

FLUORESCENCE CHLOROFYLU, CHEMISMUS A OBSAH FOTOSYNTETICKY AKTIVNÍCH PIGMENTŮ U LISTŮ BUKŮ VÁPŇNÝCH DO JAMKY

CHLOROPHYLL FLUORESCENCE, CHEMISTRY AND CONTENTS OF PHOTOSYNTHETIC ACTIVE PIGMENTS IN SPOT-LIMED BEECH LEAVES

ONDŘEJ ŠPULÁK¹⁾ - JAN VÍTÁMVÁS²⁾ - DUŠAN KACÁLEK¹⁾ - IVAN KUNEŠ²⁾

¹⁾ Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., VS Opočno

²⁾ Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta lesnická a dřevařská, Praha

ABSTRACT

Liming is considered a measure to support vigor of tree species in the air-polluted areas. The objective of our study is to find out if spot liming at the time of planting can influence photosynthesis and leaf chemistry 17 years after application. An experiment with artificially planted European beech was established in 1993. Samples of beech leaves were collected three times in May, June and July 2009. Analyzes used were as follows: 1) Chlorophyll *a* fluorescence using Imaging PAM, 2) contents of chlorophyll and carotenoids being extracted from assimilatory tissues using a spectrophotometer and 3) contents of nutrients (N, P, K, Ca, Mg, S and Si) in leaves. Data were processed using T-test or one-way ANOVA followed by Tukey test. Spot-limed treatment shows difference only in mature leaves being collected in July. There was a significantly higher maximum quantum yield ($F_v/F_m = 0.867$) in limed leaves compared to control treatment ($F_v/F_m = 0.860$). Contents of chlorophylls ($Chl_{a+b} 2,369 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and carotenoids ($Car_{x+c} 590 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) were also significantly higher in raw matter of the limed beeches compared to control treatment ($Chl_{a+b} 2,268 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; $Car_{x+c} 552 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Among the elements analyzed in the leaves, the only difference was found in content of phosphorus between the limed (0.15%) and control (0.13%) treatments.

Klíčová slova: buk lesní, hnojení, dolomitický vápenec, fotosynteticky aktivní pigmenty, fluorescence chlorofylu

Key words: European beech, fertilization, dolomitic limestone, photosynthetically active pigments, chlorophyll fluorescence

ÚVOD

V sedmdesátých a osmdesátých letech 20. století došlo v České republice k výraznému poškozování lesních porostů imisemi. Poškozeny byly především horské oblasti na severu Čech (BALCAR et al. 1994). Imise způsobily velkoplošný rozpad lesních porostů, opadem kontaminovaných rostlinných orgánů i přímým spadem látek znečišťujících ovzduší dlouhodobě ovlivnily také chemismus půdy (MATERNA, LOCHMAN 1988).

Po odsíření většiny zdrojů poklesly okamžité koncentrace škodlivin v ovzduší (KOPÁČEK, VESELÝ 2005), nadále však přetrvává narušený chemismus půd. Jedním z opatření směřujících k podpoře vitality lesních dřevin zvláště v klimaticky extrémních podmínkách s imisemi ovlivněným chemismem půd je přihnojování prostřednictvím horninových mouček, jako je dolomitický vápenec (NEBE et al. 1997; SCHAAB, HÜTTL 2006).

Efekt přidání vápence se projevuje snížením kyselosti půdy, zlepšením stavu půdního sorpčního komplexu, omezením aktivity toxických iontů v půdě, doplněním zásob půdního vápníku a hořčíku a zrychlením humifikace (PODRÁZSKÝ 1991, 1992). Celkově tak dochází ke zlepšení podmínek pro výživu rostlin. Správně volená aplikace podporuje přežívání, zdravotní stav a růst výsadbe (BALCAR 1998; PODRÁZSKÝ et

al. 2003; KUNEŠ et al. 2007, 2009). Změna ve výživě pak může přinášet svou odezvu nejen v rozdílné distribuci a ukládání živin v rámci rostliny, ale také ve struktuře a funkčnosti fotosynteticky aktivních pigmentů asimilačního aparátu.

Fotosynteticky aktivní pigmenty - ve vyšších rostlinách se jedná převážně o chlorofyly - jsou základními fotoreceptory účastnicími se fotosyntézy. Po přijetí kvanta světelné energie molekulou chlorofylu je energie buď absorbována a převedena do procesu fotosyntézy (fotochemické zhášení), nebo dochází k převedení energie na teplo (nefotochemické zhášení) či zpětnému vyzáření fotonu s vlnovou délkou vyšší než 650 nm (fluorescenční zhášení - cca 1 - 2 % celkového absorbovaného záření) (MAXWELL, JOHNSON 2000). Fluorescence chlorofylu, jak se posledního jmenovanému jevu říká, je v těsném vztahu s průběhem fotosyntézy (HARBINSON, ROSENQUIST 2003). O celkové fotosyntetické kapacitě pak vypovídá i samotný obsah chlorofylu ve fotosynteticky aktivních pletivech.

Cílem studie je a) stanovit základní charakteristiky fluorescence chlorofylu, obsahy fotosynteticky aktivních pigmentů a makroelementů u listů buku 17 let po výsadbě ve variantách vápnění do jamky a kontrola a b) ověřit, zda je i u takto starých výsadbe pomocí uvedených metod možné detekovat vliv intenzivního přihnojení.

METODIKA

Hodnocené výsadby buku lesního (*Fagus sylvatica* L.) jsou lokalizovány na výzkumné ploše Jizerka na Středním jizerském hřebeni v Jizerských horách. Výzkumná plocha byla založena na rozsáhlé imisní holině (bliže viz např. BALCAR, PODRÁZSKÝ 1994; BALCAR, KACÁLEK 2008).

Experimentální kultura byla založena v roce 1993. Buky byly vysazeny v pravidelném sponu 1 x 2 m ve variantách 1) přihnojení promísením 1 kg jemně mletého dolomitického vápence do jamky při výsadbě, 2) kontrola; obě varianty ve 2 opakováních po 50 jedincích. V roce 2002 byly na parcelách provedeny odběry svrchních 20 cm půdy v prostoru jamek pro analýzy. I devět let po aplikaci byla na vápněné variantě potvrzena násobně vyšší koncentrace vápníku (2 167 mg/100 g CaO oproti 51 mg/100 g na kontrole).

