

MĚŘENÍ OBSAHU A FLUORESCENCE CHLOROFYLU V LISTECH SADEBNÍHO MATERIÁLU VYBRANÝCH DŘEVIN POMOCÍ PŘENOSNÝCH PŘÍSTROJŮ



Ing. ROSTISLAV LINDA

Ing. DAGMAR ZÁDRAPOVÁ

Ing. KATEŘINA KŘÍŽOVÁ

doc. Ing. IVAN KUNEŠ, Ph.D.

**Měření obsahu a fluorescence chlorofylu
v listech sadebního materiálu
vybraných dřevin
pomocí přenosných přístrojů**

**Identifikace fyziologického stresu sadebního materiálu
lesních dřevin**

Certifikovaná metodika

**Ing. Rostislav Linda
Ing. Dagmar Zádrapová
Ing. Kateřina Křížová
doc. Ing. Ivan Kuneš, Ph.D.**

Strnady 2019

Lesnický průvodce 2/2019

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.

Strnady 136, 252 02 Jíloviště

www.vulhm.cz

Publikace vydané v řadě Lesnický průvodce jsou dostupné v elektronické verzi na:

http://www.vulhm.cz/lesnicky_pruvodce

Vedoucí redaktor: Ing. Jan Řezáč; e-mail: rezac@vulhm.cz

Výkonná redaktorka: Miroslava Valentová; e-mail: valentova@vulhmop.cz

Grafická úprava a zlom: Klára Šimerová; e-mail: simerova@vulhm.cz

ISBN 978-80-7417-172-7

ISSN 0862-7657

IDENTIFICATION OF PHYSIOLOGICAL STRESS OF PLANT MATERIAL OF FOREST TREE SPECIES

Abstract

The main goal of the methodology is to suggest a suitable approach for reliable measurements of chlorophyll parameters in leaves of selected tree species (*Picea abies*; *Pinus sylvestris*; *Abies alba*; *Quercus robur/petraea*; *Fagus sylvatica*) by handheld devices. The measurements of leaf chlorophyll content and fluorescence are useful for stress detection and determination of the health status of tree seedlings in forest nurseries.

We also address the issue of determining the main aspects that influence the accuracy of chlorophyll content and chlorophyll fluorescence measurements by handheld devices, and suggesting critical values of chlorophyll parameters needed to specify stressed individuals.

We describe the measurement processes on the devices OS30p+ and CCM-300 by Opti-Sciences. However, other widely used devices are mentioned as well. As the process of measurement is very similar for all related devices, the results in our methodology could be applied to other instruments for measuring of chlorophyll parameters.

Keywords: chlorophyll content; chlorophyll fluorescence; forest nurseries

Oponenti: Ing. Kateřina Houšková, Ph.D., Ústav zakládání a pěstění lesů,
Lesnická a dřevařská fakulta, Mendelova univerzita v Brně
Ing. Tomáš Eybl, DiS., Ústav pro hospodářskou úpravu lesů Brandýs
nad Labem, pobočka České Budějovice

Adresa autorů:

Rostislav Linda

Ivan Kuneš

Katedra pěstování lesů, Fakulta lesnická a dřevařská

ČZU v Praze

Kamýcká 129

165 00 Praha 6 – Suchdol

Dagmar Zádrapová

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin, Fakulta lesnická a dřevařská

ČZU v Praze

Kamýcká 129

165 00 Praha 6 – Suchdol

Kateřina Křížová

Katedra využití strojů, Technická fakulta

ČZU v Praze

Kamýcká 129

165 00 Praha 6 – Suchdol

Prohlášení o poskytovateli dotace na projekt

Tato metodika vznikla za podpory projektu TAČR ZÉTA „Evaluace výsledků měření parametrů chlorofylu v listech vybraných dřevin pomocí přenosných zařízení“ (TJ 01000051). Poděkování patří laboratoři Truba (Kostelec nad Černými lesy) Katedry pěstování lesů, FLD ČZU v Praze za poskytnutí technického zázemí.

Obsah

1 ÚVOD A CÍL METODIKY	7
1.1 Kvalita sadebního materiálu	7
1.2 Zjišťování kvality sadebního materiálu	8
1.3 Význam měření fluorescence chlorofylu	9
2 MĚŘENÍ FLUORESCENCE A OBSAHU CHLOROFYLU PŘENOSNÝMI PŘÍSTROJI	10
2.1 Dostupné přístroje pro měření obsahu a fluorescence chlorofylu	10
2.2 Teoretická východiska měření fluorescence chlorofylu	12
2.3 Měření koncentrace chlorofylu přenosnými přístroji	14
2.3.1 Interpretace výstupních hodnot přístroje SPAD 502	14
2.3.2 Konverze výstupů přístroje CCM-200 a SPAD 502	15
2.3.3 Použití a interpretace výstupů přístroje CCM-300	17
3 MĚŘENÍ FLUORESCENCE CHLOROFYLU PŘENOSNÝMI PŘÍSTROJI	19
3.1 Adaptace vzorků na tmu před měřením	19
3.2 Použití přístroje Opti-Sciences OS30p+	20
3.3 Odpověď fluorescence chlorofylu na stres	22
3.4 Odpověď koncentrace chlorofylu na stres	25
4 IDENTIFIKACE MOŽNÝCH PROBLÉMŮ PŘI POUŽITÍ PŘENOSNÝCH PŘÍSTROJŮ	28
4.1 Vliv okolního světla	28
4.2 Přesnost a variabilita měřených hodnot	28
4.3 Adaptace na tmu	30
5 DOPORUČENÝ POSTUP	30
6 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	32

