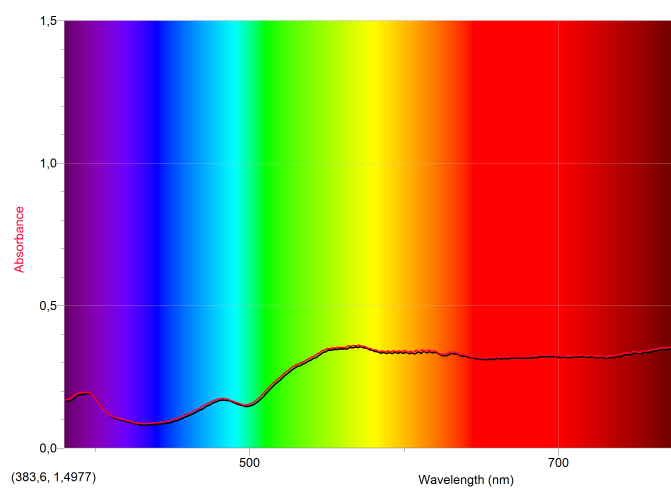
GRAF 1. VIS spekter ekstrakta ambrovcva (zeleni listi ambrovcva; 2.11. 2016) in tipična območja absorpcijskih vrhov treh vrst rastlinskih barvil (VERNIER SPECTROVIS)



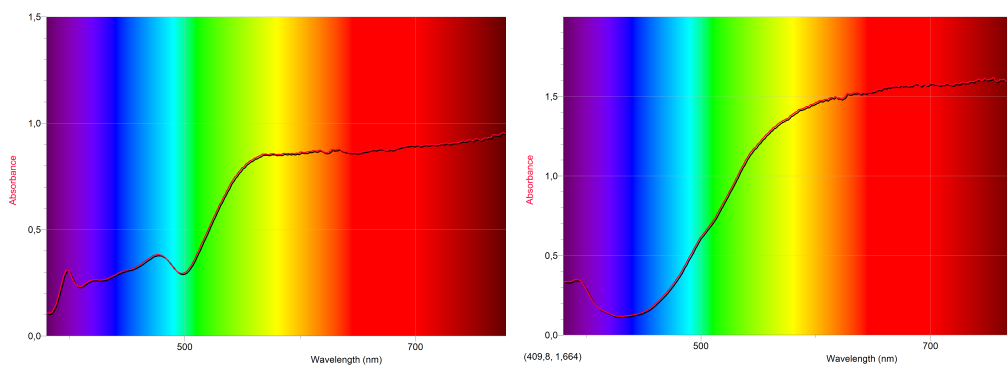
GRAF 2. VIS spekter zimzelene magnolije (20.11. 2016)



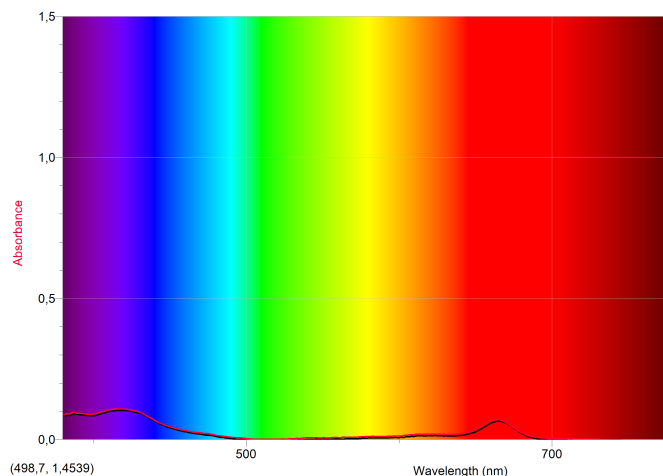
GRAF 3. VIS spekter navadne ciklame (20.11. 2016)



GRAF 4. VIS spekter karotenoidov ekstrakta ambrovca (zeleni listi ambrovca 4 x razredčenje; vzorec: 11. 11. 2016)



GRAF 5. VIS spekter antocianov ekstrakta ambrovca; rdeči listi (4 x razredčenje; levo vzorec 11.11. 2016 in desno 20.11. 2016)



GRAF 6. VIS spekter klorofil *a* ambrovca (vzorec 20.11. 2016)

#### 4.3 MERITVE ABSORPCIJ ZA POSAMEZNA LISTNA BARVILA

PREGLEDNICA 4. Absorbance posameznih klorofilov pri njihovih značilnih valovnih dolžinah (vzorec listi ambrovca)

	A ( $\lambda_{662}$ nm)					A ( $\lambda_{645}$ nm)				
	datum					datum				
	2.11.	5.11.	9.11.	11.11.	20.11.	2.11.	5.11.	9.11.	11.11.	20.11.
<b>Klorofil a</b>	1,60	1,40	1,10	0,80	0,20	1,53	1,30	0,90	0,54	0,10
<b>Klorofil b</b>	0,11	0	0	0	0	0,05	0	0	0	0

Klorofil *b* smo lahko izmerili samo pri prvih vzorcih iz začetka novembra. Kasneje ga na TLC kromatogramih nismo več nedvoumno identificirali.

PREGLEDNICA 5. Absorbance karotenoidov in antocianov pri njihovih značilnih valovnih dolžinah za ambrovec

	A ( $\lambda_{470}$ nm)					A ( $\lambda_{540}$ nm)				
	datum					datum				
	2.11.	5.11.	9.11.	11.11.	20.11.	2.11.	5.11.	9.11.	11.11.	20.11.
<b>karotenoidi</b>	2,38	2,09	1,65	1,03	0,75	-	-	-	-	-
<b>antocianini</b>	-	-	-	-	-	1,71	1,86	1,67*	1,81*	1,81*

\*Vsi vzorci so bili od tega datuma dalje 4x razredčeni (prej smo uporabili 2x razredčevanje)

PREGLEDNICA 6. Absorbance klorofilov pri njihovih značilnih valovnih dolžinah za zimzeleno magnolijo

	A ( $\lambda_{662}$ nm)					A ( $\lambda_{645}$ nm)				
	datum					datum				
	2.11.	5.11.	9.11.	11.11.	20.11.	2.11.	5.11.	9.11.	11.11.	20.11.
<b>Klorofil a</b>	1,45	1,40	1,20	1,20	1,00	0,74	0,60	0,60	0,55	0,45
<b>Klorofil b</b>	0,25	0,14	0,12	0,14	0,08	0,16	0,16	0,10	0,08	0,10

PREGLEDNICA 7. Absorbance karotenoidov in antocianov pri njihovih značilnih valovnih dolžinah za zimzeleno magnolijo

	A ( $\lambda_{470}$ nm) datum					A ( $\lambda_{540}$ nm) datum				
	2.11.	5.11.	9.11.	11.11.	20.11.	2.11.	5.11.	9.11.	11.11.	20.11.
<b>karotenoidi</b>	1,90	1,90	1,75	1,63	1,55	-	-	-	-	-
<b>antocianini</b>	-	-	-	-	-	0,40	0,38	0,44	0,36	0,35

PREGLEDNICA 8. Absorbance klorofilov pri njihovih značilnih valovnih dolžinah za navadno ciklamo

	A ( $\lambda_{662}$ nm) datum					A ( $\lambda_{645}$ nm) datum				
	2.11.	5.11.	9.11.	11.11.	20.11.	2.11.	5.11.	9.11.	11.11.	20.11.
<b>Klorofil a</b>	1,65	1,52	1,54	1,65	1,45	0,85	0,78	0,88	0,92	0,82
<b>Klorofil b</b>	0,40	0,42	0,36	0,32	0,28	0,24	0,22	0,20	0,18	0,18

PREGLEDNICA 9. Absorbance karotenoidov in antocianov pri njihovih značilnih valovnih dolžinah za ciklamo

	A ( $\lambda_{470}$ nm) datum					A ( $\lambda_{540}$ nm) datum				
	2.11.	5.11.	9.11.	11.11.	20.11.	2.11.	5.11.	9.11.	11.11.	20.11.
<b>karotenoidi</b>	2,48	2,42	2,48	2,30	2,32	-	-	-	-	-
<b>antocianini</b>	-	-	-	-	-	0,48	0,42	0,52	0,50	0,50

#### 4.4 IZRAČUN KONCENTRACIJE POSAMEZNIH LISTNIH BARVIL

V ekstraktih smo ksantofile (*ks*) in karotenoide (*ka*) določili kot vsoto absorbanc, značilnih za ksantofile in karotenoide pri  $\lambda_{470}$  nm, pri čemer smo prišteli tudi minimalno absorbanco, ki so jo pri tej valovni dolžini pokazali klorofili (a+b).

$$A_{\lambda_{470}} = A_{(ks+ka)_{470}} + A_{(a)_{470}} + A_{(b)_{470}}$$

Ob upoštevanju Beer-Lambertovega zakona, da je absorbanca direktno proporcionalna zmnožku koncentracij, molarnege ekstincijskega koeficienta ter dolžine poti, ki jo prepotuje svetloba, lahko koncentracijo listnih barvil izračunavamo glede na topilo, ki smo ga uporabili (100% metanol) po naslednjih formulah (povzeto po Lichtenthaler in Buschmann, 2001; Current Protocols in Food Analytical Chemistry (2001) ):

$$C_a(\mu\text{g/ml}) = 16,72 \times A_{662} - 9,28 \times A_{645}$$

$$C_b(\mu\text{g/ml}) = 36,82 \times A_{645} - 16,45 \times A_{662}$$

$$C_{ks+ka}(\mu\text{g/ml}) = (1000 \times A_{470} - 1,91 \times C_a - 63,14 \times C_b) / 214$$

Dokončne vsebnosti pigmentov v mg g<sup>-1</sup> dobimo po upoštevanju sveže mase tkiva, iz katerega smo naredili ekstrakt = G (g) ( v našem primeru 5,00g) in ob upoštevanju volumna ekstrakta, t.j. volumna porabljenega metanola (ml) ( v našem primeru 100 mL).

$$\frac{c \times V}{G \times 1000} = \text{koncentracija barvila}$$

#### Primer izračuna za liste ambrovca

$$\text{Koncentracija klorofila a} = \frac{(16,72 \times 1,6 - 9,28 \times 1,53) \times 100}{5,00 \times 1000} = \mathbf{0,251 \text{ mg/g}}$$

$$\text{Koncentracija klorofila b} = \frac{(36,82 \times 0,05 - 16,45 \times 0,11) \times 100}{5,00 \times 1000} = \mathbf{0,00063 \text{ mg/g}}$$

$$\text{Koncentracija karotenov} = \frac{(1000 \times 2,38 - 1,91 \times 12,55 - 63,14 \times 0,0315) \times 100}{214 \times 5 \times 1000} = \mathbf{0,220 \text{ mg/g}}$$

Koncentracije rastlinskih barvil lahko podamo glede na različne referenčne sisteme. V nalogi so vsi podatki izraženi kot masa barvila glede na maso svežega lista (mg/g). Vse meritve so bile opravljene v času od 15 min do 1h po izolaciji pigmentov.

Za antociane (in vse ostale meritve) smo kot slepo probo uporabili metanol (ekstrakcijsko topilo). V razredčenem vzorcu smo vse izračune naredili po formuli, povzeti po *Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy* (2001) :

$$\text{Monomerni antocianini (mg/liter)} = (A_{540} \times MW \times RF \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

Kjer je:

- *A<sub>540</sub>*...absorbanca pri 540 nm
- *MW*... molska masa,
- *RF*... redčitveni faktor (x 2),
- *ε* ...molarni ekstincijski koeficient.
- *l* ...dolžina, ki jo prepotuje svetloba v kivetu (1 cm)

Ker vrsto antocianinov nismo določali, smo kot standard prevezeli cianidin-3-glukozid z molsko maso 449.2 g/mol in  $\epsilon = 26900$  (povzeto po Giusti s sod. (*Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy*), 2001).