V roce 2009 byly provedeny odběry asimilačního aparátu 10 konkrétních jedinců buku z každé parcely. Vzorky byly odebírány z osluněné části koruny s prakticky měsíční frekvencí polovinou května počínaje. Pro analýzu fluorescence chlorofylu byly zpracovány vzorky z 14. 5., 18. 6. a 15. 7. 2009, obsah chlorofylu a karotenoidů byl hodnocen u vzorků z 14. 5. a 15. 7. 2009.

Analýza fluorescence chlorofylu

Fluorescence chlorofylu byla měřena přístrojem Imaging-PAM (IKEA0150A, Heinz Walz GmbH, obslužný software ImagingWin V2.32) následující den po odběru vzorků. Vzorky byly pro snížení vysychání přes noc uchovávány v lednici v igelitových obalech. Před měřením byly vzorky minimálně 1 hodinu adaptovány na pokojovou teplotu (21 – 23 °C). Pro analýzu byla vybrána střední část (bez hlavní žilky) náhodně zvoleného listu z každého jedince; celkem 6 vzorků listu fixovaných na černou podkladovou destičku bylo zpracovávalo společně v rámci jednoho měření. Každý jedinec byl v jednotlivém termínu měření zastoupen třemi listy (tzn. tři opakování).

Dále byly destičky se vzorky uzavřeny v plastových krabičkách se zvýšenou vlhkostí vzduchu a po minimálně 30 minut adaptovány na tmu při pokojové teplotě. Temnotní adaptace po dobu minimálně 20 minut u zelených listů zaručuje převedení fotosyntetického aparátu do klidového stadia, ve kterém jsou otevřena všechna reakční centra fotosystému II (LICHTENTHALER et al. 2005). V tomto stavu je možné zaznamenat parametry nezbytné pro správné kvantifikování procesů fotochemické i nefotochemické povahy, které se uplatňují během primární fáze fotosyntézy (ROHÁČEK 2005).

Měření přístrojem Imaging-PAM se odehrávalo v zatemnělé místnosti. Hned po nažhavení osvitového kruhu byl změřen parametr minimální (F_0) a maximální fluorescence (F_m) a obslužným softwarem dopočítán parametr F_v/F_m , kde

$$F_v = F_m - F_0$$

Tento parametr je označován jako maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II pletiva adaptovaného na tmu (MAXWELL, JOHNSON 2000). Byla nastavena intenzita měřícího světla 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, frekvence pulzů 1 Hz. Dále byla saturačním pulzem 800 ms a intenzitou fotosynteticky aktivního záření (PAR) 2400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ změřena absorptivita, vypočítaná obslužným programem podle vztahu

$$Abs. = 1 - R/NIR.$$

Následovalo měření parametrů zkrácené světelné kinetiky (light response curves) při zvyšující se intenzitě aktinického záření (až 1 414 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR), ve 22 krocích o intervalu 10 sekund. Ze získaných parametrů byl pro účely této studie analyzován průběh parametrů nefotochemického zhášení (NPQ)

$$NPQ = \frac{(F_m - F_m')}{F_m'}$$

kde F_m' značí maximální výtěžek fluorescence listů adaptovaných na světlo a rychlost transportu elektronů – ETR, vypočítané podle vztahu

$ETR = Y(II) \times PAR \times 0.5 \times Abs$, kde $Y(II)$ značí efektivní kvantový výtěžek PS II, vypočítaný jako

$$Y(II) = \frac{(F_m' - F)}{F_m'}. \text{ Blíže viz např. WALZ (2004).}$$

Extrakce a měření množství chlorofylů a karotenoidů ve vzorku

Míra fotosyntetické aktivity je podmíněna množstvím fotosynteticky aktivních pigmentů. Jednou z metod jejich kvantifikace je spektrofotometrické měření absorbance vlnových délek ve směsi pigmentů vyextrahovaných z asimilačních orgánů. Metoda je použitelná pro směsi pigmentů, které se spektrálně výrazně liší, tzn. nelze určit obsahy jednotlivých složek ve směsi chlorofylů nebo obsahy jednotlivých karotenoidů v jejich směsi (LICHTENTHALER 1987). Tuto metodu lze tedy použít jen pro stanovení celkového obsahu chlorofylu a (Chl_a), chlorofylu b (Chl_b) a karotenoidů (Car_{x+c}).

Analýza fotosynteticky aktivních pigmentů probíhala v laboratorních Fakultě lesnické a dřevařské. Vzorky byly uchovávány v hlubokomrazicím boxu při -80 °C a postupně analyzovány. Extrakce byla prováděna při tlumeném světle pro potlačení fotodestrukce pigmentů. Z každého jedince byly pro extrakci odebrány a naváženy vzorky listů v množství 0,6 – 1,2 g čerstvé hmoty. Listů bylo homogenizováno v třech miskách za pomoci kapalného dusíku až na jemný prášek, který byl rozdělen na tři části o obdobné hmotnosti (od 0,15 do 0,25 g) pro zajištění 3 opakování. Jednotlivé vzorky byly přeneseny do plastových centrifugačních tub o objemu 15 ml. Vzorky byly poté zpracovány podle modifikované metodiky KURASOVÉ et al. (2002) a MAKEENA et al. (2007). Každý připravený vzorek byl zalit 80% acetonem do celkového objemu 15 ml, protřepán na laboratorní třepače 20 minut a uložen přes noc do lednice (4 – 5 °C). Následující den byl vzorek opět protřepán 20 minut na laboratorní třepače a vložen do centrifugy, kde byl centrifugován po dobu 4 minut při 4 000 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$. Po centrifugaci byl extrakt přepipetován do odměrné 50ml baňky, která byla uskladněna až do měření absorbance v lednici při 4 – 5 °C. Celý postup promytí vzorku 80% acetonem, protřepání, centrifugace a přepipetování byl opakován ještě 2x. Po třetím promytí acetonem byla homogenizovaná listová pletiva prosta pigmentů.

Získaný extrakt pigmentů v odměrné baňce byl doplněn do 50 ml 80% acetonem a následně proměřen na spektrofotometru Unicam Helios ϵ při nastavených vlnových délkách 470 nm, 647 nm, 663 nm a 750 nm. Každý vzorek byl proměřen 3x a pro výpočet obsahu pigmentů byl použit průměr z naměřených hodnot.

