

УТИЦАЈ НЕДОСТАТКА СВЕТЛОСТИ НА РАЗГРАДЊУ ХЛОРОФИЛА КОД ВИШИХ БИЉАКА

Ђапић Нина

Технички факултет „Михајло Пупин“, Зрењанин

Abstract

DJAPIC, Nina: THE CHLOROPHYLL CATABOLISM IN DARK MAINTAINED HIGHER PLANTS' LEAVES [Technical Faculty “Mihajlo Pupin”, Djure Djakovica bb, Zrenjanin, Serbia].

The chlorophyll catabolism, in higher plants' leaves, is a complex biochemical process regulated by internal and external factors. The external factors, influencing the chlorophyll catabolism in higher plants' leaves, are: light insufficiency, nutrient supply, environmental stress such as drought, pathogen attack, etc. Green leaves placed in the darkness induced the chlorophyll catabolism which was visualized by the loss of the green leaf colour. The chlorophyll catabolism, in general, proceeds via: chlorophyllide, pheophorbide, linear tetrapyrrole, primary fluorescent chlorophyll catabolite, non – fluorescent chlorophyll catabolite and urobilinogenic chlorophyll catabolite. In green higher plants' leaves, in which the chlorophyll catabolism was initiated, the mentioned (*vide supra*) chlorophyll catabolites were followed. The final chlorophyll catabolites are still unknown. Chlorophyll catabolites that are formed after the urobilinogenic chlorophyll catabolite lack the chromophore that can absorb the ultra – violet (UV) light. Further investigations, on the final chlorophyll catabolic products, will include the derivatization of the lateral chlorophyll catabolites functional group(s) with the compounds that can absorb the UV light.

Key words: chlorophyll catabolism, darkness, higher plants, Hamamelidaceae

Сажетак

Разградња хлорофила, у лишћу виших биљака, је сложен биохемијски процес регулисан унутрашњим и спољним факторима. Спољни фактори, који утичу на разградњу хлорофила код виших биљака, могу бити: недостатак светлости, недостатак минерала, повреда, стрес изазван недостатком воде, патогена инфекција и друго. Зелено лишће, остављено у тами, иницира разградњу хлорофила, које се визуелно огледа у губитку зелене боје. Разградња хлорофила, уопштено, се одвија преко следећих деградационих производа: хлорофилида, феофорбида, линеарног тетрапирила, примарног флуоресцентног катаболита хлорофила, нефлуоресцентног катаболита хлорофила до уробилиногенског катаболита хлорофила. У лишћу виших биљака, код којих је иницирана разградња хлорофила, праћени су споменути деградациони производи. Крајњи производи разградње хлорофила још нису познати. Катаболити хлорофила, који се формирају након разградње уробилиногенског катаболита хлорофила, немају хромофору која може да апсорбује ултравиолетну (УВ) светлост. Даљи радови на разјашњењу коначних деградационих производа хлорофила укључити ће дериватизацију функционалних група, даљих деградационих производа хлорофила, са једињењима која поседују функционалне групе које могу да апсорбују УВ – светлост.

Кључне речи: разградња хлорофила, недостатак светлости, више биљке, Hamamelidaceae.

УВОД

Природни процес старења лишћа је сложен и високо регулисан ток биохемијских процеса који се одвија у лишћу са почетком јесени (Noodén и Leopold, 1988; Buchanan – Wollaston, 1997). Унутрашњи фактори који утичу на старење лишћа су старост биљке и биљни хормони: етилен и апсцисинска киселина. Спољашњи фактори који могу проузроковати старење лишћа су: температура,

недостатак светлости, суша, излагање лишћа етилену, примена апсцисинске киселине, недостатак хранљивих састојака итд.

На молекуларном нивоу, утврђено је да *Arabidopsis thaliana*, Brassicaceae, поседује ген (*sen1*) који се индукује са почетком старења лишћа у јесен и такође се индукује када се примене спољњи узрочници старења лишћа: апсцисинска киселина и недостатак светлости (Oh и сар., 1996). Код *Brassica napus*, Brassicaceae узрочник који контролише експресију гена LSC54 током старења лишћа може бити проузрокован и унутрашњим и спољњим факторима (рањавање листа или недостатак светлости) (Buchanan – Wollaston, 1997).

Са становишта секундарних метаболита, у јесењем лишћу биљака из фамилије Cercidiphyllaceae, Hamamelidaceae и Vitaceae стварају се катаболити хлорофила, који су изоловани из јесењег лишћа наведених биљака и одређена им је структура (Oberhuber и сар., 2003; Djapic и сар., 2008).