Kot primer izračuna navajamo izračun skupnih antocianov v listih ambrovca:

$$\text{Monomerni antocianini (mg/liter)} = (1,71 \times 449,2 \times 2 \times 1000) / (26900 \times 1) = \mathbf{57,1 \text{ mg/L}}$$



## 4.6 SPREMINJANJE KONCENTRACIJE POSAMEZNIH BARVIL V PREUČEVANIH LISTIH RASTLIN

### 4.6.1 AMBROVEC

PREGLEDNICA 10. Koncentracija klorofil a in b listih ambrovca

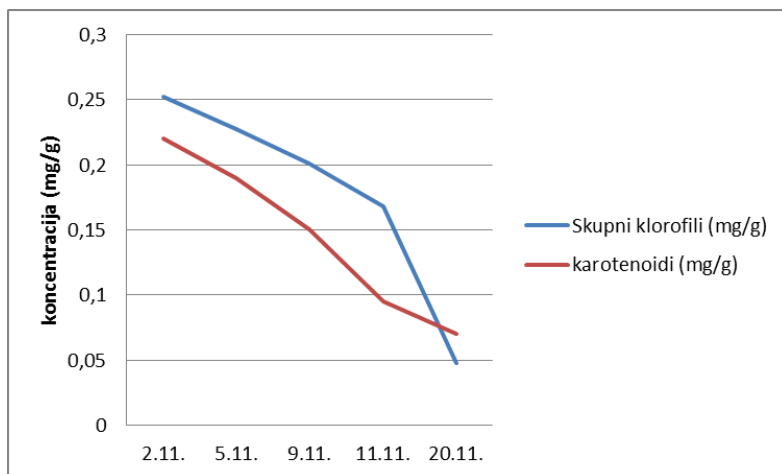
DATUM	klorofil a ( $\mu\text{g/ml}$ )	klorofil b ( $\mu\text{g/ml}$ )
2.11.	12,55	0,0315
5.11.	11,34	-
9.11.	10,04	-
11.11.	8,40	-
20.11.	2,42	-

PREGLEDNICA 11. Klorofil a in b izražena v mg/g rastlinskih listov ter skupni klorofili v listih ambrovca

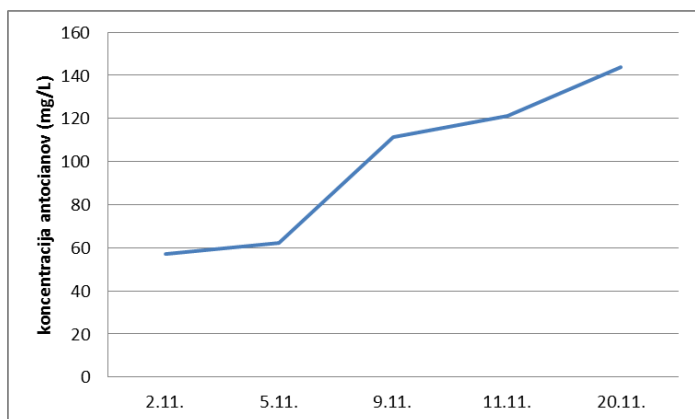
DATUM	klorofil a (mg/g)	klorofil b (mg/g)	skupni klorofili (mg/g)
2.11.	0,251	0,00063	0,252
5.11.	0,227	-	0,227
9.11.	0,201	-	0,201
11.11.	0,168	-	0,168
20.11.	0,048	-	0,048

PREGLEDNICA 12. Skupna količina karotenov, antocianov in klorofilov v listih ambrovca

DATUM	karotenoidi (mg/g)	antociani (mg/L)	skupni klorofili (mg/g)
2.11.	0,22	57,1	0,252
5.11.	0,19	62,1	0,227
9.11.	0,15	111,2	0,201
11.11.	0,095	121	0,168
20.11.	0,070	144	0,048



GRAF 7. Spreminjanje koncentracije skupnih klorofilov in karotenoidov v listih ambrovca v novembru 2016



GRAF 8. Spreminjanje koncentracije antocianov v listih ambrovca v novembru 2016

#### 4.6.2 NAVADNA CIKLAMA

PREGLEDNICA 13. Količina klorofila a in b v navadni ciklami

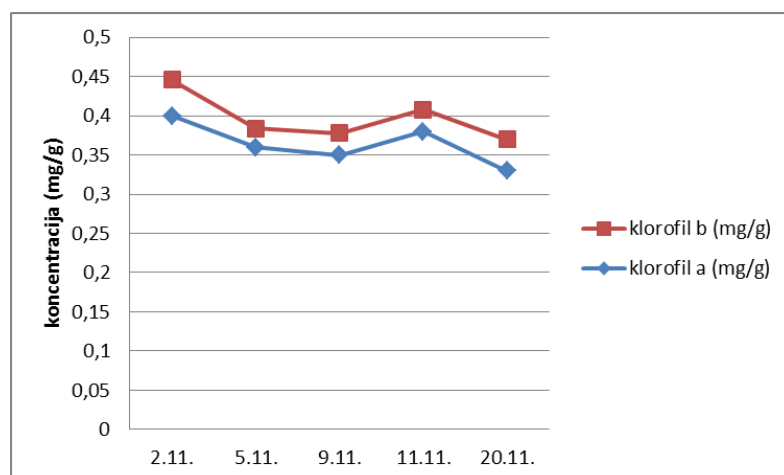
DATUM	klorofil a ( $\mu\text{g/ml}$ )	klorofil b ( $\mu\text{g/ml}$ )
2.11.	19,7	2,3
5.11.	18,2	1,2
9.11.	17,6	1,4
11.11.	19,0	1,4
20.11.	16,6	2,0

PREGLEDNICA 14. Klorofil a in b, izražena v mg/g rastlinskih listov ter skupni klorofili v listih navadne ciklame

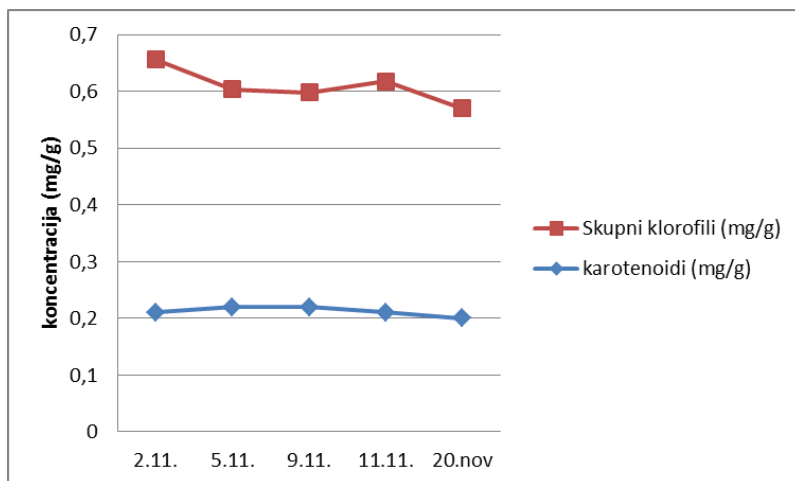
DATUM	klorofil a (mg/g)	klorofil b (mg/g)	skupni klorofili (mg/g)
2.11.	0,40	0,046	0,446
5.11.	0,36	0,024	0,384
9.11.	0,35	0,028	0,378
11.11.	0,38	0,028	0,408
20.11.	0,33	0,040	0,370

PREGLEDNICA 15. Skupna količina karotenov, antocianov in klorofilov v listih navadne ciklame

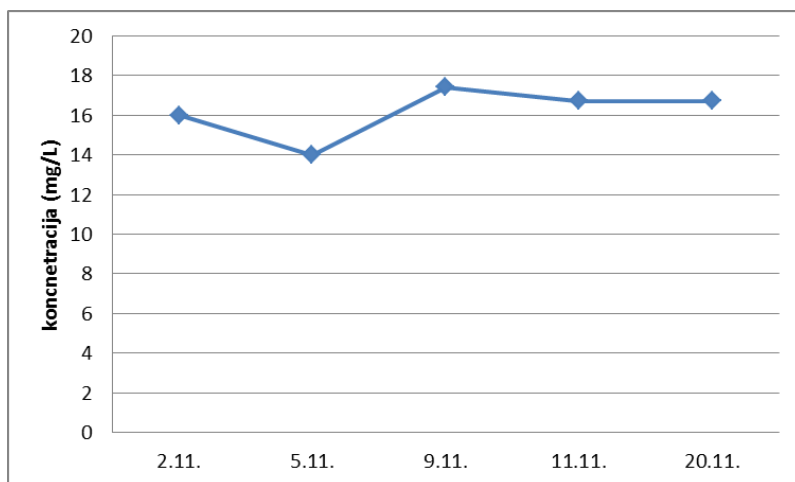
DATUM	karotenoidi (mg/g)	antocianini (mg/L)	skupni klorofili (mg/g)
2.11.	0,21	16,0	0,446
5.11.	0,22	14,0	0,384
9.11.	0,22	17,4	0,378
11.11.	0,21	16,7	0,408
20.11.	0,20	16,7	0,370



GRAF 9. Spreminjanje koncentracije klorofila a in b listih navadne ciklame v novembru 2016



GRAF 10. Spreminjanje skupnih klorofilov in karotenoidov v listih navadne ciklame v novembru 2016



GRAF 11. Spreminjanje koncentracije antocianov v listih navadne ciklame v novembru 2016

#### 4.6.3 ZIMZELENA MAGNOLIJA

PREGLEDNICA 16. Količina klorofila a in b v zimzelenu magnoliji

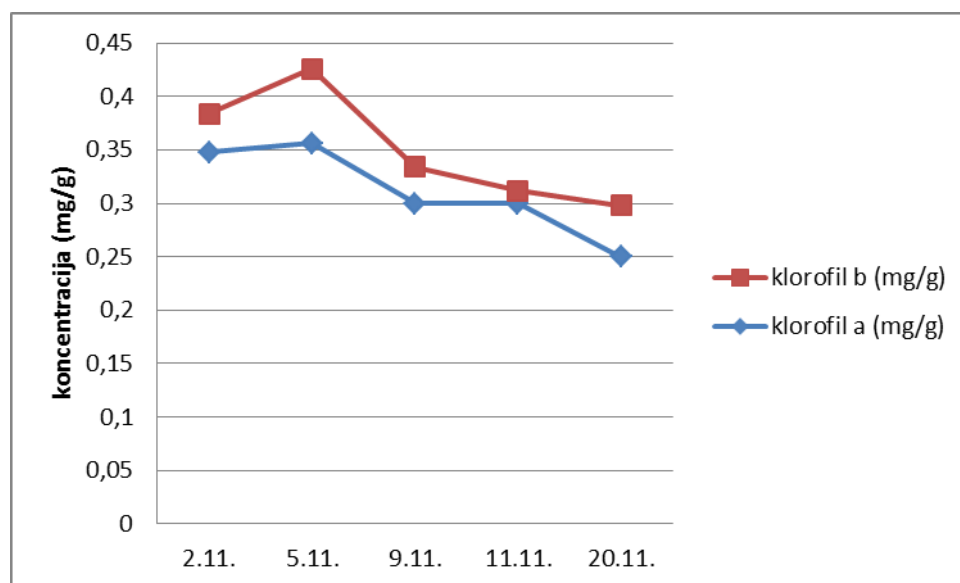
DATUM	klorofil a ( $\mu\text{g/ml}$ )	klorofil b ( $\mu\text{g/ml}$ )
2.11.	17,4	1,8
5.11.	17,8	3,5
9.11.	15,0	1,7
11.11.	15,0	0,6
20.11.	12,5	2,4

PREGLEDNICA 17. Klorofil a in b izražena v mg/g rastlinskih listov ter skupni klorofili v zimzeleni magnoliji