Rovnice pro výpočet obsahu pigmentů (LICHTENTHALER 1987) byly upraveny podle MAKEENA et al. (2007) o odečet absorbance při 750 nm, kde již chlorofyly ani karotenoidy neabsorbují a hodnota absorbance je způsobena rozptylem nečistot v extraktu:

$$Chl_a = 12,25 \cdot (A_{663} - A_{750}) - 2,79 \cdot (A_{647} - A_{750})$$

$$Chl_b = 21,50 \cdot (A_{647} - A_{750}) - 5,10 \cdot (A_{663} - A_{750})$$

$$Chl_{a+b} = 7,15 \cdot (A_{663} - A_{750}) + 18,71 \cdot (A_{647} - A_{750})$$

$$Car_{x+c} = \frac{1000 \cdot (A_{470} - A_{750}) - 1,82 \cdot Chl_a - 85,02 \cdot Chl_b}{198}$$

Výsledek je udáván v μg na 1 mililitr extraktu. Poté byly přepočteny výsledky na celé množství extraktu a následně uvedeny jako množství pigmentů v $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvé hmoty.

Chemická analýza

Vzorky listů z jednotlivých vzorníků odebrané dne 17. 6. 2009 byly předány na chemickou analýzu za účelem zjištění obsahu základních živin (N, P, K, Ca a Mg), síry a křemíku. Analýza byla provedena metodami uvedenými ZBÍRALEM (1994). Obsah živin byl kvalitativně hodnocen na základě předběžných rozpětí pro buk, které publikovali KOPINGA a BURG (1995).

Statistické zpracování

Po ověření výběrových předpokladů a vypuštění případných odlehých hodnot byla data podle charakteru statisticky porovnáována s využitím Studentova t-testu nebo jednofaktorové analýzy variance (ANOVA) s následným Tukey testem, vždy na hladině významnosti 0,05. Pro zpracování byly využity statistické programy Unistat verze 5.601 a Instat+ verze 3.036.

VÝSLEDKY

1. Fluorescence chlorofylu

Z hodnot základních parametrů popisujících temnotní fázi fluorescence chlorofylu lze pozorovat pokles minimální fluorescence F_0 , nárůst maximální fluorescence F_m a maximálního kvantového výtěžku fotosystému II (F_v/F_m) mezi termíny (tab. 1). Nevyzrálé listy v polovině května měly hodnoty maximálního kvantového výtěžku jen mírně převyšující hodnotu 0,7. Také absorptivita vykazuje nižší hodnoty s výrazněji vyšším rozptylem (průkazně odlišným mezi variantami). Proces vyzrání nebyl zastaven ani ve druhém termínu měření (18. 6.), přestože poměry F_v/F_m již přesahovaly hodnotu 0,8 a absorptivita měla již vyrovnaný charakter. Vyplývá to z dalšího poklesu směrodatné odchylky měřených parametrů v červenci. U druhého termínu byla průkazně vyšší hodnota minimální a maximální fluorescence

Tab. 1.

Základní parametry fluorescence chlorofylu a absorptivita (Abs.) listů buků variant vápněná a kontrola na jednotlivých parcelách a průměrně za variantu podle termínů odběru. Rozdílná písmena značí příslušnost k statisticky odlišným skupinám mezi parcelami či variantami ($\alpha = 0.05$) Basic parameters of chlorophyll *a* fluorescence and absorptivity (Abs.) of beech leaves in fertilized treatment and control according to plots and variants in particular terms of sampling. Different letters between plots or treatments show significantly different groups at $\alpha = 0.05$. Průměr = Mean, sm. odch. = Standard deviation

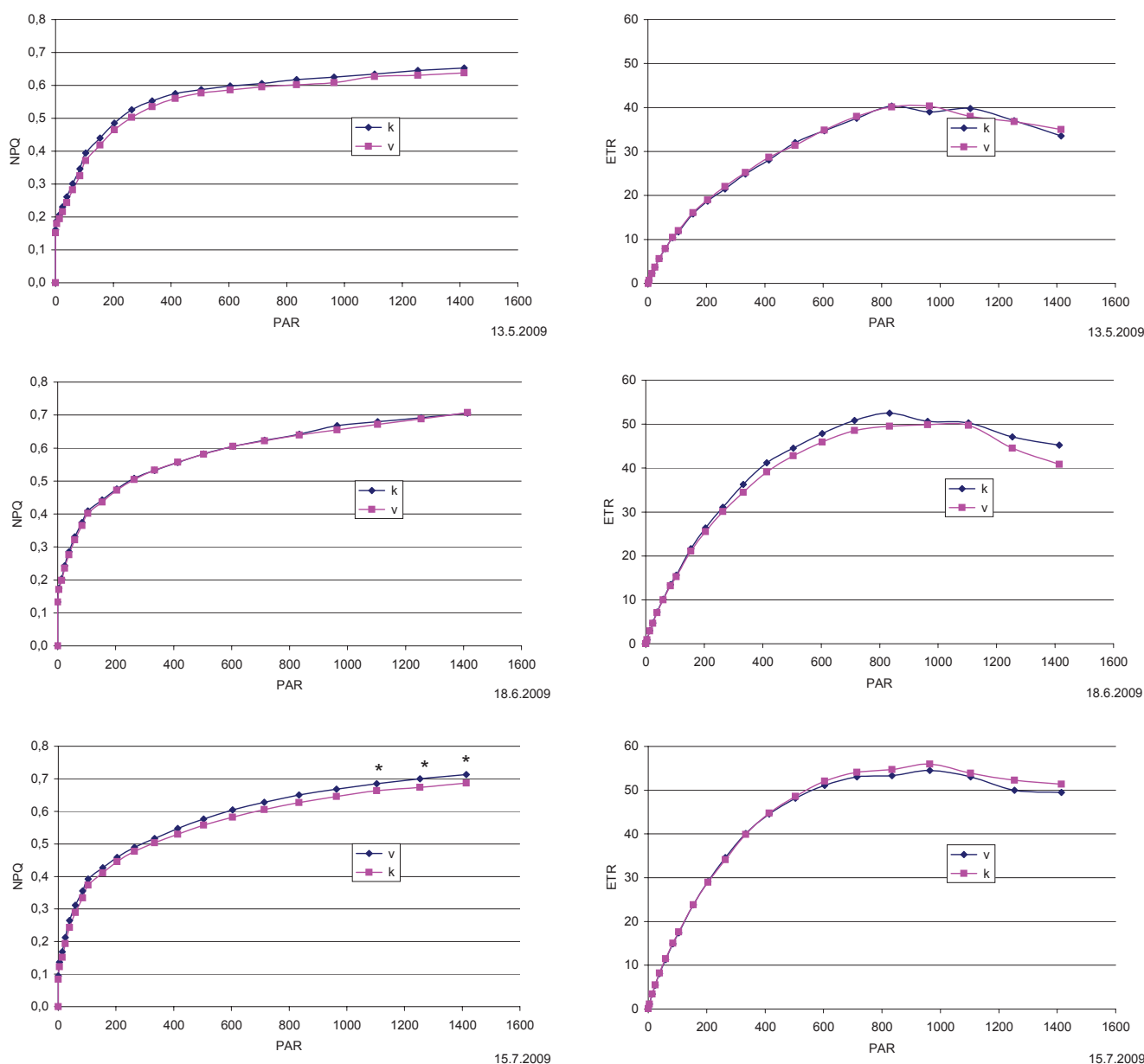
14.5.2009		F_0		F_m		F_v/F_m		Abs.	
Varianta /Treatment	Parcela/Plot	průměr	sm. odch.	průměr	sm. odch.	průměr	sm. odch.	průměr	sm. odch.
Vápněná /Limestone	O2	0.075	0.0172	0.276	0.0874	0.714	0.0699	0.693	0.0269
	R6	0.083	0.0173	0.281	0.0871	0.691	0.0710	0.709	0.0263
	Celkem/All	0.079	0.0177	0.278	0.0873	0.703	0.0713	0.701	0.0279
Kontrola /Control	N2	0.082	0.0183	0.299	0.0953	0.711	0.0653	0.698	0.0440
	P6	0.078	0.0156	0.284	0.0973	0.709	0.0691	0.709	0.0413
	Celkem/All	0.080	0.0173	0.293	0.0965	0.710	0.0670	0.703	0.0432
18.6.2009		F_0		F_m		F_v/F_m		Abs.	
Varianta /Treatment	Parcela	průměr	sm. odch.	průměr	sm. odch.	průměr	sm. odch.	průměr	sm. odch.
Vápněná /Limestone	O2	0.052 b	0.0136	0.326 b	0.0889	0.835	0.0301	0.800	0.0176
	R6	0.066 a	0.0151	0.412 a	0.0910	0.839	0.0276	0.806	0.0169
	Celkem/All	0.059	0.0159	0.369	0.0998	0.837	0.0289	0.803	0.0175
Kontrola /Control	N2	0.063 a	0.0168	0.384 ab	0.1004	0.832	0.0279	0.797	0.0187
	P6	0.060 ab	0.0171	0.346 ab	0.1090	0.826	0.0270	0.805	0.0185
	Celkem/All	0.062	0.0170	0.367	0.1060	0.829	0.0277	0.801	0.0190
15.7.2009		F_0		F_m		F_v/F_m		Abs.	
Varianta /Treatment	Parcela	průměr	sm. odch.	průměr	sm. odch.	průměr	sm. odch.	průměr	sm. odch.
Vápněná /Limestone	O2	0.052	0.0081	0.394	0.0789	0.866	0.0155	0.799	0.0190
	R6	0.053	0.0083	0.409	0.0895	0.869	0.0169	0.806	0.0151
	Celkem/All	0.052	0.0082	0.400	0.0841	0.867 a	0.0162	0.802	0.0177
Kontrola /Control	N2	0.053	0.0095	0.381	0.0786	0.860	0.0180	0.798	0.0197
	P6	0.051	0.0091	0.367	0.0967	0.859	0.0161	0.806	0.0189
	Celkem/All	0.052	0.0094	0.374	0.0885	0.860 b	0.0171	0.802	0.0197