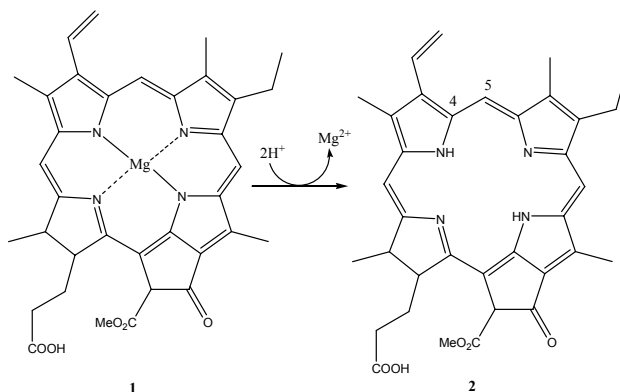
Рани радови на истраживању катаболита хлорофила могу се тражити у радовима Ивана Парфењевича Бородина (Иван Парфењевич Бородин), Михаила Семјеновича Цвета (Михаил Семёнович Цвет), Ричарда Вилштетера (Richard Willstaetter) и Артура Штола (Arthur Stoll) (Tswett, 1906 а; Tswett, 1906 б; Tswett, 1910; Stoll, 1912; Willstaetter и сар., 1912). Хронолошки развој истраживања катаболизма хлорофила може се почети од радова Ивана Парфењевича Бородина који је изоловао кристални хлорофил (Krasnovsky, 2003). Михаил Семјенович Цвет, стварањем хроматографије на колони, је доказао да се хлорофил састоји од два зелена пигмента „хлорофилина алфа и бета“ и да се пигмент који је изоловао Иван Парфењевич Бородин разликује од природног хлорофила (Tswett, 1906 а; Tswett, 1906 б; Tswett, 1910). Ричард Вилштетер и Артур Штол су указали да зелено лишће садржи ензим хлорофилазу који хидролизује фитил естар хлорофила стварајући хлорофилид (Stoll, 1912; Willstaetter и сар., 1912). Тако су Ричард Вилштетер и Артур Штол одредили структуру хлорофила *a* и *b* и доказали су да је кристални пигмент Ивана Парфењевича Бородина био хлорофилид *a* и *b* створен хидролизом хлорофила *a* и *b* ензимом хлорофилазе.

Истраживања су довела до закључка да постоји интерконверзија хлорофила *a* у хлорофил *b* и обрнуто у зеленом лишћу и свим фотосинтетским организмима (Willows, 2003). Интерконверзија почиње редукацијом хлорофила *b* ензимом хлорофил *b* редуктазом, ензимом који захтева присуство NADPH, и формира се 7^1 -хидроксил хлорофил *a* који је стабилан међупроизвод и изолован је из виших биљака. Следећи редукациони корак је катализован фередоксин зависним 7^1 -хидроксил хлорофил *a* редуктазом и формира се хлорофил *a*. Предложено је да хлорофил *a* интерконвертује у хлорофил *b* са кисеоник зависним ензимом хлорофил *a* оксигеназом. Ензим оксидује хлорофил *a* у 7^1 -хидроксил хлорофил *a* који се даље оксидује у хлорофил *b* помоћу 7^1 -хидроксил хлорофил *a* дехидрогеназе. Треба споменути да су сви претходни ензими изоловани и окарактерисани (Ruediger, 2002).

Интерконверзија хлорофила може се проширити, на следећи катаболички корак, на хлорофилид *a*. Хлорофил *a* се ензиматски хидролизује у хлорофилид *a*. Хлорофил *b* се ензиматски хидролизује у хлорофилид *b* који уз дејство ензима хлорофил *b* редуктазе формира 7^1 -хидроксил хлорофилид *a* који се ензимски редукује до хлорофилида *a* (Ruediger, 2002).

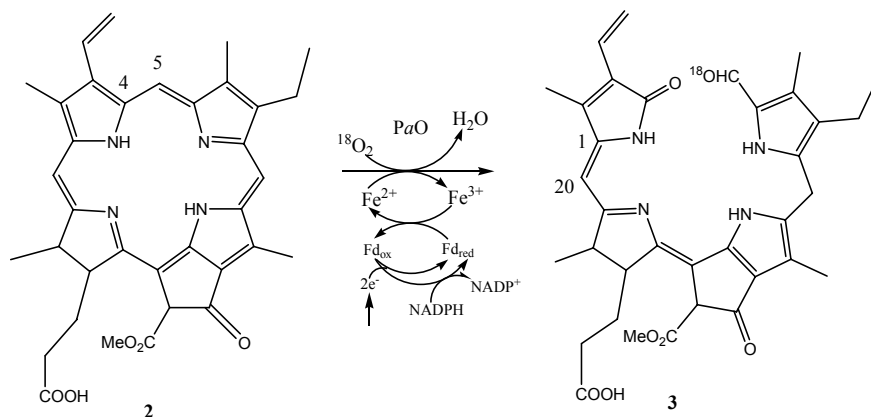
Даље, при катаболизму хлорофила долази до ослобађања магнезијума из хлорофилид *a* молекула (1) (Слика 1). Ензим који учествује у ослобађању магнезијума је магнезијум-дехелатаза. Каталитички кофактор који је потребан за овај каталитички корак је магнезијум-дехелатна супстанца (МДС) и повезана је са активношћу

магнезијум-дехелатазе (Shioi и сар., 1996). Када се магнезијум уклони из хлорофилида *a* (**1**) настаје феофорбиде *a* (**2**) (Слика 1).