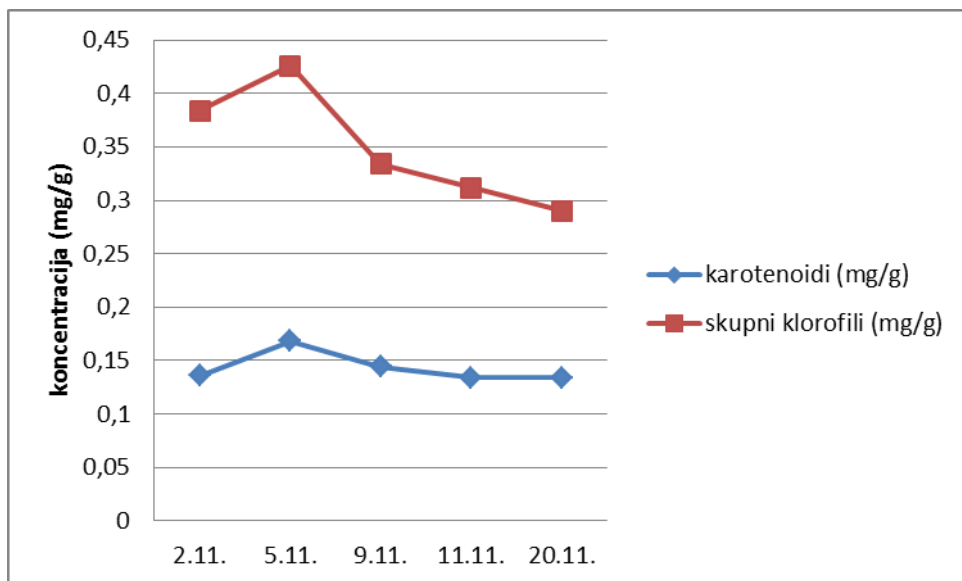
DATUM	klorofil a (mg/g)	klorofil b (mg/g)	skupni klorofili (mg/g)
2.11.	0,348	0,036	0,384
5.11.	0,356	0,070	0,426
9.11.	0,300	0,034	0,334
11.11.	0,300	0,012	0,312
20.11.	0,250	0,048	0,290

PREGLEDNICA 18. Skupna količina karotenov, antocijanov in klorofilov v listih zimzelene magnolije

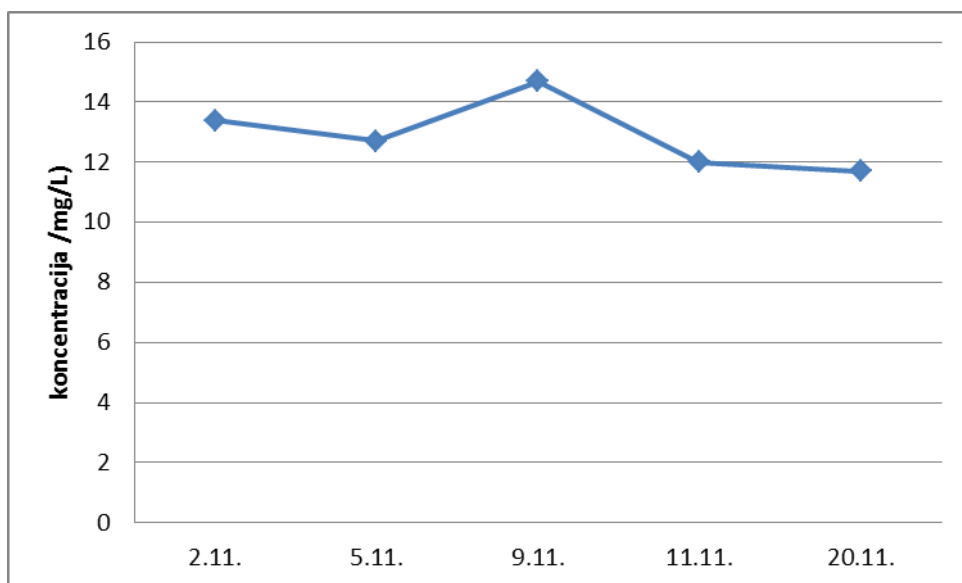
DATUM	karotenoidi (mg/g)	antocijani (mg/L)	skupni klorofili (mg/g)
2.11.	0,136	13,4	0,384
5.11.	0,168	12,7	0,426
9.11.	0,144	14,7	0,334
11.11.	0,134	12,0	0,312
20.11.	0,134	11,7	0,290



GRAF 12. Spreminjanje koncentracije klorofila a in b listih zimzelene magnolije v novembru 2016

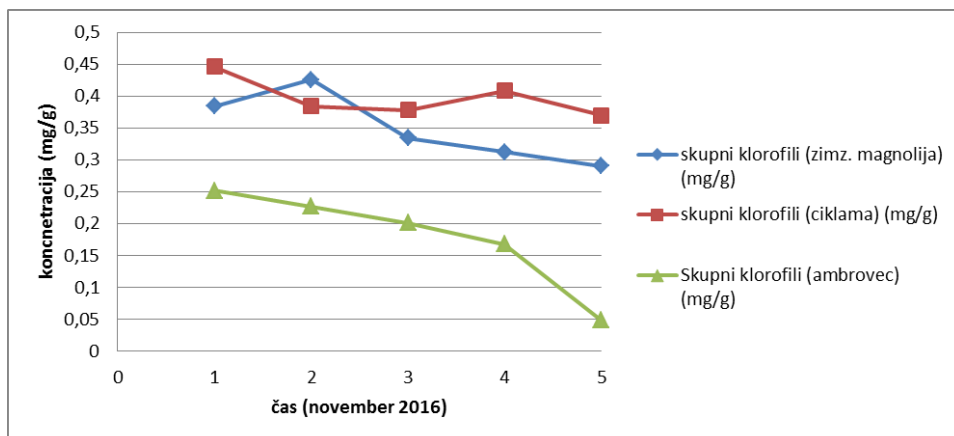


GRAF 13. Spreminjanje skupnih klorofilov in karotenoidov v listih zimzelene magnolije v novembru 2016

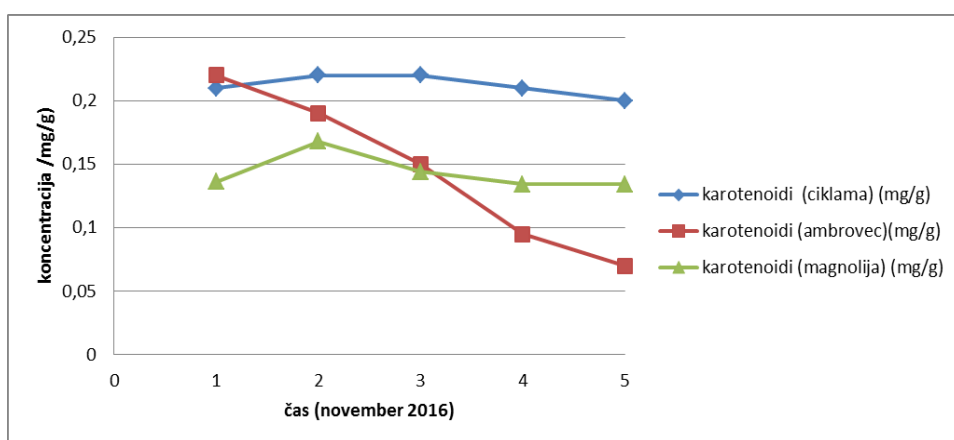


GRAF 14. Spreminjanje koncentracije antocianov v listih zimzelene magnolije v novembru 2016

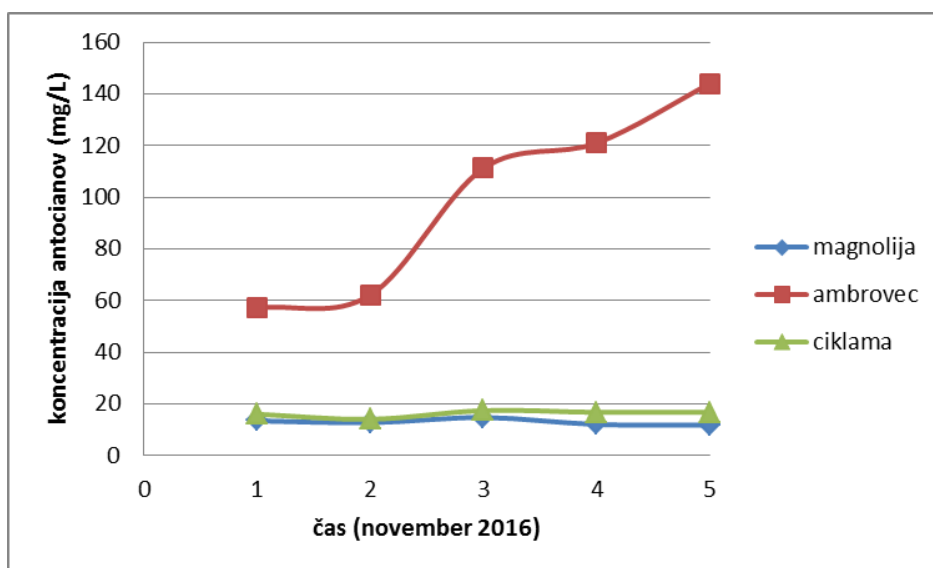
Na grafih 15–17 je predstavljeno spreminjanje vseh treh listnih barvil (skupni klorofili, karotenoidi in antociani) v listih vseh treh preučevanih rastlin.



GRAF 15. Spreminjane koncentracije skupnih klorofilov v preučevanih rastlinah



GRAF 16. Spreminjane koncentracije skupnih karotenoidov v preučevanih rastlinah



GRAF 17. Spreminjanje koncentracije antocianov v preučevanih rastlinah

## 4.7 KOLORIMETRIČNA DOLOČITEV VREDNOSTI NITRATOV V AMBROVCU, MAGNOLIJI IN CIKLAMI

### 4.7.1 AMBROVEC

PREGLEDNICA 19. Vsebnost nitratov v **zelenih** listih ambrovca

DAN	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	Skupaj nitrati (mg/L)
1	18	1,8	19,8
5	16	1,6	17,6
9	18	1,6	19,6
11	10,8	1,6	12,4
20	4,2	1,1	5,3

PREGLEDNICA 20. Vsebnost nitratov v **rumenih** listih ambrovca

DAN	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	Skupaj nitrati (mg/L)
1	6,0	1,1	7,1
5	6,0	1,0	7,0
9	8,0	1,0	9,0
11	3,6	0,9	4,8
20	1,8	0,4	2,2

PREGLEDNICA 21. Vsebnost nitratov v **oranžnih** listih ambrovca

DAN	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	Skupaj nitrati (mg/L)
1	28,0	1,9	29,9
5	26,0	1,8	27,8
9	22,0	1,8	23,8
11	17,2	1,9	19,1
20	9,0	0,9	9,9

PREGLEDNICA 22. Vsebnost nitratov v **rdečih** listih ambrovca

DAN	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	Skupaj nitrati (mg/L)
1	>40	>2	>42
5	36	>2	>38
9	>40	>2	>42
11	>40	>2	>42
20	>40	>2	>42

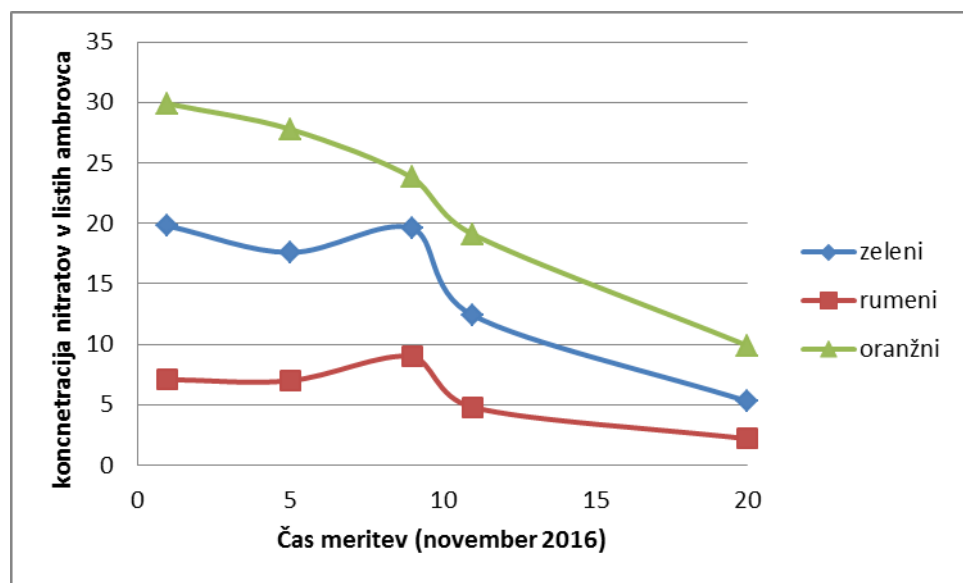


PREGLEDNICA 23. Vsebnost nitratov v rdeče-zelenih listih ambrovca

DAN	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	Skupaj nitrati (mg/L)
1	>40	>2	>42
5	34	>2	>36
9	>40	>2	>42
11	>40	>2	>42
20	>40	>2	>42