u vápněné parcely R6 oproti druhé vápněné parcele. Přestože odběry byly prováděny na srovnatelných jedincích, v následujícím termínu již tento rozdíl patrný nebyl. Byl však naměřen průkazně vyšší maximální kvantový výtěžek F_v/F_m u vápněné oproti kontrolní variantě (0,876 oproti 0,860) a potvrzen tak neprůkazný náznak rozdílu v předchozím termínu (0,837 oproti 0,829).

Při posouzení reakce asimilačního aparátu na zvyšující se intenzitu záření pomocí parametrů nefotochemické zhášení (NPQ) a rychlosti transportu elektronů (ETR) bylo patrné navýšení relativních hodnot průběhu křivek mezi termíny. Potvrzuje se zvláště nevyzrálost listů v prvním termínu měření, kdy hodnoty NPQ po strmějším nárůstu ani při vyšším stupni ozáření nedosahují hodnot vyšších než 0,65

(obr. 1), zatímco mírně pozvolnější nárůst ve zbývajících termínech dosahuje maxima okolo 0,7. Pouze v červencovém termínu při třech maximálních dávkách záření vykazovaly hodnoty NPQ jednotlivých variant průkazné rozdíly s tím, že hodnoty u vápněných buků byly vyšší.

Také parametr rychlosti transportu elektronů ETR byl nejnižší v květnovém termínu. Relativní poloha křivek jednotlivých variant mezi termíny kolísá, avšak neprůkazně. Snížování průběhu křivky při vyšších hodnotách PAR, které naznačuje sklon k fotoinhibici, u měření v květnu začíná mezi hodnotami 800 až 1 000 PAR (obr. 1). V následujících termínech dochází k posuvu počátku poklesu do vyšších hodnot PAR a k jeho zmírnění.



Obr. 1. Světlostní křivky nefotochemického zhášení – NPQ a parametru rychlosti transportu elektronů – ETR ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) listů buků podle variant. Vzorky z 13. 5. (nahore), 18. 6. (uprostřed) a 15. 7. 2009 (dole). V – vápněno při výsadbě, k – kontrola, PAR – fotosynteticky aktivní radiace

Fig. 1. Rapid light curves of non-photochemical quenching – NPQ and electron transport rate – ETR ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) of the beech leaves according to treatments. Samples from 13. 5. (top), 18. 6. (middle) and 15. 7. 2009 (bottom). V – fertilized by limestone, k – control, PAR – Photosynthetically Active Radiation

2. Fotosynteticky aktivní pigmenty

Analýza fotosynteticky aktivních pigmentů vzorků z květnového odběru nedospěla k průkazně odlišným koncentracím chlorofylů ani karotenoidů (Chl_a , Chl_b , Chl_{a+b} , ani Car_{x+c}). U vápněné varianty je patrná vyšší variabilita obsahů chlorofylu a i b (tab. 2). Obsah chlorofylu a se pohybuje mírně nad hodnotou $700 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, obsah chlorofylu b pak nad $200 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a obsah karotenoidů okolo $360 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvé hmoty. Přestože se poměr celkového množství chlorofylu a karotenoidů ($\text{Chl}_{a+b}/\text{Car}_{x+c}$) mezi variantami průkazně neliší (tab. 2), při statistickém porovnávání parcel byla zjištěna signifikantně vyšší střední hodnota na parcele O2 (vápněno) oproti parcelám P6 (kontrola) a R6 (vápněno).