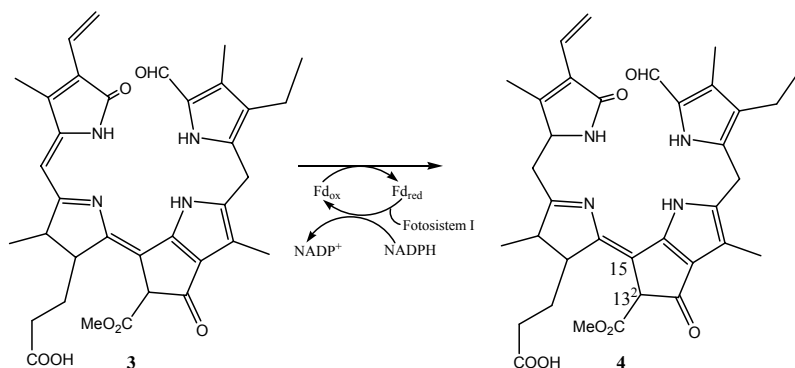
Слика 1. Конверзија хлорофилида *a* (**1**) у феофорбиде *a* (**2**) са ензимом магнезијум – дехелатазом

Даље, у катаболизму хлорофила, метенски мост феофорбиде *a* (**2**) на позицији С-4 – С-5, бива оксидован ензимом феофорбид *a* оксигеназом и формира се катаболит хлорофила (**3**). Феофорбид *a* оксигеназа је монооксигеназа зависна од гвожђа. Електрони потребни за редокс реакцију се достављају из редукованог фередоксина (Слика 2) (Hoertensteiner, 1998).



Слика 2. Оксидација феофорбида *a* (**2**) ензимом феофорбид *a* оксигеназа до катаболита хлорофила (**3**)

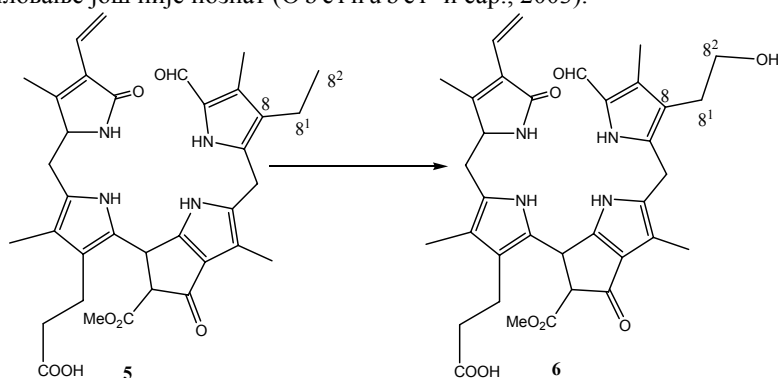
У катаболизму хлорофила, даље, долази до редукције катаболита хлорофила (**3**) на позицији С-20 – С-1 редуктазом која зависи од фередоксина и није показала потребу за кофакторима као што су флавин или метали. Електрони се директно преносе на активни центар ензима. Након овог редукционог корака два епитмера се формирају (Hoertensteiner, 2006). Редукцијом двоструке везе на позицији С-20 – С-1 ствара се примарни флуоресцентни катаболит хлорофила (**4**) (Hoertensteiner, 1998) (Слика 3).



Слика 3. Катаболит хлорофила (3) након везивања за феофорбид *a* оксигеназу и фередоксин ствара стереоселективну редукцију и формира се примарни флуоресцентни катаболит хлорофила (4)

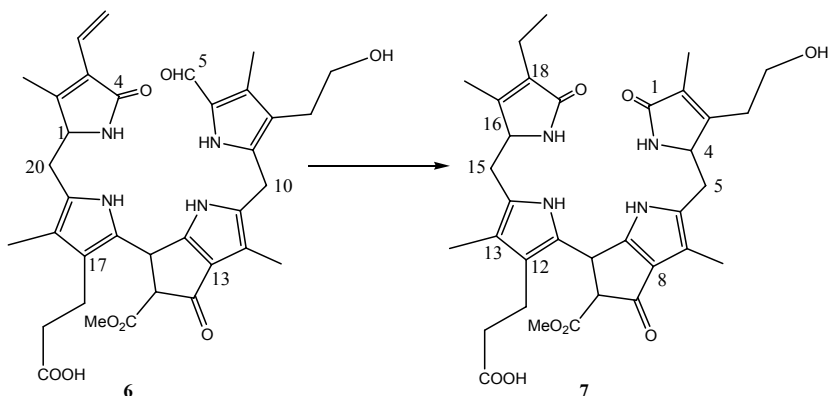
Таутомеризација примарног флуоресцентног катаболита хлорофила (4), која се одвија неензиматски, одиграва се у два корака (Oberhuber и сар., 2003). π – коњугација преко двоструких веза у молекулу се губи, молекул постаје нефлуоресцентан и назван је нефлуоресцентни катаболит хлорофила (5).