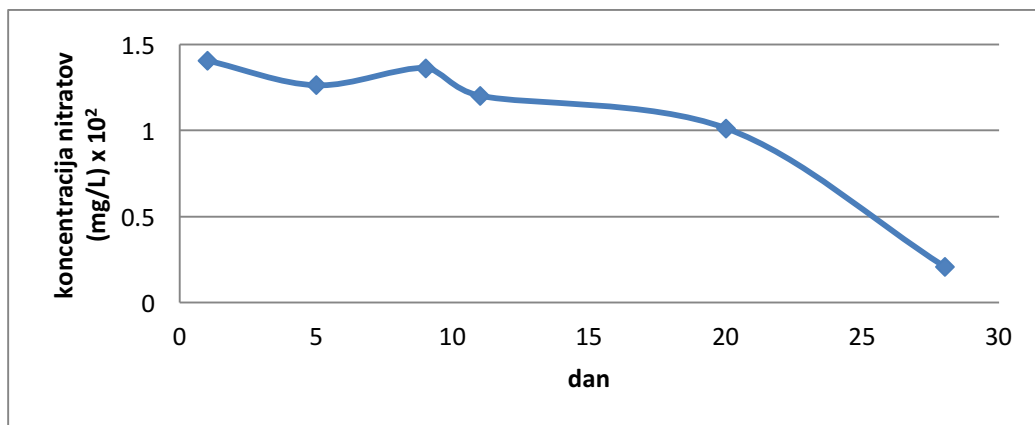
PREGLEDNICA 24. Gibanje koncentracije nitratov v vseh listih ambrovca v novembru 2016

DAN	Skupaj nitrati v ambrovcu (mg/L)x10 <sup>2</sup>
1	1,408
5	1,264
9	1,364
11	1,203
20	1,014
28 (10)	0,21

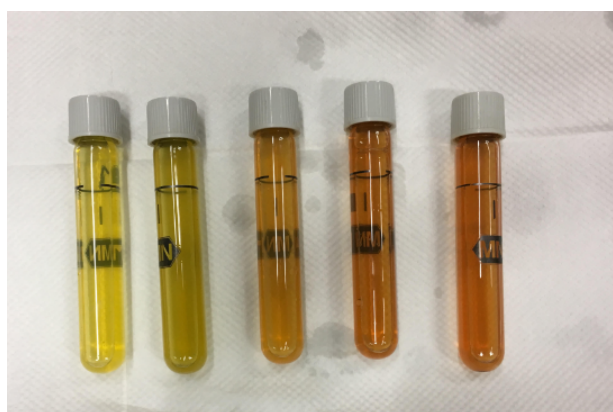


GRAF 18. Spreminjanje koncentracije nitratov v listih, ki niso rdeče obarvani

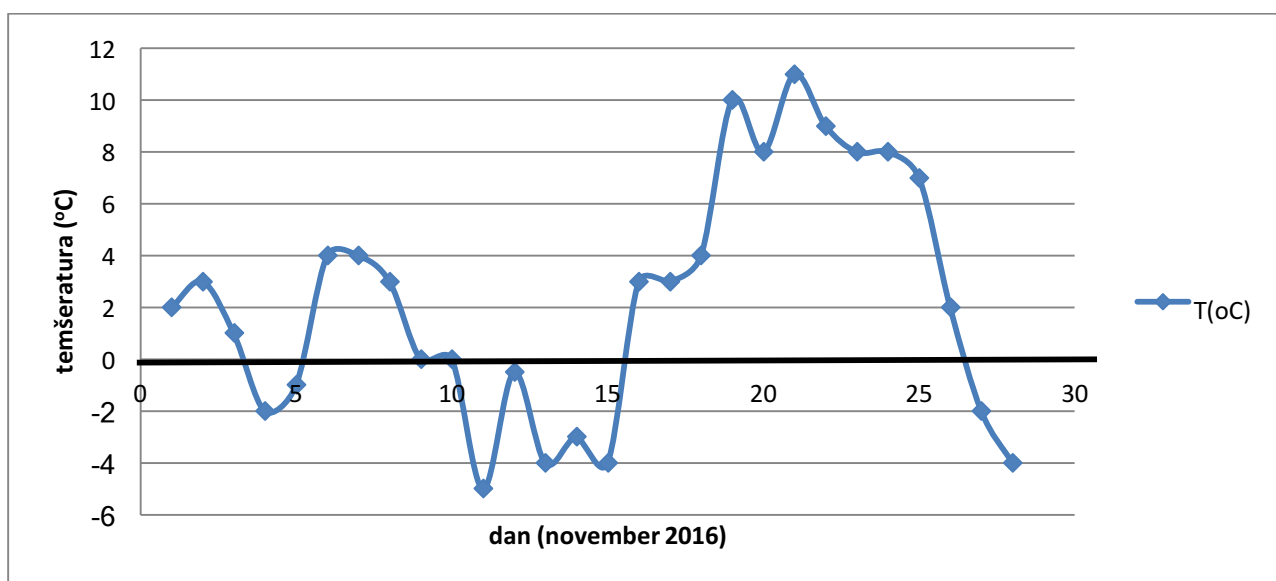
<sup>10</sup> Meritev je bila opravljena za mešanico različnih barv listov, ki so še ostali na drevesu.



GRAF 19. Gibanje koncentracije skupnih nitratov v vseh listih ambrovca v novembru 2016



GRAF 20. Kolorimetrične meritve nitratov (rumeni listi levo in rdeči skrajno desno)



GRAF 21. Gibanje jutranjih temperatur v novembru 2016 (na mestu rastišča rastlinskih vzorcev)

---

#### 4.7.2 NAVADNA CIKLAMA

---

PREGLEDNICA 25. Vsebnost nitratov pri navadni ciklami

DAN	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	Skupaj nitradi (mg/L)
1	24,0	2,98	27,0
5	14,0	2,0	16,0
9	18,0	2,2	20,2
11	20,0	2,98	23,0
20	10,0	>2	ND

---

#### 4.7.3 ZIMZELENA MAGNOLIJA

---

PREGLEDNICA 26. Vsebnost nitratov pri zimzelni magnoliji

DAN	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	Skupaj nitradi (mg/L)
1	>80,0	>4,0	ND
5	28,0	>4,0	ND
9	30,0	2,3	32,3
11	> 80,0	>4,0	ND
20	54,0	>4,0	ND

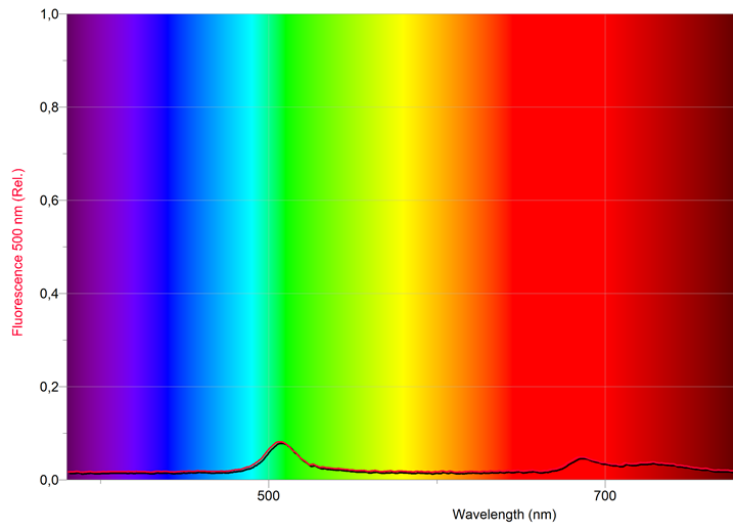
Legenda: ND- ni bilo mogoče določiti

---

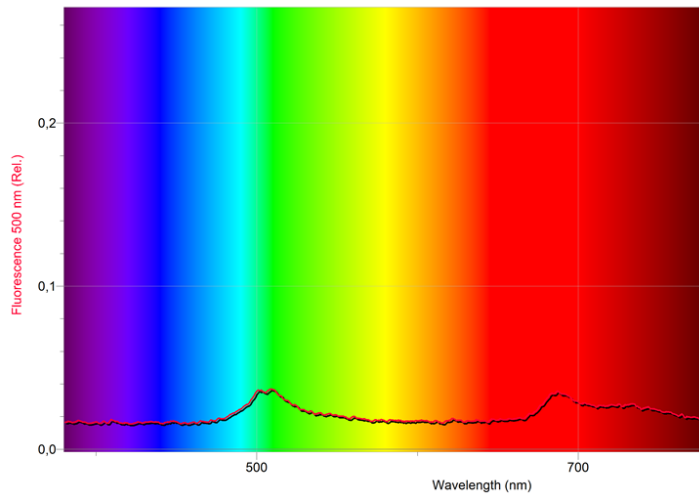
#### 4.8 MERITVE FLUORESCENCE

---

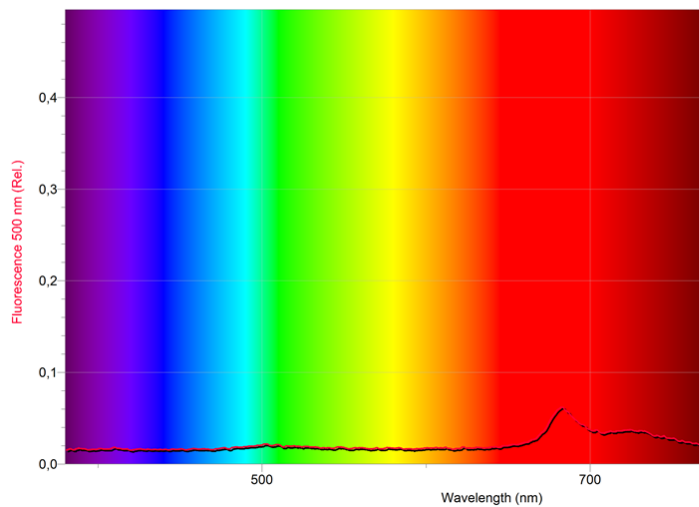
V alkoholnem ekstraktu lista je fotosintetski aparat uničen, tako da ob klorofilu ni drugih molekul, ki bi lahko sprejele energijo od klorofila. Klorofil tako vsrkane energije ne preda drugim molekulam, ampak jo odda kot svetlobno energijo (rdeče sevanje). Pravimo, da klorofil fluorescira. Klorofil je fluorescentna snov – vpija predvsem modro in svetlo rdečo svetlobo in oddaja temno rdečo svetlobo. Čiste etanolne ekstrakte smo dali v Fluorometer (SectroVIS fluorometer, Vernier) in vzorce vzbujali pri 500 nm. Rezultati so podani v preglednicah v nadaljevanju.



SLIKA 24. Fluorescenca klorofila vzbujanja pri 500 nm in eksitacijo pri 510 nm (ambrovec, 11.11 2016).



SLIKA 25. Fluorescenca klorofila vzbujanja pri 500 nm in eksitacijo pri 510 nm (magnolija, 11.11. 2016).



SLIKA 26. Fluorescenca klorofila vzbujanja pri 500 nm in eksitacijo pri 510 nm (ciklama, 11. 11. 2016).