Naproti tomu v červencovém termínu byly mezi variantami zaznamenány průkazné rozdíly v obsahu i poměrech všech analyzovaných skupin fotosynteticky aktivních pigmentů. Vyšší obsah pigmentů byl zaznamenán u vápněné varianty oproti variantě kontrolní (tab. 2), a to jak u chlorofylu a a b , tak i u karotenoidů. Mírně, avšak neprůkazně vyšší průměrné hodnoty poměru $\text{Chl}_a/\text{Chl}_b$ byly zjištěny u varianty kontrolní (3,38) oproti variantě vápněné (3,33); také poměr celkového množství chlorofylu a karotenoidů byl na kontrole vyšší než na vápněné variantě (4,11 oproti 4,02). Rozdíly u tohoto parametru byly statisticky průkazné (tab. 2).

Tab. 2.

Obsahy fotosyntetických pigmentů (v $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvé hmotnosti) v listí buku varianty vápněné a nevápněné podle parcel a variant (v závorce směrodatná odchylka) a poměry fotosyntetických pigmentů. Rozdílná písmena značí statisticky průkaznou odlišnost mezi variantami či parcelami ($\alpha = 0.05$)

Contents of photosynthetic pigments (in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of fresh weight) in beech leaves according to treatments and plots together with ratios Chl a/b and Chl/carotenoids. Different letters between plots or treatments show significantly different groups at $\alpha = 0.05$. Průměr = Mean, Standard deviation in brackets

14.5.2009											
Varianta /Treatment	Parcela /Plot	Chl_a	Chl_b	Chl_{a+b}	Car_{x+c}	$\text{Chl}_a/\text{Chl}_b$	$\text{Chl}_{a+b}/\text{Car}_{x+c}$				
Vápněná /Limestone	O2	722,0 (65,58)	218,7 a (32,50)	940,8 a (96,27)	361,5 b (12,35)	3,33 b	2,60 a				
	R6	695,1 (47,95)	206,6 ab (15,33)	901,8 ab (63,05)	372,2 ab (30,64)	3,37 b	2,43 b				
	Průměr	708,6 (59,00)	212,7 (26,12)	921,3 (83,68)	366,9 (23,97)	3,35	2,51				
Kontrola /Control	N2	716,8 (37,50)	213,7 a (16,01)	930,4 ab (50,52)	373,4 a (13,51)	3,36 b	2,49 ab				
	P6	693,7 (31,06)	200,8 b (7,76)	894,5 b (37,21)	368,1 ab (21,12)	3,46 a	2,43 b				
	Průměr	705,2 (36,31)	207,2 (14,13)	912,5 (47,87)	370,8 (17,92)	3,41	2,46				
15.7.2009											
Varianta /Treatment	Parcela /Plot	Chl_a	Chl_b	Chl_{a+b}	Car_{x+c}	$\text{Chl}_a/\text{Chl}_b$	$\text{Chl}_{a+b}/\text{Car}_{x+c}$				
Vápněná /Limestone	O2	1809,7 a (72,03)	542,0 a (28,45)	2337,1 b (82,77)	586,60 a (22,88)	3,35 ab	3,99 b				
	R6	1825,1 a (48,82)	551,8 a (23,92)	2401,7 a (66,57)	594,18 a (24,92)	3,31 b	4,05 ab				
	Průměr	1817,4 a (62,01)	546,9 a (26,74)	2369,4 a (76,16)	590,39 a (24,22)	3,33	4,02 b				
Kontrola /Control	N2	1722,2 b (71,23)	513,9 b (24,62)	2237,2 c (88,99)	547,35 b (21,97)	3,35 ab	4,09 ab				
	P6	1758,4 b (63,37)	516,5 b (23,07)	2298,5 b (79,29)	557,32 b (19,72)	3,41 a	4,13 a				
	Průměr	1740,3 b (69,81)	515,2 b (23,89)	2267,9 b (86,50)	552,34 b (21,46)	3,38	4,11 a				

Tab. 3.

Obsah živin v listí buku lesního (%). Rozdílná písmena značí příslušnost k statisticky odlišným skupinám mezi parcelami či variantami ($\alpha = 0.05$)

Concentration of nutrients in leaves of beech in control and limestone (%). Different letters between treatments show significantly different groups at $\alpha = 0.05$

Varianta /Treatment		N	P	K	Ca	Mg	S	Si
Vápněná /Limestone	průměr	1.96	0.15 a	0.54	0.54	0.220	0.180	0.152
	<i>sm.odch.</i>	0.170	0.017	0.098	0.275	0.0310	0.0481	0.0579
Kontrola /Control	průměr	1.93	0.13 b	0.55	0.58	0.217	0.159	0.153
	<i>sm.odch.</i>	0.213	0.026	0.085	0.208	0.0278	0.0319	0.0584

3. Obsahy živin

Průkazný rozdíl mezi obsahem analyzovaných prvků v listích variant buku byl zjištěn pouze v případě fosforu, kterého listy vápněné varianty obsahovaly průkazně více (0,15 %) než kontrola (0,13 %) – tab. 3. Zjištěné hodnoty se pohybovaly na hranici mezi nízkou a normální zásobou. Průměrný obsah hořčíku u vápněné varianty jen mírně převyšoval obsah v listech z kontroly, v obou případech byla jeho zásoba normální. U vápníku bylo zastoupení v listech vápněné varianty dokonce neprůkazně nižší (0,54 %) než v případě kontroly (0,58 %). Listy vápněné varianty obsahovaly neprůkazně více dusíku, obsah byl celkově nízký. Obsah síry vykazoval vyšší variabilitu, proto se ani v tomto případě vyšší průměrná hodnota zastoupení síry v listech vápněné varianty statisticky nelišila.