Хидроксилација бочне етил групе се одвија у различитим ступњевима катаболизма хлорофила. Највероватније је да се догађа после формирања примарног флуоресцентног катаболита хлорофила (4). Катаболити хлорофила који су изоловани из *Cercidiphyllum japonicum*, Cercidiphyllaceae јесењег лишћа су са нехидроксилованом (5) и хидроксилованом C-8² латералном групом (6) (Слика 4). Ензим који катализује хидроксиловање још није познат (Oberhuber и сар., 2003).



Слика 4. Хидроксиловање нефлуоресцентног катаболита хлорофила (5) у положају C-8²

Безбојни уробилиногенски катаболит хлорофила (7) изолован из јесењег лишћа *Parrotia persica*, Hamamelidaceae и *Hamamelis virginiana*, Hamamelidaceae се разликује од, до сада, изолованих катаболита хлорофила (6) и то у једној функционалној групи (Ђапић и сар., 2008; Ђапић и сар., 2009). Алдехидна група на позицији C-5 је одсутна и структура катаболита хлорофила упућује на структуру уробилиногена (Слика 5). Један од ензимских механизма који може да објасни оксидацију алдехидне групе C-5 је помоћу ензима Бајер-Вилигер-азе (Baeyer-Villiger-ase).

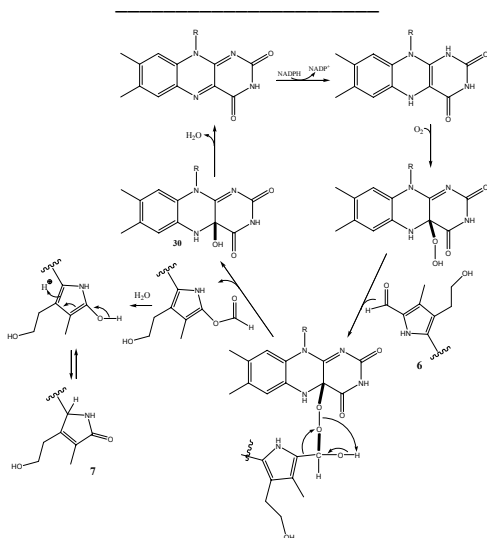


Слика 5. Оксидација нефлуоресцентног катаболита хлорофила (6) до уробилиногенског катаболита хлорофила (7)

Може се предложити ензимска оксидација Бајер-Вилигер-азом нефлуоресцентног катаболита хлорофила (6) до уробилиногенског катаболита хлорофила (7). Претпоставка би била да ензим преводи алдехидну групу нефлуоресцентних катаболита хлорофила (6) у одговарајућу дехидро пиролдин-2-он групу уробилиногенског катаболита хлорофила (7) посредством хидроксипероксидног међупроизвода (Слика 6).

Acinetobacter sp. је организам где је први пут примећена оксидација ензимом Бајер-Вилигер-аза. У том организму је примећена оксидација циклохексанона у ϵ -капролактон у присуству флавин коензима (D o n o g h u e и сар., 1976).

Пет Бајер-Вилигер-аза је изоловано, али кристална структура још није објављена. Следећи механизам се може предложити за биотрансформацију нефлуоресцентних катаболита хлорофила (6) у уробилиногенски катаболит хлорофила (7), који је формиран на основу литературних примера (Слика 6) (D o n o g h u e и сар., 1976; K e l l y, 1996). Нуклеофилна адиција хидропероксида на електрон дефицитарни С-5 оксо групе ствара пероксидни међупроизвод. После Бајер-Вилигер-овог преграђивања кисеоников атом је уграђен између карбонилне групе С-5, у молекулу нефлуоресцентних катаболита хлорофила, и формира се естар. После хидролизе естра формира се алкохол који после таутомеризације ствара уробилиногенски катаболит хлорофила (7) (Слика 6).



Слика 6. Предлог ензимске оксидације нефлуоресцентних катаболита хлорофила (6) Бајер-Вилигер-овом оксидацијом до уробилиногенског катаболита хлорофила (7)