PREGLEDNICA 27. Fluorescenca klorofila pri ambrovcu

<b>VZOREC</b>	<b>Vzbujanje pri <math>\lambda_{500}</math> nm Eksitacija pri 510 nm</b>
2.11. (zeleni)	0,367 relativnih enot
9.11. (zeleni)	0,192 relativnih enot
11.11. (zeleni)	0,081 relativnih enot

PREGLEDNICA 28. Fluorescenca klorofila pri zimzeleni magnoliji

<b>VZOREC</b>	<b>Vzbujanje pri <math>\lambda_{500}</math> nm Eksitacija pri 510 nm</b>
2.11.	0,416 relativnih enot
5.11.	0,326 relativnih enot
11.11.	0,351 relativnih enot
20.11.	0,206 relativnih enot

PREGLEDNICA 29. Fluorescenca klorofila pri navadni ciklami

<b>VZOREC</b>	<b>Vzbujanje pri <math>\lambda_{500}</math> nm Eksitacija pri 680 nm</b>
2.11.	0,585 relativnih enot
5.11.	0,626 relativnih enot
11.11.	0,771 relativnih enot
20.11.	0,655 relativnih enot

PREGLEDNICA 30. Meritve aktivnosti fluorescence pri različnih pH vrednostih

<b>pH</b>	<b>Ambrovec (zeleni listi) (2.11.) Vzbujanje pri <math>\lambda_{500}</math> nm Eksitacija pri 510 nm</b>	<b>Zimzelena magnolija (2.11.) Vzbujanje pri <math>\lambda_{500}</math> nm Eksitacija pri 510 nm</b>	<b>Navadna ciklama (2.11.) Vzbujanje pri <math>\lambda_{500}</math> nm Eksitacija pri 680 nm</b>
<b>2</b>	0,029	0,225	0,039
<b>4</b>	0,012	0,073	0,057
<b>7</b>	0,056	0,180	0,500
<b>8</b>	0,021	Ni fluorescence	Ni fluorescence
<b>10</b>	0,018	0,061	0,032
<b>12</b>	0,005	0,027	0,027

---

## 5 RAZPRAVA

---

### 5.1 EKSTRAKCIJA IN TLC ANALIZA

---

Pri *ekstrakciji* listov ambrovca, ki smo jih nabirali v novembru 2016, smo vse liste razvrstili glede na njihovo trenutno barvo (zelene, rumene, oranžne, rdeče in zeleno-rdeče). Po metanolni ekstrakciji in filtraciji smo najprej posneli njihove UV-VIS spektre. Spektri so nakazovali različno sestavo listnih barvil in tudi njihove različne koncentracije (graf 1-3). Ekstrakte smo nato nanесли na plošče za tankoplastno kromatografijo. Mobilna faza petroleter: aceton: kloroform = 3:1:1 se je izkazala za učinkovito predvsem za klorofile in karotenoide, mnogo manj za antociane, ki so ostali v območju startne linije. Na osnovi retencijskih faktorjev smo identificirali večino ločenih pigmentov in ugotovili, da je največja pestrost pri ambrovcu v zelenih ter najmanjša v rumenih in rdečih listih. V rumenih listih so prevladovali karotenoidi, v rdečih pa poleg ksantofilov še antociani. V oranžnih listih klorofilov ni bilo, ostali so le karoteni, feofitini, ksantofili in antociani. Večina posnetih spektrov je karakteristična za posamezna barvila, vendar smo opazili, da nam s TLC ločitvijo ni vedno uspelo pridobiti res samo eno barvilo (graf 4, 5 in 6). Možno je tudi, da je razgradnja barvil tako hitra, da smo dobili mešanico barvil in njihovih razgradnih produktov. Katera barvila prevladujejo v posameznih barvah listov, se lepo vidi tudi iz filtrirnih papirjev (Slika 19). Metoda kolonske kromatografije bi bila pri ločevanju posameznih barvil ustreznejša, pri identifikaciji pa bi si lahko pomagali še z UV lučjo, saj klorofili fluorescirajo. Žal ustrezne UV luči nismo imeli na voljo.

Pri magnoliji in ciklami smo na osnovi TLC kromatogramov identificirali šest različnih listnih barvil, ki so se pojavljala v listih ves november (Preglednica 2 in 3). Teh kromatogramov je bilo zaradi primerjave z ambrovcem za vsak vzorec vedno narejenih pet, saj smo le na ta način lahko primerjali koncentracijo listnih barvil v njih. Takoj po razvitju kromatogramov smo iz TLC plošče postrgali posamezna barvila in jih zbrali v ločenih frakcijah, ki smo jim ponovno posneli UV-VIS spektre (slika 22).

### 5.2 KONCENTRACIJA LISTNIH BARVIL

---

Na osnovi meritev absorbanc pri karakterističnih valovnih dolžinah smo za vsak rastlinski ekstrakt izračunali koncentracijo posameznih barvil.

Za ambrovec (vse barve listov skupaj) ugotavljamo, da se je v novembru 2016 koncentracija skupnih klorofilov zmanjšala od 0,252 mg/g listne mase na 0,048 mg/g listne mase. 20.11. 2016 je ostalo le še 19% klorofila, prisotnega 2. 11. 2016. Vsebnost karotenoidov je nihala med 0,22 mg/g do 0,070 mg/g in prav tako kaže trend padanja skozi cel november. Pri antocianih pa opazimo naraščanje, od začetnih 57,1mg/L (2. 11. 2016) do 144 mg/L (20. 11. 2016). Če koncentracijo listnih barvil povežemo z nihanji dnevnih temperatur v novembru 2016, opazimo, da prva negativna vrednost jutranjih temperatur (-2°C) (4. 11. 2016), ki ji je takoj sledil rahel dvig na +4°C, ni vplival na trende spreminjanja listnih barvil, precej bolj pa naslednji padec (9. 11. 2016), kjer je jutranja temperatura dva dni vztrajala na 0°C in se nato spustila na -4°C. Količina antocianov se je listih ambrovca izjemno povečala (od 62,1 na 121,0 mg/L) in se vztrajno dvigovala tudi kasneje, ko so se dnevne temperature spet dvignile na 10-12 °C

Pri navadni ciklami so bile koncentracije skupnih klorofilov ves čas bistveno višje, kot pri ambrovcu, in sicer od 0,370 mg/g do 0,446 g/mg . Opazimo trend padanja, vendar je razlika med začetkom meseca in 20.11. 2016 bistveno manjša, saj se pri navadni ciklami obdrži 83% začetne mase klorofila. Pri karotenoidih skozi cel mesec praktično ni razlik (nihanja med 0,20 mg/g do 0,22 mg/g ), pri antocianih pa opazimo po 9. 11. 2016 (prve nizke temperature (0°C), ki trajajo 2 dni) rahel dvig iz 14,0 mg/L na 17,4 mg/L .

Pri zimzeleni magnoliji se koncentracija klorofila giblje od 0,384 mg/g (2. 11. 2016) do 0,290 mg/g listne mase(konec novembra). Opazimo, da je največji padec pri dvodnevem vztrajanju temperature na 0°C (9. 11. 2016), vendar vrednost na koncu novembra še vedno predstavlja 76% vrednosti iz začetka novembra. Pri karotenihi opazimo, da se po prvi zmrzali nekoliko povišajo (5. 11. 2016) in nato ostanejo precej konstantni (0,134 mg/L). Vrednosti antocianov so se dvignile 9. 11. 2016 (prve nizke temperature (0°C), ki trajajo 2 dni) in nato ponovno znižale na vrednosti okoli 12,0 mg/L.

Zimzelena magnolija in navadna ciklama se razlikujeta v koncentraciji listnih barvil, a vidimo, da se njihove koncentracije v novembru spreminjajo primerljivo. Edini, ki zelo odstopa, je ambrovec. Ker smo v nalogi iskali povezavo med antociani in ostalimi listnimi barvili ter vsebnostjo dušikovih spojin, je bilo izhodišče, da ščitenje fotosintetskega aparata umirajočega (pred prostimi radikali) lista zelo malo prispeva k večanju zalog

ogljikovih spojin v rastlini, vpliva pa na transport dušikovih spojin. Pretok dušikovih spojin, na katere smo se preko meritev koncentracije nitratov in nitritov osredotočili v nadaljevanju, je pokazal zanimivo soodvisnost.

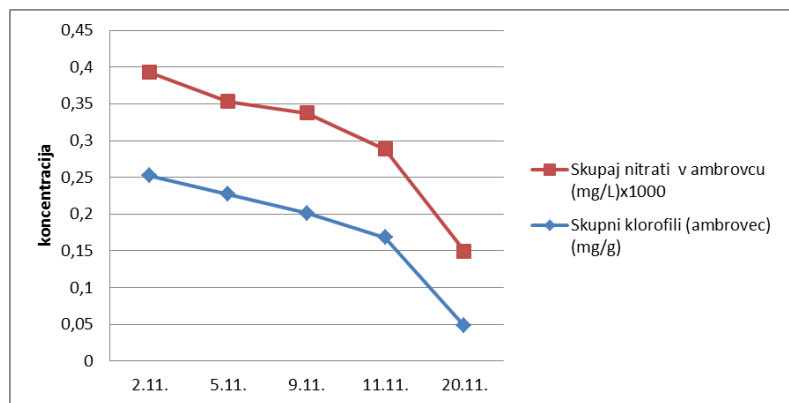
### 5.3 MERITVE SKUPNIH NITRATOV

---

Meritve dušikovih spojin v specifično obarvanih listih ambrovca so pokazale, da je največja koncentracija teh v rdeče-zelenih in rdečih listih, kjer so bile koncentracije tako visoke, da so presegale merilno območje aparature. Tudi dvojno razredčevanje ni veliko pomagalo, zato lahko zaključimo, da je vrednost skupnih dušikovih spojin, izražena v nitratih, presegala 84,0 mg/L.

V zelenih listih je bila koncentracija nitratov bistveno nižja. Gibala se je med 19,8 mg/L (2. 11. 2016) do 5,3 mg/L (20. 11. 2016). Sledijo oranžni listi Ambrovca, kjer so se koncentracije gibale med 29,9 mg/L do 9,9 mg/L, najnižje vrednosti pa so bile izmerjene od 7,7 mg/L do 2,2 mg/L. Pri vseh listih (razen rdeče obarvanih) opazimo trend zmanjševanja od 2. 11. do 20. 11. 2016. Tukaj opazimo povezavo z zunanjimi temperaturami, saj se ob pojavu prve zmrzali njihova količina v zelenih, rumenih in oranžnih listih zmanjša in se nato spet nekoliko poveča. Na transport dušikovih spojin najmanj vpliva rumena obarvanost listov, več kot je antocianov (oranžni, rdeči), višja je tudi koncentracija nitratov v njih, vendar le-ta vztrajno pada skozi cel november. V rdečih in rdeče zelenih listih ambrovca je koncentracija ostajala nespremenjena, oz. metoda merjenja, ki smo jo uporabili, ni pokazala odstopanj. Natančnih koncentracij nismo izračunali, ker so presegale merilno območje inštrumenta (fotometer F-11), ki smo ga uporabljali. Gibanje koncentracije skupnih nitratov v vseh barvah listov ambrovca v novembru 2016 kaže na trend padanja, vendar ta ni linearen in je v korelaciji z listnimi barvili.





GRAF 22. Korelacija med spreminjanjem vsebnosti skupnih klorofilov in skupnih nitratov v listih ambrovca

Iz grafa 22 vidimo, da kljub različnim velikostnim razredom obstaja podoben trend med spreminjanjem koncentracije klorofilov in nitratov v listih ambrovca. Ker se vrednost antocianov v tem času povečuje, zaključujemo, da imajo antociani v ambrovcu izjemno pomembno vlogo pri odstranjevanju dušikovih spojin, ki pa so v glavnem razgradni produkti klorofilov.

Pri zimzeleni magnoliji, kjer smo imeli opravka samo z zelenimi listi, rezultati meritev kažejo, da je razpad klorofilov precej manjši ( $\approx 25\%$ ), konstantna je tudi koncentracija karotena in antocianov, čeprav vsa listna barvila kažejo na trend zniževanja. Količine nitratov se, z izjemo meritve na dan 9. 11. 2016, ne spreminjajo in ostajajo v obsegu izven merilnega območja instrumenta. Zato smo ocenili, da so nad 84 mg/L. V rastlini torej transport dušikovih spojin poteka, aktivna pa so tudi vsa listna barvila.

Podobno velja tudi za gozdno ciklamo, a opazimo, da je vsebnost nitratov precej nižja, praviloma v merilnem območju (preglednica 25), in da se kljub nizkim ali manj ugodnim vremenskim razmeram količina listnih barvil ne spreminja veliko. Ciklama ima kljub svoji zeleno-rdeči barvi višjo koncentracijo skupnih klorofilov in primerljivo koncentracijo antocianov, vendar je pretok dušikovih spojin, izražen v količini nitratov, nižji. Ti rezultati nekoliko presenečajo, saj bi pričakovali, da bo v navadni ciklami vrednost antocianov v primerjavi z zimzeleno magnolijo precej višja in zato morda koncentracija klorofilov nekoliko nižja, a rezultati meritev tega ne kažejo.