DISKUSE

Spojení hodnocení obsahu chlorofylů a fluorescence chlorofylu *a* umožňuje komplexnější vzhled do fotosyntetických pochodů uvnitř asimilačního aparátu. Obě metody v našem případě poukazují na nevyzrálou listů a výraznější rozkolísanost měřených hodnot v květnovém odběru. Vyšší rozptýlené hodnoty obsahů fotosynteticky aktivních pigmentů se však v parametrech fluorescence neodrazil. Podle kritérií, která udávají BOLHAR-NORDENKAMPF a GÖTZL (1992) pro smrk, byly květnové hodnoty maximálního kvantového výtěžku fotosystému II (F_v/F_m) pod prahovou hodnotou poruch (0,72). S ohledem na odlišnou dřevinu spíše než na poruchy, hodnota poukazuje na nevyzrálou pletiva. Postupné zvyšování poměru F_v/F_m během vyžívání odpovídá sledování ČAŇOVÉ et al. (2008). Tito autoři u dospělého buku v průběhu fenologického vývoje listů naměřili přístrojem PEA (Hansatech Ltd., Kings Lynn, UK) u 2. stadia rašení střední hodnotu 0,780, u 4. stadia pak již hodnotu 0,820. Přímé srovnání hodnot maximálního kvantového výtěžku fotosystému II s literaturou je však obtížné. Přístroj Imaging-PAM je na rozdíl od přístroje PEA primárně zaměřen na sledování dvojdimenzionální heterogenity fotosyntetické aktivity listů a i při zatemnělé místnosti jsou podle našich zkušeností hodnoty F_0 ovlivněny záblesky měřicího světla předcházejícího saturačnímu impulzu.

Plně vyzrálé listy v druhé polovině července v našem experimentu již vykazovaly průkazně vyšší hodnoty maximálního výtěžku fotosystému II (F_v/F_m) u vápněné varianty. Jak vyplývá z analýzy obsahu chlorofylů a karotenoidů, tento rozdíl je podmíněn právě vyšší koncentrací těchto pigmentů. SARIJEVA et al. (2007) zjistili u slunných listů solitérního dospělého buku obsah chlorofylu téměř o třetinu vyšší (3,10 mg.g⁻¹ čerstvé hmotnosti). Stinné listy měly obsah ještě násobně vyšší (6,98 mg.g⁻¹). Jednalo se však o 56letého solitérního jedince z nižších, tedy příznivějších poloh.

V literatuře je zmiňován vliv teploty na fluorescence chlorofylu, měření při teplotách nižších než je 20 °C mohou vést k umělému nadhodnocení variabilní fluorescence – F_v (HUNER et al. 1992). Zvláště stresové teploty vedou k podstatným změnám fluorescence. Např. DREYER et al. (2001) popisují nárůst hodnot minimální fluorescence F_0 u sedmi druhů listnatých dřevin včetně buku při teplotách okolo 47 °C, značící nevratné poškození PS II. Ke srovnatelné teplotě dospěl ROBAKOWSKI et al. (2002) i u jedle bělokoré. Oproti tomu změny fluorescence měřené v teplotách pro rostliny příznivých jsou malé (ILÍK et al. 1997). Byl však také pozorován vztah mezi minimálními teplotami několika dní, které předcházely měření a hodnotami minimální fluorescence (DYTMAROVÁ et al. 2004). Pro minimalizaci vlivu teploty na fluorescence chlorofylu byly v našem pokusu vzorky jednotně přechovávány noc před analýzou v lednici a následně adaptovány na teplotní podmínky laboratoře, které mezi jednotlivými termíny měření kolísaly v rozmezí cca 3 °C.

WERTHER a HAVRANEK (2000) pozorovali nižší efektivní kvantový výtěžek fotosyntézy u sazenic smrku s deficitem dusíku. HOTZ et al. (1990) nenalezli rozdíly mezi obsahem chlorofylu a parametry fluorescence chlorofylu u buku viditelně poškozených a nepoškozených v souvislosti s imisemi, které lze považovat za výrazný stresující faktor. Domnívají se, že to může být způsobeno tím, že imise nejsou primárním faktorem viditelného chřadnutí stromu. V našem pokusu nebyly ani u jedné varianty pozorovány optické známky nevyváženosti výživy, buky se v současné době vyvíjejí stanovišti odpovídajícím způsobem. Analyzované zastoupení jednotlivých živin v listích obou variant buku se pohybuje v rozmezí normálních hodnot, výjimku tvoří fosfor, který zasahuje do rozmezí mírného deficitu. O stresu způsobeném výživou však nelze uvažovat.

Jak v květnovém, tak červencovém termínu byly naměřeny poměry chlorofylu *a* a chlorofylu *b* (Chl_a/Chl_b) na jednotlivých parcelách v rozmezí od 3,30 (vápněná) do 3,45 (kontrola), což odpovídá v literatuře uváděnému poměru 3:1 až 4:1 u rostlin rostoucích za optimálních podmínek (GLOSER 1998). Stabilizovaný poměr Chl_a/Chl_b mezi termíny naznačuje, že tvorba chlorofylů, a to především chlorofylu *a*, není příliš potlačena vnějšími vlivy a rostliny tak mohou tvořit větší množství asimilátů pro svůj růst. Jak ukazují SARIJEVA et al. (2007), poměr Chl_a/Chl_b nejen u buku významně závisí na ozáření listů. U stíněných listů spadá pod spodní hranici stanoveného rozmezí (autoři uvádí hodnotu 2,68).

Jak uvádí např. DEMMIG-ADAMS et al. (1996), karotenoidy mají v rostlině nejen funkci světlosběrnou (jako doplňkové pigmenty), ale také ochrannou – chrání fotosyntetický aparát před nevratnou fotooxidací. Nižší - i když zprvu neprůkazně - průměrný poměr obsahu chlorofylů *a* a *b* a karotenoidů (Chl_{a+b}/Car_{x+c}) byl zjištěn u obou termínů v případě vápněné varianty. Nižší poměr v květnovém odběru oproti červencovému, tedy vyšší relativní obsah karotenoidů na jaře, souvisí s postupem tvorby pigmentů, kdy se nejdříve vytvářejí karotenoidy a pak chlorofyl *a* a chlorofyl *b* (KINCL, KRPEŠ 2006).

Přes násobně vyšší zastoupení vápníku v půdě v prostoru jamek u vápněné varianty, zjištěné rozbořem v roce 2002, chemická analýza obsahu živin v listech nepoukázala na průkazné rozdíly mezi variantami, s výjimkou fosforu. Luxusní zásoba vápníku v půdě jako pozůstatek přihnojení se neprojevila v rozdílech obsahu tohoto prvku v listech, z analýzy lze konstatovat shodně nastavenou výživu u obou hodnocených variant. Je zde možná souvislost s problematikou rozrůstání kořenů z prostoru jamky, neboť půdní rozbor vzorků (z prostoru jamek) ve stejném roce stále poukazyval na násobně vyšší obsah CaO, ale i MgO u vápněné varianty oproti kontrole (CaO 2 167 mg.kg⁻¹ a 51 mg.kg⁻¹ a MgO 51 mg.kg⁻¹ a 17 mg.kg⁻¹) a s tím spojené vyšší hodnoty pH (BALCAR et al. 2011).