Даљи производи разградње уробилиногенског катаболита хлорофила (7) још нису познати, јер молекул губи хромофору која може да апсорбује ултравиолетну (УВ) светлост. Циљ рада је био да се сазна да ли зелено лишће остављено у недостатку светлости разграђује хлорофил на исти начин као и јесење лишће? Истраживања су урађена и прикупљени су резултати који су омогућили доношење закључка о начину разградње хлорофила: код лишћа на које је примењен спољни фактор (недостатак светлости) и јесењег лишћа.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Parrotia persica, Hamamelidaceae, гране са зеленим лишћем су одсечене са грма биљке, који се налази код Дунавског парка у Новом Саду, током априла месеца 2010. године, стављене у чаше и Ерленмајере са дестилованом водом и остављене у мраку током месец дана (Слика 7). Након месец дана 10 g сувог лишћа (15,2 g свежег лишћа) је екстраховано са 100 ml метанола хомогенизацијом у блендеру на собној температури током 10 минута. Метанолски екстракт је профилиран. Аполарне супстанце присутне у метанолском екстракту уклоњене су n-хексаном екстракцијом у левку за одвајање. Метанолски екстракт у коме су преостале средње поларне и поларне супстанце упарен је до сува дестилацијом под сниженим притиском на температури нижој од 40°C и добијено је 18 mg средње поларних и поларних супстанци. Добијени суви екстракт је растворен у 1,5 ml раствора метанол: вода (2:1) и смеша је анализирана течном хроматографијом/масеном спектрометријом. Елуент коришћен при течној хроматографији била је вода (у коју је додато 0,1% трифлуоро сирћетне киселине као модификатор) и метанол. Примењен програм коришћен при анализи катаболита хлорофила путем течне хроматографије био је линеарно повећање метанола од 10% до 100% током 70 минута и још 20 минута са 100% метанола. Проток је био 0,2 ml/мин. Убризгана запремина узорка била је 10 µl путем аутоматског убризгавања. После сваког раздвајања колона је рееквилибрирана линеарно од 100% метанола до 90% воде (0,1% трифлуоро сирћетне киселине): 10% метанола током 10 минута и додатних 5 минута са 90% воде (0,1% трифлуоро сирћетне киселине): 10%

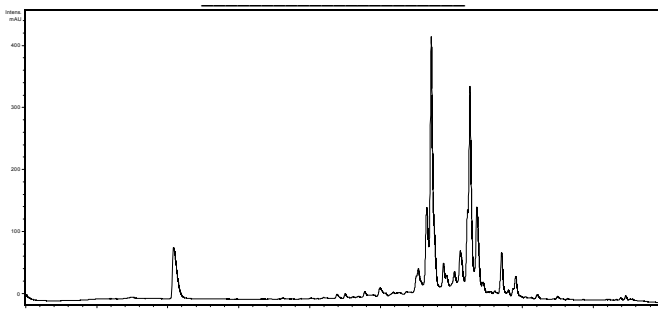
метанола. Раздвајање течном хроматографијом одвијало се на RP EC 250x4 mm Nucleosil 100-5 C₈ колони заједно са предколоном RP CC 8x4 mm Nucleosil 100-5 C₈. Температура на којој се изводило раздвајање је била 22°C. Подаци су сакупљени путем програма HyStar™ и Брукер Далтоникс анализом података употребљавајући програм Windows NT™. Течна хроматографија/електроспреј јонизациона масена спектрометрија урађена је на Waters 2695 инструменту повезана са Waters 2996 PDA UV-Vis детектором и прикључена на Bruker Daltonics esquire HCT опремљеним са електоспреј јонизационим извором.



Слика 7. *Parrotia persica*, Hamamelidaceae, гране: са зеленим лишћем (лево) и након месец дана проведеног у мраку (десно)

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Експерименти који су урађени дали су увид у катаболизам хлорофила лишћа *Parrotia persica*, Hamamelidaceae, остављеног током месец дана, у недостатку светлости. Хроматограм добијен анализом екстракта *Parrotia persica*, Hamamelidaceae лишћа, које је провело месец дана без присуства светлости, приказан је на слици 8. Хроматограм је екстрахован на таласној дужини од 244 nm. Ретенционо време уробилиногенског катаболита хлорофила изолованог из јесењег лишћа *Parrotia persica*, Hamamelidaceae познато је од раније и износи 57,3 минута (Djarić и сар., 2008). Мала одступања која се јављају код ретенционог времена катаболита хлорофила последица су еквилибрирања колоне на којој се обављало раздвајање. Изводом из јонског хроматограма добијене су молекулске масе катаболита хлорофила. На ретенционом времену од 56,7; 57,3 и 59,0 је m/z 633 за $[M+H]^+$ што значи да су била присутна три уробилиногенска катаболита хлорофила (7). Најзаступљенији је изомер који је изолован из јесењег лишћа *Parrotia persica*, Hamamelidaceae и чија је структура у потпуности одређена (Djarić и сар., 2008). На ретенционом времену од 62,7 минута, је m/z 645, се налазио нефлуоресцентни катаболит хлорофила изолован из јесењег лишћа *Cercidiphyllum japonicum*, Cercidiphyllaceae (Oberhuber и сар., 2003). Његов нередуковани облик (двострука веза у положају C-20 – C-1) се налазио на ретенционом времену 67,2 минута са молекулском масом од m/z 643. Нехидроксиловани нефлуоресцентни катаболит хлорофила (5) који је такође изолован из јесењег лишћа *Cercidiphyllum japonicum*, Cercidiphyllaceae се налазио на ретенционом времену 69,2 минута са својом молекулском масом од m/z 629 (Oberhuber и сар., 2003). Након овог катаболита хлорофила елуирао је, на ретенционом времену 72,1 минут, његов нередуковани облик (који садржи двоструку везу у положају C-20 – C-1) и имао је молекулску масу од m/z 627.