Zato je zanimivo pogledati meritve fluorescence.

## 5.4 MERITVE FLUORESCENCE

---

Z meritvami fluorescence v metanolnih ekstraktih posameznih listnih barvil smo pridobili informacijo o stanju fotosintetskega aparata. Ker je v alkoholnem ekstraktu ta uničen, klorofil sprejete energije ne predaja drugim molekulam v PSI/PSII, temveč jo preda kot svetlobno energijo, ki jo na sliki 27 vidimo kot rdeče sevanje.



SLIKA 27. Fluorescenca klorofila v Spectro VIS fluorometru

Meritve fluorescence ekstraktov klorofila listov ambrovca, ki smo jih opravljali v času od 2. do 11. 11. 2016 kažejo, da vzbujanje z valovno dolžino 500nm povzroči eksitacijo pri 510nm (glej slike 24-26). Vrednosti absorbanc, merjene v relativnih enotah, pokažejo, da ta v omenjenem obdobju upade za 10-krat, kar sovpada z rezultati, ki smo jih dobili pri izračunih koncentracije skupnih klorofilov v prvem delu raziskave. Ekstrakti ambrovca, pridobljeni po 11. 11. 2016, niso več kazali fluorescence aktivnosti.

Flourescenca je bila izmerjena tudi pri ekstraktu zimzelene magnolije in navadne ciklame. Pri zimzeleni magnoliji se vrednosti flourescence spreminjajo; vrednosti se nižajo, kar pomeni, da tudi fotosintetski aparat slabi, opazimo  $\approx 50\%$  znižanje.

Pri navadni ciklami opazamo nihanja, ki se gibljejo od 0,585 do 0,771 relativnih enot (preglednica 29), vendar ne opazimo trend zniževanja, kar pomeni, da fotosintetski aparat pri navadni ciklami v veliki meri ohrani svojo aktivnost (zmogljivost). Vendar pri navadni ciklami opazimo še nekaj, kar zahteva nadaljnje raziskovanje. Vzbujanje s svetlobo valovne dolžine 500 nm ne povzroči eksitacije pri 510 nm (ambrovec in zimzelena magnolija), ampak pri 680 nm. Gre za izjemno velik premik, ki ga na osnovi predstavljenih meritev ne zmoremo ustrezno pojasniti, a dejstvo je, da je ciklama s svojo nenavadno razporeditvijo listnih barvil (antociani pri navadni ciklami so koncentrirani v

vakuolah na spodnji strani listov, zgoraj pa so listne ploskve povsem zelene) drugače prilagojena na neugodne zimske razmere. Premik k daljšim valovnim dolžinam lahko kaže na povečano knjugacijo (polimerizacija?) klorofilov.

Na osnovi predstavljenih meritev zaključujemo, da bi meritve optičnih lastnosti starajočih se jesenskih listov z in brez antocianov lahko dale dokončen odgovor na dilemo, kakšna je vloga antocianov v starajočih se listih. Z rezultati, ki smo jih dobili, ne moremo potrditi, da antocianini v starajočih se listih tvorijo pigmentni zaslon, ki ščiti zelo oslavljen fotosintetski aparat pred odvečno svetlobno energijo. To bi lahko veljajo za primer navadne ciklame, vendar bi potrebo po zaščiti kloroplastov zaradi presežka absorpcije svetlobe lahko opravili tudi ksantofili oziroma karotenoidi, ki so bili vedno prisotni, ne glede na barvo lista ali vrsto rastlin.

Ker se rdeča barva ne razvije pri vseh listih ambrovca, predvidevamo, da antocianska akumulacija v vakuolah razvojno določena na ravni tkiva listov. Razgradnja klorofilov očitno povzroči sproščanje različnih produktov, ki se transportirajo v vakuolo, kjer poteče proces detoksikacije, v katerega so vključeni antociani. Samo del razgradnih produktov gre v olesenele dele. A če prosti klorofil pri razgradnji ni zaščiten pred svetlobo, lahko nenadzorovano sproščanje njegovih razgradnih produktov ogrozi vitalnost celotnega lista (npr. peroksidacijo membranskih lipidov) (Merzlyack s sod. 2000), zato je pomembno, da se koncentracija antocianov povečuje.

Da gre »programiran« proces na ravni listnega tkiva čisto, potrjujejo rumeni listi, ki nimajo antocianov. Vso zaščitno nalogo opravijo karotenoidi, a je tukaj transport dušika najslabši, kar pomeni, da se dušikove spojine shranjujejo (razpad klorofilov) še na drug način in ne nujno pri detoksikaciji v vakuolah z antociani. Očitno gre za proces, ki je veliko učinkovitejši, saj smo v rumenih listih izmerili z naskokom najmanjšo koncentracijo dušikovih spojin.

Na osnovi rezultatov poskusov zaključujemo, da je pri ambrovcu vloga antocianov predvsem v zaščiti rastline pred škodljivimi razgradnimi produkti klorofilov. Le-ti se preko antocianov varno odložijo v tla in rastlini ne škodijo. Menimo pa, da je proces razvojno programiran na ravni listov. To hipotezo v svojih raziskavah potrjuje tudi Matile s sod. (1999 in 2000).

## 5. 5 VPLIV PH NA FLUORESCENCO EKSTRAKTOV LISTNIH BARVIL

---

Ko smo ekstrakte izpostavili različnim pH vrednostim, od pH 2 do pH 12, smo opazili, da sprememba pH vpliva na fluorescenco klorofilov pri vseh ekstraktih, vendar najbolj pri ambrovcu in najmanj pri zimzeleni magnoliji ter ciklami. To smo pričakovali, saj je pri ambrovcu fotosintetski aparat v pozni jeseni že močno prizadet. Ugotovili smo, da ima znižanje pH večji učinek na fluorescenco klorofila kot zvišanje pH (bolj alkalno območje). Najmanjša sprememba je zabeležena pri nevtralnem pH 7, kar je razumljivo.

## 6 ZAKLJUČKI

---

Skupna količina klorofilov se je v času od 2. 11. 2016 do 28. 11. 2016, s starostjo listov ambrovca, zmanjševala. Vsebnost klorofila je padla od 0,252 mg/g listne mase na 0,048 mg/g listne mase, kar pomeni, da so se v celoti zmanjšali za 81 %. Pri zimzeleni magnoliji je bilo zmanjšanje skupnih klorofilov bistveno manjše, od 0,384 mg/g do 0,290 mg/g listne mase in najmanj pri navadni ciklami, kjer so se koncentracije gibale med 0,370 mg/g do 0,4446 mg/g listne mase. Tako pri zimzeleni magnoliji kot navadni ciklami smo preko TLC kromatogramov opazili, da se razmerja med *klorofilom a* in *b* niso spreminjala, pri ambrovcu pa je *klorofil b* izjemno hitro razpadel, saj ga že na kromatogramu dne 5. 11. 2016 nismo več opazili. S tem je prva hipoteza delno potrjena, saj smo tako pri ambrovcu kot pri navadni ciklami in zimzeleni magnoliji opazili trend padanja skupnih klorofilov.

Razgradnja klorofila *b* je bila mnogo hitrejša kot razgradnja klorofila *a*, kar povezujemo tudi s spremembami vsebnosti vode v listih. Slednjega v meritvah nismo zajeli, saj smo ekstrakte pridobili iz svežih listov. To ocenjujemo kot pomanjkljivost te raziskave, saj bi nam ti podatki pri končni interpretaciji rezultatov lahko zelo pomagali. Tudi pH metanolnih ekstraktov ni bil izmerjen, ker šolski pH-metri natančno merijo le v vodnih raztopinah. Morali bi torej vzporedno delati alkoholne in vodne ekstrakte, kar bi že tako veliko količino meritev zelo povečalo ter otežilo primerjavo rezultatov, saj predvidevamo, da bi bila kislinska hidroliza klorofilov v vodi še hitrejša, potrebovali pa bi tudi bistveno več listnega materiala primerljive kakovosti. Čeprav je v naših ekstraktih prevladoval metanol in razlik v pH nismo mogli izmeriti, rezultati tankoplastne kromatografije, UV-VIS spektrometrije in fluorescence potrjujejo drugo hipotezo, ki pravi, da bo razgradnja klorofila *b* hitrejša kot razgradnja klorofila *a* (glavnega fotosintetskega barvila). Potrjena

je tudi hipoteza številka 3, saj se je fotosintetski aparat vseh treh ekstraktov klorofilov mnogo bolj odzval v kislih pufrih (pH 2 in pH 4) kot v nevtralnem ali bazičnem.

Poviševanje količine nitratov v ekstraktih nakazuje višjo vsebnost dušikovih spojin, ki pa verjetno ne predstavljajo ionske oblike, temveč organske dušikove spojine in v glavnem razgradne produkte klorofilov. V kolikor je koncentracija dušikovih spojin bolj ali manj konstantna, ti ne vplivajo na spremembe pH v citoplazmi, zato tudi ne na stabilnost fotosintetskega aparata. Te zaključke potrjuje primerjava količine skupnih nitratov v ambrovcu, saj vidimo, da je ta v tesni povezavi z barvo listov. Najvišje koncentracije smo zabeležili pri rdečih in zeleno rdečih listih ter najmanjše pri rumenih. S padanjem koncentracije skupnih klorofilov, pada tudi koncentracija nitratov. Pri antocianinih je trend obraten. Višja kot je vsebnost antocianov, višje so koncentracije skupnih nitratov. Pri magnoliji je vrednost skupnih nitratov visoka, precej višja kot pri navadni ciklami. Vendar je pri navadni ciklami višji tako delež klorofilov kot antocianov. Fotosintetski aparat navadne ciklame deluje drugače kot fotosintetski aparat zimzelene magnolije. Rezultati meritev fluorescence pri zimzeleni magnoliji in navadni ciklami nakazujejo, da so te rastline pH manj občutljive, in morda je to razlog (poleg ostalih prilagoditev, ki jih imajo), da lahko preživijo tudi manj ugodnih vremenskih razmerah. Primerjava z ambrovcem ni več primerna, saj je očitno, da smo meritve začeli izvajati v času, ko je bil fotosintetski aparat že močno oslabljen.

Antocianini predstavljajo nov razred rastlinskih dušikovih barvil in njihova količina v listopadnem ambrovcu se v novembru zmanjšuje, od 19,8 do 5,3mg/L. Povezana je z barvo listov; bolj kot so listi rdeči, več jih je in večja je tudi količina nitratov, kar bi lahko pomenilo, da rastlina del dušikovih spojin odloži v antocianine in le del v olesenele dele rastline. Torej presežek z odpadanjem listov odstrani v okolje, kjer ga mikroorganizmi v zemlji razgradijo nazaj v osnovne dušikove spojine (nitrati, nitriti), ki se lahko uporabijo v novem vegetacijskem ciklu. Tak zaključek podpira hipotezo, da so antocianini le sistem za izločanje rastlini škodljivih snovi in torej v pozno jesenskem času ne služijo kot pomožna fotosintetska barvila. S tem smo potrdili sedmo hipotezo, da se funkcionalni pomen antocianov v ambrovcu nanaša predvsem na transport hranil – dušikovih spojin. Na ta način bi lahko odgovorili tudi na vprašanje, zakaj se vsi listi ne obarvajo rdeče istočasno oz. zakaj se nekateri sploh ne obarvajo. Gotovo je to odvisno tudi od vsebnosti vode oz.

spremembe pH, ki vpliva na delovanje encimskih sistemov. V ekstraktih ambrovca smo s TLC izolirali tudi feofitine, razgradne produkte klorofilov, ki so precej bolj topni v vodi in lahko pospešijo kislinsko hidrolizo. Očitno je, da razgradnja klorofilov ne povzroči sproščanja dušikovih spojin, ki bi se direktno transportirali v olesenele dele rastline, temveč se velik del razgradnje klorofilov, preko antocianov, odloži v odpadle liste. Torej imajo antociani v tem smislu veliko zaščitno funkcijo.