U analyzovaných výsadeb buku byl sledován také vliv melioračního zásahu na mortalitu a růst (BALCAR et al. 2011). Vápnění mělo negativní vliv na mortalitu buku, která byla oproti kontrole o 20 % vyšší, naproti tomu podpořilo růst dominantních jedinců (20 % nejvyšších z výsadbového počtu).

ZÁVĚR

Z hodnocení fluorescence chlorofylu *a*, obsahu fotosynteticky aktivních pigmentů a chemické analýzy listů buku 17 let po výsadbě ve variantách přihnojení dolomitickým vápencem a kontrola vyplynulo, že bez ohledu na trvajícím výrazným rozdílem chemismu půdy v prostoru jamek byly průkazné rozdíly zjištěny pouze u některých parametrů z odběru v druhé polovině července. Měřením fluorescence i obsahu

chlorofylů byla u květnového odběru potvrzena nevyzrálost asimilačního aparátu, bez průkazných rozdílů mezi variantami v hodnocených charakteristikách. Přihnojení vápencem do jamky se 17 let po výsadbě odrazilo ve vlastnostech vyzrálých listů z druhé poloviny července: v průkazně vyšších hodnotách parametru maximálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II (F_v/F_m) i obsahu fotosyntetických pigmentů vápněné varianty oproti kontrole. Z naměřených hodnot vyplývá, že fotosyntetický aparát vápněných buků ukazuje potenciál pro vyšší intenzitu fotosyntézy. Zastoupení živin v listech obou variant se pravděpodobně díky delšímu časovému odstupu od aplikace již nelišilo. Pro detekci ovlivnění buku chemickou meliorací s delším časovým odstupem po aplikaci hnojiva se metody hodnotící množství a aktivitu fotosyntetických pigmentů jeví jako citlivější. V případě požadavku ověřit přetrvávající vliv hnojení lze vzhledem k rychlosti a operativnosti měření doporučit přednostní využití metody analýzy fluorescence chlorofylu. S ohledem na fyziologicky i technicky podmíněnou absenci limitních hodnot je u obou metod nutné srovnávací měření odpovídajícího materiálu.

Poděkování:

Výzkumná šetření včetně vyhodnocení získaných výsledků uvedených v příspěvku byla provedena za podpory grantu NAZV č. QH92087 „Funkční potenciál vybraných listnatých dřevin a jejich vnášení do porostů v Jizerských horách“.

LITERATURA

- BALCAR V., VACEK S., HENŽLÍK V. 1994. Poškození a úhyn lesních porostů v Sudetských horách. In: Paschalis P., Zajaczkowski S. (eds.): Protection of forest ecosystems. Selected problems of forestry in Sudety Mountains. Varšava, Rozwoj SGGV: 29-57.
- BALCAR V., PODRÁZSKÝ V. 1994. Založení výsadbového pokusu v hřebenové partii Jizerských hor. Zprávy lesnického výzkumu 39 (2): 1-7.
- BALCAR V. 1998. Support of forest plantations in the mountains by application of finely ground dolomitic limestone. In: Wagner, R. G., Thompson, D. G. (eds.): Third international conference on forest vegetation management: Popular summaries. Sault Ste. Marie, Ontario Forest Research Institute: 386-388. Forest Research Information Paper, No. 141.
- BALCAR V., KACÁLEK D. 2008. Growth and health state of silver fir (*Abies alba* Mill.) in the ridge area of the Jizerské hory Mts. Journal of Forest Science, 54: 509-518.
- BALCAR V., KACÁLEK D., KUNEŠ I., DUŠEK D. 2011. Effect of soil liming on European beech (*Fagus sylvatica* L.) and sycamore maple (*Acer pseudoplatanus* L.) plantations. Folia Forestalia Polonica, series A, 53: 85-92.
- BOLHAR-NORDENKAMPF H.R., GRÖTZL M. 1992: Chlorophyll-fluoreszenz als Indikator der mit der Seehöhe zunehmenden Stressbelastung von Fichtennadeln. FBVA – Berichte, 67: 119-131.
- ČAŇOVÁ I., ĎURKOVIČ J., HLADKÁ D. 2008. Stomatal and chlorophyll fluorescence characteristics in European beech cultivars during leaf development. Biologia Plantarum, 52: 577-581.
- DEMMIG-ADAMS B., GILMORE A. M., ADAMS III. W. W. 1996. *In vivo* functions of carotenoids in higher plants. The FASEB Journal, 10: 403-412.
- DITMAROVÁ, L., KMEŤ, J., STŘELCOVÁ, K., GÖMÖRY, D. 2004. Effect of temperature on selected physiological parameters of young beech trees under stress conditions. Ekológia (Bratislava), 23: 152-161.
- DREYER E., ROUX X. LE, MONTPIED P., DAUDET F.A., MASSON F.A. 2001. Temperature response of leaf photosynthetic capacity in seedlings from seven temperate tree species. Tree Physiology, 21: 223-232.
- GLOSER J. 1998. Fyziologie rostlin. Brno, Masarykova univerzita: 157 s.
- HARBINSON J., ROSENQUIST E. 2003. An introduction to chlorophyll fluorescence. In: DeEll, J.R., Toivonen, P.M.A. (eds.): Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology. Boston, Kluwer Academic: 1-30.
- HOTZ A., BILGER W., KAISER W. M., LANGE O. L. 1990. Chlorophyll-Fluoreszenz, Photosynthesekapazität, Chlorophyll- und Nährstoffgehalte der Blätter "ungeschädigter" und als "geschädigt" eingestuft Buchen (*Fagus sylvatica* L.) im Gebiet um Würzburg. Forstwissenschaftliches Centralblatt, 109 (1): 40-54.
- HUNER N.P.A., OQUIST G., SUNDBLAD L.-G. 1992. Low measuring temperature induced artifactual increase in chlorophyll *a* fluorescence. Plant Physiology, 98: 749-752.
- KINCL M., KRPEŠ V. 2006. Základy fyziologie rostlin. Ostrava, Baloušek: 220 s.
- KOPÁČEK J., VESELÝ J. 2005. Sulfur and nitrogen emissions in the Czech Republic and Slovakia from 1850 till 2000. Atmospheric Environment, 39: 2179-2188.
- KOPINGA J., BURG J. VAN DEN 1995. Using soil and foliar analysis to diagnose the nutritional status of urban trees. Journal of Arboriculture, 21: 17-24.
- KUNEŠ I., BALCAR V., ZAHRADNÍK D. 2007. Influence of a planting hole application of dolomitic limestone powder and basalt grit on the growth of Carpathian birch (*Betula carpatica* W. et K.) and soil chemistry in the air-polluted Jizerské hory Mts. Journal of Forest Science, 53: 505-515.
- KUNEŠ I. et al. 2009. Influence of pulverized limestone and amphibio-lite mixture on the growth performance of *Aldus incana* (L.) Moench plantation on an acidified mountain site. Journal of Forest Science, 55: 469-476.
- KURASOVÁ I., ČAJÁNEK M., KALINA J., URBAN O., ŠPUNDA V. 2002. Characterization of acclimation of *Hordeum vulgare* to high irradiation based on different responses of photosynthetic activity and pigment composition. Photosynthesis Research, 72: 71-83.
- LICHTENTHALER H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology, 148: 351-382.
- LICHTENTHALER H.K., BUSCHMANN C., KNAPP M. 2005. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio RFd of leaves with the PAM fluorometer. Photosynthetica, 43: 379-393.
- MAKEEN K., SURESH BABU G., LAVANYA G.R., ABRAHAM G. 2007. Studies of chlorophyll content methods in black gram (*Vigna*