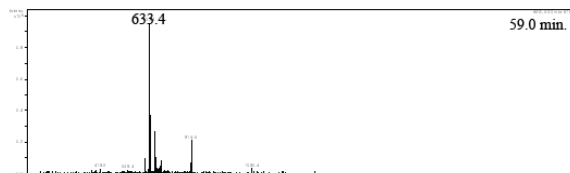
Слика 8. Хроматограм екстракта *Parrotia persica*, Hamamelidaceae лишћа које је провело месец дана у недостатку светлости. УВ детекција $\lambda = 244 \text{ nm}$



Слика 9. Молекулски јон изомера (7) на 56,7 мин



Слика 10. Молекулски јон изомера (7) на 57,3 мин



Слика 11. Молекулски јон изомера (7) на 59,0 мин

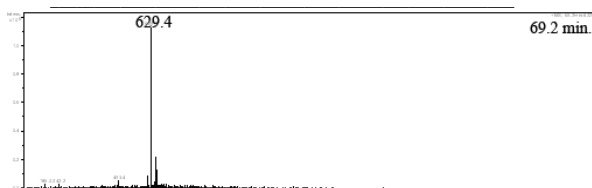


Слика 12. Молекулски јон катаболита (6) на 62,7 мин

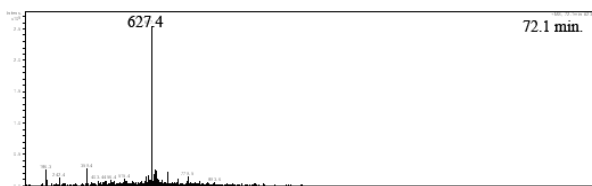


Слика 13. Молекулски јон нередукованог катаболита (6) на 67,2 мин

Утицај недостатка светлости на разградњу хлорофила код виших биљака

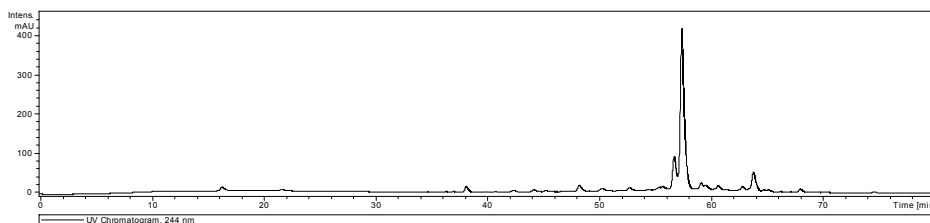


Слика 14. Молекулски јон катаболита (5) на 69,2 мин



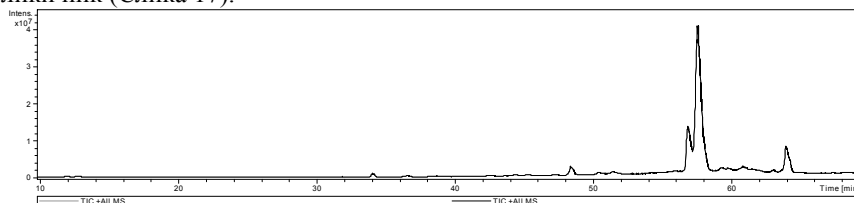
Слика 15. Молекулски јон нередукованог катаболита (5) на 72,1 мин

Под истим хроматографским условима раздвајања снимљен је и хроматограм екстракта јесењег лишћа *Parrotia persica*, Hamamelidaceae (Слика 16). У хроматограму су констатована три пика, један који је доминирао и два мала пика на ретенционим временима од 57,5; 56,8 и 63,8 минута.



Слика 16. Хроматограм екстракта *Parrotia persica*, Hamamelidaceae јесењег лишћа.
УВ детекција $\lambda = 244$ nm.

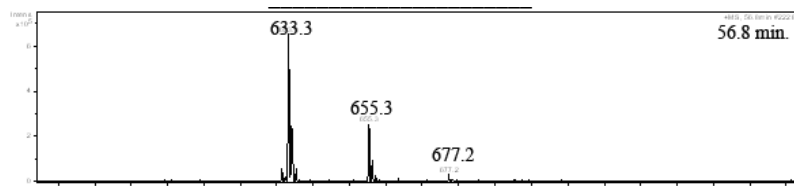
У целокупном јонском хроматограму била су присутна два мала пика и један велики пик (Слика 17).