Pri ostalih dveh testnih rastlinah, navadni ciklami in zimzeleni magnoliji, se količina antocianov v novembru 2016 ni bistveno spreminjala, kar potrjuje hipotezo št. 5. Antociani v teh rastlinah delujejo kot svetlobni filter in tako ščitijo mezofil, ki preko absorpcije predvsem modrega dela svetlobe prepreči tudi razpad različnih encimov, ki razgrajujejo snovi v listu in sodelujejo pri njihovem transportu v olesenele dele rastline. Zato se njihova koncentracija dosti ne spreminja, a se odziva na temperaturne spremembe v okolju. Zaključujemo, da sta se evolucijsko očitno razvila vsaj dva vzporedna mehanizma delovanja antocianov. Zakaj so enkrat zbrani v vakuolah na spodnji strani lista (navadna ciklama) in drugič razpršeni v notranjosti lista, odgovora še vedno ne poznamo. Primer navadne ciklame in zimzelene magnolije govori v prid hipoteze, da razpad klorofilov ni programiran na ravni lista, ampak na ravni celotne rastline. Primer ambrovca zagovarja razpad programiranost na ravni lista.

Hipoteze šest nismo potrdili, saj smo predpostavili, da zimzelena magnolija v opazovanem obdobju ne razvije antocianov. Res je, da so listi te rastline povsem zeleni in v novembru brez rdečih odtenkov, vendar je količina antocianov v rastlini konstantna in stalno prisotna.

Hipoteza sedem je potrjena - funkcionalni pomen antocianov v jesenskih listih listopadnih drevesnih vrst je povezan s transportom hranil in ta v različno obarvanih listih ambrovca niso prisotna v enakih količinah.

Hipoteza št. 8 pravi, da se bo količina dušikovih spojin (izraženo kot nitrati) v ambrovcu zmanjševala, pri zimzeleni magnoliji in navadni ciklami pa se ne bo spreminjala, je delno potrjena. Pri ambrovcu je tesno povezana z barvo listov, pri zimzeleni magnoliji in navadni ciklami pa niha, vendar je v novembru 2016 opazen trend padanja.

Raziskovalna naloga je bila kompleksna in je zahtevala veliko časa za ekstrakcijo listnih barvil, njihovo ločevanje preko tankoplastne kromatografije in vse spektrofotometrične analize, ki so sledile. Vsakokrat smo delali s sedmimi različnimi vzorci (in še dodatnimi za izolacijo posameznih listnih barvil pri zimzeleni magnoliji in navadni ciklami), katerih število se je po TLC analizi še namnožilo. Meritve so morale biti opravljene čim hitreje, saj klorofili zelo hitro razpadajo. Velika količina meritev in njihovih rezultatov je zahtevala natančnost in dobro organiziranost majhne raziskovalne skupine, ter veliko prostora v laboratoriju. Poskušali smo maksimalno izkoristiti opremo, ki nam je bila na voljo, in izvajati poskuse v več paralelkah, kar je bila prednost te raziskave. Celoten metanol smo s pomočjo rotavaporja predestilirali in s tem minimalno obremenili okolje ter poskuse izvajali, kolikor je bilo mogoče varčno.

Kot pomanjkljivosti te raziskave vidimo:

- odsotnost vodnih ekstraktov in meritev pH,
- odsotnost meritev drugih hranil v ekstraktu,
- odsotnost meritev vseh encimskih procesov, povezanih z razgradnjo klorofilov,
- odsotnost meritev drugih okoljskih dejavnikov (osvetljenost, drugi abiotski dejavniki),
- čas trajanje meritev; po 20. 11. 2016 ambrovec listov praktično ni imel več, zato bi bile nadaljnje primerjave z navadno ciklamo in zimzeleno magnolijo manj primerne,
- meritve fluorescence so bile mogoče le z vzbujanjem pri dveh valovnih dolžinah (405 in 500nm); natančnejše meritve bi bile mogoče z vzbujanjem v krajšem delu UV elektromagnetnega valovanja,
- v nalogi smo s TLC slabo ločevali antociane, saj je bila mobilna faza pripravljena za klorofile; z boljšim razločevanjem rdečih barvil bi lahko pridobili dodatne informacije o sestavi rastlinskih barvil v pozno jesenskih listih.

Čeprav je področje rastlinske fiziologije in z njimi povezanimi asimilacijskimi barvili vedno burilo znanstveno radovednost in so zato bile velikokrat predmet raziskav, menimo, da so tovrstne raziskave še vedno zanimive in potrebne. Prilagojenost rastlin na različne okoljske dejavnike navdušuje. Navdušuje pestrost, ki so jo različne rastlinske

vrste razvile. Njihovo dobro poznavanje nam omogoča bolje razumeti okolje, katerega del smo, pomaga razumeti tudi raznolikost skupnosti, kjer se zdi, da smo vsi enaki, pa vendarle nismo, kot tudi ne listi enega drevesa.

## 7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

---

Problematika čistega in zdravega okolja in klimatskih sprememb postaja vse pomembnejša kategorija trajnostnega razvoja, zato jo moramo upoštevati pri vseh vidikih našega delovanja. Eden izmed poglavitnih namenov raziskave »Zakaj niso vsi rastlinski listi v jeseni rdeči?« je razumevanje prilagoditev, ki so jih rastline evolucijsko razvile, da bi na ta način prispevali k pravilnejšim odločitvam človekovih posegov v okolje v prihodnje. Raziskava izkazuje visoko raven družbene odgovornosti; naloga je bila izvedena na okolju prijazen način in izdelana z minimalnimi količinami odpadkov.



## UPORABLJENI VIRI

---

- Archetti, M. J. (2000). *Theor Biol.*; 205(4):625-30.
- Boh, B. Barvila in naravna barvila: učbenik. 2000. Ljubljana: Tehniška založba Slovenije.
- Brown, S., and W. Hamilton. (2001). Autumn leaf colours and herbivore defense. *Proceedings of the Royal Society of London B. Biological Sciences* 268:1489–1493.
- Chalker-Scott L. (1999). Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochem Photobiol.*;70:1–9.
- Chen M, Blankenship RB (2011) Expanding the solar spectrum used by photosynthesis. *Trends Plant Sci* 16: 427-431.
- Chen, M., Schliep, M., Willows, R., Cai, Z.L., Neilan, B.A., Scheer, H. (2010). A red-shifted chlorophyll. *Science* 329: 1318-1319.
- Chen, M., Scheer, H. (2013) Extending the limit of natural photosynthesis and implications of technical light harvesting, *J Porphyrins Phthalocyanines* 17: 1-15.
- Coley, P. D., and J. A. Barone. (1996). Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 27:305–335.
- Cotič Gabrijel, B. (2012). Določanje nekaterih anorganskih in organskih onesnaževal v vodah. Diplomsko delo. Pedagošk fakultata, BTF, FKKT, NTF, Univerza V Ljubljani.
- Delpetch, R. (2000). The Importance of red pigments to plant life: experiments with anthocyanins. *Journal of Biology Education*, 34(4), 208 -211.
- Dominy, N. J., and P. W. Lucas. (2001). Ecological importance of trichromatic vision to primates. *Nature* 410:363–366.
- Demmig-Adams B., Adams W.W. (1992). III Photoprotection and other response of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*;43:599–626.
- Dodd, I.C., Critchley C., Woodall, G.S., Stewart, G.R. (1998). Photoinhibition in differently colored juvenile leaves of *Syzygium* species. *J Exp Bot.*;49:1437–1445.
- Erge, S. H., Karadeniz, F., Koca, N., Soyer, Y. (2008). Effect of heat treatment on chlorophyll degradation and color loss in green peas. *GIDA* 33 (5) : 225-233.
- Field, T. S., D. W. Lee and N. M. Holbrook. (2001). Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. *Plant Physiology* 127:566–574.
- Giusti, M.M., Wrolstad, R., E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. V knjigi: In book: *Current Protocols in Food Analytical*

Chemistry.

Dostopno

na:

<https://www.researchgate.net/publication/230254710> Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy (povzeto 3.12. 2016).

Gould, K. S., and D. W. Lee (eds.) 2002. Anthocyanins and Leaves. The Function of Anthocyanins in Vegetative Organs. London: Academic Press, Advances in Botanical Research, vol. 37.

Hoch, W. A., E. L. Zeldin and B. H. McCown. (2001). Physiological significance of anthocyanins during autumnal leaf senescence. *Tree Physiology* 21:1–8.

Harborne JR. The flavonoids: recent advances (1988). In: Goodwin TW, editor. *Plant Pigments*. London: Academic Press; pp. 299–343.

Joseph, J. A., B. Shukitt-Hale, N. A. Denisova, D. Bielinski, A. Martin, J. J. McEwen and P. C. Bickford. (1999). Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *The Journal of Neuroscience* 19:8114–8121.

Jackson, A.H. (1976). Structure, properties and distribution of chlorophylls. *Chemistry and Biochemistry of Plant pigments*, 2,. In Godwin, T.W. Academic Press, New York, 1975, 1.

King J. (1997). *Reaching for the Sun: How Plants Work*. Cambridge: Cambridge University Press.

Kozlowski, T.T., Pallardy, S.D. (1997). *Physiology of Woody Plants*. New York: Academic Press.

Kozlowski TT, Pallardy SD. *Physiology of Woody Plants*. New York: Academic Press; 1997.

Killingbeck, K.T. (1996). Nutrients in senesced leaves: keys to the search for potential resorption and resorption proficiency. *Ecology*;77:1716–1727.

Klimov, V.V. (2003). Discovery of pheophytin function in the photosynthetic energy conversion as the primary electron acceptor of Photosystem II. *Photosynthesis Research* 76,: 247–253.

Larcher W. (2001). *Physiological Plant Ecology*. Verlag Berlin Heidelberg, Springer: 513 str.

Lee, D. W., Brammeier, S. in Smith, A. P. (1987). The selective advantages of anthocyanins in developing leaves of mango and cacao. *Biotropica* 19:40–49.

Lee, D. W., in T. W. Collins (2001). Phylogenetic and ontogenetic influences on the distribution of anthocyanins and betacyanins in leaves of tropical plants. *International Journal of Plant Science* 162:1141–1153.

Lev-Yaudin, S., Holopainen, J. (2011). How red is red autumn leaf herring and did it lose its red colour? *Plant Signaling&Behavior*, 6, , 1879.

Likar, M. (2016). Interakcije rastlin z drugimi organizmi. Navodila za vaje. Dostopno na: [file:///C:/Users/Uporabnik/Documents/raziskave%2016\\_17/jakob%20andric/Interakcije\\_rastlin%20s%20patogeni.pdf](file:///C:/Users/Uporabnik/Documents/raziskave%2016_17/jakob%20andric/Interakcije_rastlin%20s%20patogeni.pdf) (dostopno: 2.11. 2016).

Lichtenthaler , K. L ., Buschmann, C. (2001). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* John Wiley & Sons, Inc .

Matile P, Flach B.M.P., Eller, B.M. (1992). Autumn leaves of Ginkgo Biloba L.: optical properties, pigments and optical brighteners. *Bot Acta*;105:13–17.

Matile P. *Exp Gerontol*. (2000). Mar; 35(2):145-58.

Marrs, K.A., Alfenito MR, Lloyd AM, Walbot V *Nature*(1995). 375(6530):397-400.

Matile P., Hortensteiner S., Thomas ,H. (1999). *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*; 50:67-95.

Merzlyak MN, Chivkunova OBJ *Photochem Photobiol B*. 2000 Apr-May; 55(2-3):155-63.

Mohr, H., Schopfer, P. (1994). *Plant Physiology*. New York: Springer-Verlag.

Neill, S. O., K. S. Gould, P. A. Kilmartin, K. A. Mitchell and K. R. Markham. 2002. Antioxidant activities of red versus green leaves in *Elatostema rugosum*. *Plant Cell and Environment* 25:537–549.

Pivk, B. INSTRUMENTALNE METODE V ANALIZNI KEMIJI. Učno gradivo, ki je nastalo v okviru projekta Munus 2. Njegovo izdajo je omogočilo sofinanciranje Evropskega socialnega sklada Evropske unije in Ministrstva za šolstvo in šport (2011). Dostopno na: [http://www.mizs.gov.si/fileadmin/mizs.gov.si/pageuploads/podrocje/Strukturni\\_sklad\\_i/Gradiva/MUNUS2/MUNUS2\\_61FizKemLabMetode.pdf](http://www.mizs.gov.si/fileadmin/mizs.gov.si/pageuploads/podrocje/Strukturni_sklad_i/Gradiva/MUNUS2/MUNUS2_61FizKemLabMetode.pdf) (2.11. 2016).