- mungo* L.). International Journal of Agricultural Research, 2: 651-654.
- MATERNA J., LOCHMAN V. 1988. Vliv znečištěného ovzduší na půdu. Lesnická práce, 67: 248-255.
- MAXWELL K., JOHNSON G.J. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. Journal of Experimental Botany, 51: 659-668.
- NEBE W., WOYDICH T., LEUBE F. 1997. Zur Ernährung und Düngung der Fichte mit Kalium, Kalzium und Magnesium im Unterharz bei anhaltenden Immissionsbelastungen. Beiträge für Forstwirtschaft und Landschaftsökologie, 31: 1-6.
- PODRÁZSKÝ V. 1991. Krátkodobé účinky vápnění v extrémních imisně ekologických podmínkách Orlických hor. Lesnictví, 37: 1009-1023.
- PODRÁZSKÝ V. 1992. Dolomitický vápenec - složení a účinnost. Zprávy lesnického výzkumu, 37 (4): 36-39.
- PODRÁZSKÝ V., VACEK S., ULBRICHOVÁ I. 2003. Effect of fertilisation on Norway spruce needles. Journal of Forest Science, 49: 321-326.
- ROBAKOWSKI P., MONTPIED P., DREYER E. 2002. Temperature response of photosynthesis of silver fir (*Abies alba* Mill.) seedlings. Annals of Forest Science, 59: 163-170.
- SARIJEVA G., KNAPP M., LICHTENTHALER H.K. 2007. Differences in photosynthetic activity, chlorophyll and carotenoid levels, and in chlorophyll fluorescence parameters in green sun and shade leaves of *Ginkgo* and *Fagus*. Journal of Plant Physiology, 164: 950-955.
- SCHAAF W., HÜTTL R.F. 2006. Experiences with liming in European countries - results of long-term experiments. Journal of Forest Science, 52 (Special Issue): 35-44.
- WALZ H. 2004. Imaging – PAM chlorophyll fluorometer. Instrument description and information for users. 2.143 / 02.2003, 4. Edition: February 2004: 134 s.
- WERTHER F., HAVRANEK W. M. 2000. Effects of nutrient-deficient soil on gas-exchange, chlorophyll fluorescence and C-allocation in young *Picea abies* (L.) Karst. Phytion (Horn) 40: 179-184.
- ZBÍRAL J. 1994: Analýza rostlinného materiálu. Jednotlivé pracovní postupy. Brno, SKZÚZ.

CHLOROPHYLL FLUORESCENCE, CHEMISTRY AND CONTENTS OF PHOTOSYNTHETIC ACTIVE PIGMENTS IN SPOT-LIMED BEECH LEAVES

SUMMARY

Rocks containing basic nutrients were used to prevent further acidification in mountain areas to improve air-polluted soils. The most frequent matter used for both aerial and spot applications was a finely-ground limestone. We conducted our study in an experiment in the Jizera Mountains. The experimental basis consists of European beech plantations where a spot application of limestone was conducted at time of planting in 1993. Both limed and control plots were twice replicated. Our study addresses research question: do chlorophyll *a* fluorescence, macronutrient concentration and contents of photosynthetic active pigments (chlorophyll *a* – Chl_a, chlorophyll *b* – Chl_b and carotenoids – Car_{x+c}) differ significantly between treatments 17 years after planting?

Samples of beech leaves were collected three times in mid-May, -June and -July 2009. Analyzes used were as follows: chlorophyll *a* fluorescence using Imaging PAM fluorometer, contents of chlorophyll and carotenoids being extracted by 80% acetone and then analyzed using the Unicam Helios ϵ spectrophotometer. In addition to aforementioned properties, contents of nutrients (N, P, K, Ca, Mg, S, Si) in leaves were analyzed. Data were processed using T-test or one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test.

Regardless of the different soil conditions in planting holes, the only significant difference was found in mature leaves being taken on July 15th. The average maximum quantum yield of PS II photochemistry (F_v/F_m) was 0.867 for limed beeches and 0.860 for control ones (Tab. 1). Contents of chlorophylls (Chl_{a+b}) and carotenoids (Car_{x+c}) expressed as a concentration in fresh-weight matter also differed by the treatments in leaves of July origin. The limed leaves were higher in both groups of pigments (Chl_{a+b} 2,369 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; Car_{x+c} 590 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) compared to non-fertilized (Chl_{a+b} 2,268 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; Car_{x+c} 552 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) leaves (Tab. 2). As for immature leaves from two previous sampling days, the quantum yield and contents of pigments did not differ between treatments. Light curves of non-photochemical quenching (NPQ) and electron transport rate (ETR) showed no statistically significant differences (Fig. 1). The chemical analysis of nutrients showed that the limed beech leaves were significantly higher (0.15%) in phosphorus compared to control treatment (0.13%).

Our results show the influence of spot liming on a photosynthetic performance even 17 years after planting and fertilization. Relatively quick and flexible method of chlorophyll *a* fluorescence analysis gives reliable data provided that mature assimilatory tissues are sampled and it can be recommended to assess effect of liming on photosynthetic efficiency. Chemistry of leaves does not show expected differences. This is likely to reflect status that growing roots of trees grew out of the fertilized soil. Thus a further research is needed.

Recenzováno

ADRESA AUTORA/CORRESPONDING AUTHOR:

Ing. Ondřej Špulák, Ph.D., Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., VS Opočno
Na Olivě 550, 517 73 Opočno, Česká republika
tel.: 494 668 391-2; e-mail: spulak@vulhmop.cz