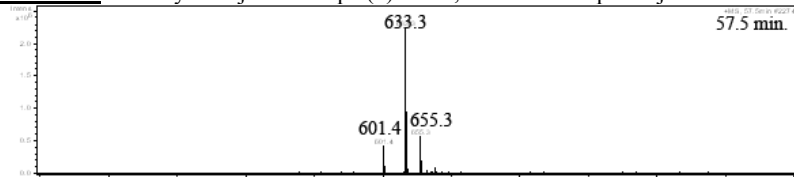
Слика 17. Целокупан јонски хроматограм екстракта јесењег лишћа
Parrotia persica, Hamamelidaceae

Електроспреј јонизациони масени спектар добијен имао је пикове на ретенционим временима 56,8 и 57,5 минута са m/z 655 $[M+Na]^+$ и m/z 633 $[M+H]^+$ (Слика 18 и 19).

У екстракту јесењег лишћа била су присутна два изомера уробилиногенског катаболита хлорофила (7).

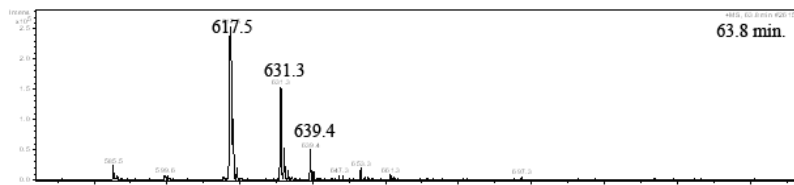


Слика 18. Молекулски јон изомера (7) на 56,8 мин из екстракта јесењег лишћа



Слика 19. Молекулски јон изомера (7) на 57,5 мин из екстракта јесењег лишћа

Пик који се појавио на 63,8 минута имао је молекулски јон m/z 631 $[M+H]^+$ (Слика 20). Ово непознато једињење које се срело у екстракту јесењег лишћа *Parrotia persica* на ретенционом времену од 63,8 минута показало је и друге јоне поред молекулског: m/z 617 и m/z 639. Ови јони, највероватније, припадају облицима молекула који се формирају деметиловањем метокси групе (m/z 617). Слободна, депротонувана, карбоксилна група настала након деметиловања, највероватније, се везује са натријумом и формира јон (m/z 639) нередукваног облика уробилиногенског катаболита хлорофила (нередукована двострука веза у положају C-20 – C-1).



Слика 20. Молекулски јон непознатог катаболита на 63,8 мин из екстракта јесењег лишћа

Катаболити хлорофила присутни у јесењем лишћу су, највероватније, резултат организма да ослободи и смањи ниво фотодинамички активног хлорофила пре програмиране хелијске смрти. Аутономна индукција старења лишћа дешава се у јесен. Одговарајуће спољашње деловање је потребно за индуковање катаболизма хлорофила код зеленог лишћа. Зелено лишће *Parrotia persica*, Hamamelidaceae остављено у мраку индукује разградњу хлорофила. Код зеленог лишћа *Parrotia persica*, Hamamelidaceae долази до разградње хлорофила након месец дана проведеног у недостатку светлости. Досадашња истраживања обухватала су праћење производа разградње хлорофила или код јесењег лишћа или код лишћа, котиледона и плодова воћа где је била индукована разградња хлорофила. Упоредно праћење природне и индуковане разградње хлорофила остаје да се истражи. До сада, нису анализирани производи разградње хлорофила код интактне биљке *Parrotia persica*, Hamamelidaceae остављене у мраку. Друго истраживање које још није урађено је пренос интактне биљке *Parrotia persica*, Hamamelidaceae крајем лета или почетком јесени са северне полулопте на јужну полулопту где је почетак пролећа. Да ли би биљка у том случају индуковала разградњу хлорофила или до разградње хлорофила не би дошло остаје да се истражи.

Вероватно највећа последица вештачки узрокованог старења лишћа је катаболизам хлорофила. Анализом катаболита хлорофила код јесењег лишћа пронађени су катаболити хлорофила који се вероватно могу назвати најстабилнијим једињењима у процесу катаболизма хлорофила. Код вештачки индуковане разградње

хлорофила срили су се најстабилнији катаболити хлорофила и међупроизводи катаболизма хлорофила који нису примећени у јесењем лишћу. Вештачки узроковано старење лишћа је тиме указало да је такав биљни материјал изузетно важан у сагледавању потпуне целине катаболизма хлорофила и да се катаболизам хлорофила одиграва по истом механизму. И јесење лишће и зелено лишће остављено у мраку код *Parrotia persica*, Hamamelidaceae има исти механизам разградње хлорофила. *Parrotia persica*, Hamamelidaceae зелено лишће не развија други механизам и ензимски систем за разградњу хлорофила.