Schwartz, S.J, Elbe, J.H. (1983). *Journal of Food Science*, 48, 13030.

Shirley B.W. (1996). Flavonoid biosynthesis: “new” functions for an “old” pathway. *Trends Plant Sci*;1:377–382.

Simms, E. L., and M. A. Bucher (1996). Pleiotropic effects of flower color intensity on herbivore performance in *Ipomoea purpurea*. *Evolution* 50:957–963.

Šircelj H. 2007. Karotenoidi v fotosinteznem aparatu in odziv na stres. *Acta agriculturae Slovenica*, 91: 271-282.

Taiz, L., Zeiger, E. (1998) *Plant Physiology*, druga izdaja, Sinauer Associates, Sunderland, 792s.

Taiz L., Zeiger E. (2010). *Plant Physiology*. USA. Sinauer Associates inc.: 690 str.

Tsuda, T., Y. Kato and T. Osawa. 2000. Mechanism for the peroxynitrite scavenging activity by anthocyanins. *FEBS Letters* 484:207–210.

Trošt T. 2005. Fiziološki, biokemijski in morfo-genetski učinki na smreko (*Picea abies*) med večletno izpostavljenostjo sevanju UV-B. Doktorska disertacija. Biotehniška fakulteta: 87 str.

Vilhar, B.,(2007a): Zakaj jeseni listi spremenijo barvo? *Proteus* 70: 72-74.

Vilhar, B.,(2007b). Zakaj so rastline zelene? In zakaj nekatere rastline niso zelene? *Proteus* 69: 350-355.

Vass I. 2011. Molecular mechanisms of photodamage in the Photosystem II complex. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1016: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.04.014>.

Zaletel, N. Ko je svetlobe preveč ali kako se rastline odzivajo na veliko svetlobno jakost. BTF, oddelke za agronomijo, UL. Diplomski projekt, 2011, Ljubljana.

Yang PM, Tseng HH, Peng CW, Chen WS, and Chiu SJ 2012. Dietary flavonoid fisetin targets caspase-3-deficient human breast cancer MCF-7 cells by induction of caspase-7-associated apoptosis and inhibition of autophagy. *Int J Oncolog* 40(2):469-478.

### **Internetni viri**

<http://www.plantagea.hr/aromaterapija/biljna-ulja-2/kemizam-biljnih-ulja-2/ugljkovodici-i-pigmenti-2/> (dostopno: 2.1. 2017).

## PRILOGA 1 – TLC KROMATOGRAMI (IDENTIFIKACIJ LISTNIH BARVIL IN KONCENTRACIJA NITRATOV TER NITRITOV V NJIH)

PREGLEDNICA 31. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v posameznih ekstraktih (ambrovec, 11. 2016) 5.

Vzorec	barva	Rf vrednosti	identifikacija	[NO <sub>3</sub> -], mg/L	[NO <sub>2</sub> -], mg/L
1-zeleni listi	rumen	0,20	ksantofil	16,0	1,6
	modro-zelen	0,48	Klorofil a		
	zelen	0,42	Klorofil b		
	siv	0,79	feofitin		
	Rumeno - oranžen	0,95	karoteni		
	vijoličen	≈0,1	antociani		
2- rumeni	Rumeno-oranžen	0,97	karoteni	6,0	1,0
	siv	0,77	feofitin		
	rumen	0,21	ksantofil		
3- oranžni	Rumeno-oranžen	0,97	karoteni	26,0	1,8
	rumen	0,21	ksantofil		
	siv	0,76	feofitini		
	vijoličen	≈0,1	antociani		
4- rdeči	Rumen	0,21	ksantofili	36,0	>2,0
	Rumena-zelena	0,58	????		
	vijolična	≈0,1	antociani		
5- rdeče zelen	vijoličen	≈0,1	antociani	34,00	>2,0
	rumen	0,19	ksantofili		
	Modro-zelen	0,48	Klorofil a		
	siv	0,79	feofitini		
	Rumeno - oranžen	0,96	karoteni		

PREGLEDNICA 32. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v posameznih ekstraktih (ambrovec, 9. 11. 2016)

Vzorec	barva	Rf vrednosti	identifikacija	[NO <sub>3</sub> -], mg/L	[NO <sub>2</sub> -], mg/L
1-zeleni listi	rumen	0,21	ksantofil	18	1,6
	Modro-zelen	0,46	Klorofil a		
	siv	0,78	feofitin		
	Rumeno - oranžen	0,97	karoteni		
	vijoličen	≈0,1	antociani		
2- rumeni	Rumeno - oranžen	0,97	karoteni	8,0	1,0
	siv	0,77	feofitin		
	rumen	0,21	ksantofil		
3- oranžni	Rumeno - oranžen	0,97	karoteni	22	1,8
	rumen	0,21	ksantofil		
	siv	0,76	feofitini		
	vijoličen	≈0,1	antociani		
4- rdeči	Rumen	0,21	ksantofili	>40	>2,0
	Rumena-zelena	0,58	????		
	vijolična	≈0,1	antociani		
5- rdeče zelen	vijoličen	≈0,1	antociani	>40	>2,0
	rumen	0,19	ksantofili		
	Modro-zelen	0,48	Klorofil a		
	siv	0,79	feofitini		
	Rumeno - oranžen	0,96	karoteni		

PREGLEDNICA 33. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v posameznih ekstraktih (ambrovec, 11. 11. 2016)

Vzorec	barva	Rf vrednosti	identifikacija	[NO <sub>3</sub> -], mg/L	[NO <sub>2</sub> -], mg/L
1-zeleni listi	rumen	0,31	ksantofil	10,8	1,62
	Modro-zelen	0,46	Klorofil a		
	siv	0,74	feofitin		
	Rumeno - oranžen	0,95	karoteni		
	vijoličen	≈0,1	antociani		
2- rumeni	Rumeno-oranžen	0,97	karoteni	3,6	0,96
	siv	0,74	feofitin		
	rumen	0,23	ksantofil		
3- oranžni	Rumeno-oranžen	0,97	karoteni	17,2	1,86
	rumen	0,22	ksantofil		
	siv	0,77	feofitini		
	vijoličen	≈0,1	antociani		
4- rdeči	Rumen	0,21	ksantofili	>40	>2,0
		0,54	????		
	vijolična	≈0,1	antociani		
5- rdeče zelen	vijoličen	≈0,1	antociani	>40	>2,0
	rumen	0,19	ksantofili		
	Modro-zelen	0,47	Klorofil a		
	siv	0,79	feofitini		
	Rumeno - oranžen	0,96	karoteni		

PREGLEDNICA 34. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v posameznih ekstraktih (ambrovec, 20. 11. 2016)

Vzorec	barva	Rf vrednosti	identifikacija	[NO <sub>3</sub> -], mg/L	[NO <sub>2</sub> -], mg/L
1-zeleni listi	rumen	0,28	ksantofil	4,1	1,1
	Modro-zelen	0,45	Klorofil a		
	siv	0,73	feofitin		
	Rumeno - oranžen	0,94	karoteni		
	vijoličen	≈0,1	antociani		
2- rumeni	Rumeno-oranžen	0,95	karoteni	1,9	0,4
	siv	0,75	feofitin		
	rumen	0,21	ksantofil		
3- oranžni	Rumeno-oranžen	0,96	karoteni	9,0	0,9
	rumen	0,21	ksantofil		
	siv	0,75	feofitini		
	vijoličen	≈0,1	antociani		
4- rdeči	Rumen	0,20	ksantofili	>40	>2,0
		0,51	????		
	vijolična	≈0,1	antociani		
5- rdeče zelen	vijoličen	≈0,1	antociani	>40	>2,0
	rumen	0,22	ksantofili		
	Modro-zelen	0,46	Klorofil a		
	siv	0,78	feofitini		
	Rumeno - oranžen	0,97	karoteni		

PREGLEDNICA 35. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v posameznih ekstraktih (ambrovec, 28. 11. 2016)

Vzorec	barva	Rf vrednosti	identifikacija	[NO <sub>3</sub> -], mg/L	[NO <sub>2</sub> -], mg/L
Zadnji listi na drevesu (skupaj)	rumen	0,39	ksantofil	22,00	1,07
	Modro zelen	0,68	Klorofila a		
	Rumeno - oranžen	0,94	karoteni		
	vijolična	0,12	antociani		



PREGLEDNICA 36. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v zimzeleni magnoliji (28. 11. 2016)

Vzorec	barva	Rf vrednost	Identiteta	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ], mg/L	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ], mg/L
1- zeleni	zelen	0,43	Klorofil b	>80	>4,00
	rumen	0,61	lutein		
	Modro zelen	0,67	Klorofil a		
	siv	0,75	feofitin		
	Rumeno - oranžen	0,94	karoten		
	vijolična	≈0,13	antociani		

PREGLEDNICA 37. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v zimzeleni magnoliji (9. 11. 2016)

Vzorec	barva	Rf vrednost	Identiteta	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ], mg/L	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ], mg/L
1- zeleni	zelen	0,49	Klorofil b	28	>4
	rumen	0,60	lutein		
	Modro zelen	0,67	Klorofil a		
	rumen	0,37	ksantofil		
	Rumeno - oranžen	0,94	karoten		
	vijolična	≈0,13	antociani		

PREGLEDNICA 38. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v zimzeleni magnoliji (11. 11. 2016)

Vzorec	barva	Rf vrednost	Identiteta	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ], mg/L	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ], mg/L
1- zeleni	zelen	0,47	Klorofil b	30,0	2,3
	rumen	0,63	lutein		
	Modro zelen	0,71	Klorofil a		
	rumen	0,35	ksantofil		
	Rumeno - oranžen	0,92	karoten		
	vijolična	≈0,13	antociani		

PREGLEDNICA 39. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v zimzeleni magnoliji (5. 11. 2016)

Vzorec	barva	Rf vrednost	Identiteta	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ], mg/L	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ], mg/L
1- zeleni	zelen	0,45	Klorofil b	>80	>4,0
	rumen	0,28	ksantofil		
	Modro zelen	0,69	Klorofil a		
	rumen	0,55	lutein		
	Rumeno - oranžen	0,91	karoten		
	vijolična	≈0,13	antociani		

PREGLEDNICA 40. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v navadni ciklami (20. 11. 2016)

Vzorec	barva	Rf vrednosti	identitete	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ], mg/L	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ], mg/L
Ciklama	zelen	0,42	Klorofil b	14,0	2,00
	Modro zelen	0,49	Klorofil a		
	siv	0,69	feofitin		
	rumen	0,23	ksantofil		
	Rumeno - oranžen	0,95	karoten		
	vijoličen	≈0,10	antociani		

PREGLEDNICA 41. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v navadni ciklami (11. 11. 2016)

Vzorec	barva	Rf vrednosti	identitete	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ], mg/L	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ], mg/L
Ciklama	zelen	0,44	Klorofil b	18,0	2,2
	Modro zelen	0,51	Klorofil a		
	siv	0,71	feofitin		
	Rumeno - oranžen	0,95	karoten		
	vijoličen	≈0,14	antociani		

PREGLEDNICA 42. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v navadni ciklami (9. 11. 2016)

Vzorec	barva	Rf vrednosti	identitete	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ], mg/L	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ], mg/L
Ciklama	zelen	0,42	Klorofil b	20,0	3,0
	Modro zelen	0,50	Klorofil a		
	siv	0,72	feofitin		
	rumen	0,20	ksantofil		
	Rumeno - oranžen	0,95	karoten		
	vijoličen	≈0,14	antociani		

PREGLEDNICA 43. Rezultati TLC in meritve dušikovih spojin v navadni ciklami (5. 11. 2016)

Vzorec	barva	Rf vrednosti	identitete	[NO <sub>3</sub> -], mg/L	[NO <sub>2</sub> -], mg/L
Ciklama	zelen	0,41	Klorofil b	10,00	>2,00
	Modro zelen	0,51	Klorofil a		
	siv	0,73	feofitin		
	rumen	0,22	ksantofil		
	Rumeno-oranžen	0,96	karoten		
	vijoličen	≈0,12	antociani		