ЗАКЉУЧАК

Са досадашњим степеном сазнања о катаболизму хлорофила, код јесењег лишћа и вештачки индуковане разградње хлорофила код зеленог лишћа биљке *Parrotia persica*, Hamamelidaceae, може се извести закључак да разградња хлорофила тече од хлорофила *a* који након ензиматске хидролизе фитилног бочног ланца формира хлорофилд *a* који дехелатизацијом отпушта магнезијом и формира цикличног прстена и формира се катаболит хлорофила који ензимском редукцијом формира примарни флуоресцентни катаболит хлорофила. Неензимски катализована таутомеризација доводи до губитка π – коњугације преко двоструких веза у молекулу и молекул постаје нефлуоресцентан и по томе је назван нефлуоресцентни катаболит хлорофила. Даљом ензимском оксидацијом, која је још увек на нивоу хипотезе, ствара се уробилиногенски катаболит хлорофила. Овај катаболизам хлорофила се одвија и код јесењег и код зеленог лишћа биљке *Parrotia persica*, Hamamelidaceae код кога је иницирана разградња хлорофила услед недостатка светлости. Крајњи производи разградње хлорофила још нису познати. Најинтересантније што остаје да се истражи је, шта се дешава са четири атома азота приситна у молекулу?

Катаболити хлорофила, који се формирају након разградње уробилиногенског катаболита хлорофила, немају хромофору која може да апсорбује ултравиолетну (УВ) светлост и тако постају невидљиви.

Даљи радови на разјашњењу коначних деградационих производа хлорофила укључити ће дериватизацију функционалних група присутних у катаболитима хлорофила са једињењима која поседују функционалне групе које могу да апсорбују УВ – светлост и тиме највероватније разјаснити која једињења биљка складишти у јесен и која једињења одлазе у земљиште са опалим лишћем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Buchanan – Wollaston, V. (1997): The molecular biology of leaf senescence, *J. Exp. Bot.* 48 (307): 181-199.
2. Djapic, N., M. Pavlovic (2008): Chlorophyll catabolite from *Parrotia persica* autumnal leaves, *Revista de Chimie*, 58 (8): 878-882, Bucuresti.
3. Djapic, N., M. Pavlovic, S. Arsovski, G. Grujic (2009): Chlorophyll biodegradation product from *Hamamelis virginiana* autumnal leaves, *Revista de Chimie*, 60 (4):398-402, Bucuresti.
4. Donoghue, N. A., D. B. Norris, P. W. Trudgill (1976): The purification and properties of cyclohexanone oxygenase from *Nocardia globerula* CL1 and *Acinetobacter* NCIB 9871, *Eur. J. Biochem.*, 63: 175-192.
5. Hoertensteiner, S., K. L. Wuethrich, P. Matile, K. – H. Ongania, B. Kraeutler (1998): The key step in chlorophyll breakdown in higher plants: Cleavage of Pheophorbide *a* macrocycle by a monooxygenase, *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 15335-15339.

6. Hoertensteiner, S. (2006): Chlorophyll degradation during senescence, *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 57: 55-77.
7. Kelly, D. R. (1996): A proposal for the origin of stereoselectivity in enzyme catalysed Baeyer – Villiger reactions, *Tetrahedron: Asymmetry*, 7: 1149-1152.
8. Noodén, L. D., A. C. Leopold (1988): **Senescence and aging in plants**, p. 526, Academic Press Inc., New York, San Diego.
9. Oberhuber, M., J. Berghold, K. Breuker, S. Hoertensteiner, B. Kraeutler (2003): Breakdown of chlorophyll: A nonenzymatic reaction accounts for the formation of the colorless “nonfluorescent“ chlorophyll catabolites, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 6910-6915.
10. Oh, S. A., S.Y. Lee, L. K. Chung, C. – H. Lee, H. G. Nam (1996): A senescence – associated gene of *Arabidopsis thaliana* is distinctively regulated during natural and artificially induced leaf senescence, *Plant Mol. Biol.*, 30: 739-754.
11. Krasnovsky, Jr., A. A. (2003): Chlorophyll isolation, structure and function: major landmarks of the early history of research in the Russian Empire and the Soviet Union, *Photosynthesis Research*, 76: 389-403.
12. Shioi, Y., K. Watanabe, K. Takamiya (1996): Enzymatic conversion of Pheophorbide *a* to the precursor of Pyropheophorbide *a* in leaves of *Chenopodium album*, *Plant and Cell Physiol.*, 37: 1143-1149.
13. Stoll, A. (1912): **Ueber Chlorophyllase und die Chlorophyllide**, Dissertation, Eidg. Technische Hochschule, Zuerich.
14. Tswett, M., S. (1906 a): Physikalisch – chemische Studien ueber das Chlorophyll. Die Adsorptionen, *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, 24: 316-323, 1906.
15. Tswett, M., S. (1906 b): Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls, *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, 24: 384-393.
16. Tswett, M., S. (1910): **Chromophylls in Plant and Animal Worlds**, Warsaw University, Warsaw.
17. Willows, R. D. (2003): Biosynthesis of chlorophylls from protoporphyrin IX, *Nat. Prod. Rep.*, 20: 327-341.
18. Willstaetter, R., A. Stoll (1912): Untersuchungen ueer Chlorophyll. XIX. Ueber die Chlorophyllide, *Liebigs Ann. Chem.*, 387: 317-386.

Примљено: 02. 12. 2010.

Одобрено: 21. 07. 2011.