7	POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	32
8	EKONOMICKÉ ASPEKTY UPLATNĚNÍ METODIKY	33
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	34
10	SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	38
	SUMMARY	39
	PŘÍLOHY	42

1 ÚVOD A CÍL METODIKY

Předkládaná metodika se zabývá využitím přenosných přístrojů určených k měření koncentrace a fluorescence chlorofylu v lesním školkařství, přesněji detekci fyziologického poškození sadebního materiálu našich nejvýznamnějších dřevin za pomoci těchto zařízení. Přesné určení fyziologické kvality sadebního materiálu je bez použití laboratorních metod velmi problematické. Ačkoliv je princip fluorescence chlorofylu znám již z 30. let 20. století, jeho využití je do velké míry otázkou až posledních let, kdy začaly být potřebné přístroje více dostupné a umožňovaly použití i v terénních podmínkách.

Měření parametrů chlorofylu je v našich podmínkách v současné době prakticky využíváno v zemědělství či mikrobiologii, v lesnictví je však využití této techniky jen velmi omezené. Cílem této metodiky je stanovení postupů pro spolehlivé odhalení snížené fyziologické kvality sadebního materiálu, resp. detekci stresových podmínek v lesních školkách. Uvedený postup vychází zejména ze zkušeností s používáním přístrojů při získávání dat pro tuto metodiku (Opti-Sciences CCM-300 a OS30p+, více informací na <http://www.optisci.com/>), lze jej však aplikovat na veškeré podobné přístroje používané k měření koncentrace či fluorescence chlorofylu v terénních podmínkách. Specifika používání ostatních přístrojů jsou uvedena zvlášť u každého typu.

1.1 Kvalita sadebního materiálu

Kvalita sadebního materiálu lesních dřevin (SMLD) je nezbytnou podmínkou úspěšné obnovy lesa a je dána souborem genetických, fyziologických a morfologických parametrů (Lokvenc, 1980, 1984). V zájmu snížení ekonomických i ekologických ztrát je snaha pro umělou obnovu lesa a pro zalesňování užívat co nejkvalitnější sadební materiál, který do budoucna povede k vytvoření zdravých a vitálních lesních porostů. Efektivní zjišťování kvality SMLD v provozních podmínkách tedy sehrává klíčovou roli.

V současnosti stále více převládají snahy o zjišťování a kontrolu kvality SMLD ještě před samotným zahájením zalesňování. Při zpětném zjišťování kvality SMLD až při vysokém úhynu po výsadbě, jak bylo často uplatňováno v minulosti, již není zpravidla možné odvodit stav sazenic při výsadbě. Předběžné kontroly tak přinášejí výrazné snížení ekonomických i ekologických rizik spojených s neúspěšnými výsadbami při použití nekvalitního sadebního materiálu.

V České republice je problematika kvality sadebního materiálu řešena systémově a požadavky na kvalitu jsou zakotveny v platných právních předpisech. Požadavkům na genetickou kvalitu reprodukčního materiálu lesních dřevin a principům jeho přenosu jsou věnovány prováděcí předpisy lesního zákona (zákon č. 289/1995 Sb.), zejména vyhláška Ministerstva zemědělství č. 139/2004 Sb.

Požadavky na morfologickou a fyziologickou kvalitu SMLD uváděného do oběhu se řídí ustanoveními platného znění české technické normy ČSN 48 2115 „Sadební materiál lesních dřevin“ (Jurásek et al., 2012). Tato norma vychází ze zpracovaných národních standardů kvality SMLD (Jurásek & Martincová, 2000), které jsou rovněž ve shodě s platnou evropskou legislativou, tedy se směrnicí Rady 1999/105 ES o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin (Kotrla & Indra, 2000). Národní standardy kvality SMLD v souladu s evropskou směrnicí jsou shrnuty v zákoně č. 149/2003 Sb., o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin, a jeho prováděcích předpisech, zejména ve vyhlášce Ministerstva zemědělství č. 29/2004 Sb.

Od roku 2014 je zjišťováním kvality semenného a sadebního materiálu lesních dřevin pověřen Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., se sídlem v Jílovišti, Strnady. Kvalita semenného a sadebního materiálu je testována v nezávislých laboratořích pomocí akreditovaných mezinárodně uznávaných postupů. Provozní hodnocení morfologické a fyziologické kvality sadebního materiálu zajišťuje Zkušební laboratoř „Školkařská kontrola“ při Výzkumné stanici Opočno. Kvalita je v laboratoři posuzována dle technické normy ČSN 48 2115, která popisuje základní morfologické a fyziologické charakteristiky sazenic a věnuje se také metodám hodnocení fyziologického stavu sadebního materiálu.

1.2 Zjišťování kvality sadebního materiálu

Pro zjištění celkové kvality SMLD je nezbytné současné posouzení morfologických i fyziologických parametrů. Morfologické parametry jsou často zjišťovány prostým měřením. Mezi základní měřené znaky patří výška nadzemních částí semenáčků a sazenic, síla kořenového krčku či poměr objemu kořenů k nadzemní části. Morfologická kvalita bývá často posuzována vizuálně, kdy je hodnocen tvar kmínků a případný výskyt deformací či poranění.

Zatímco morfologické nedostatky v kvalitě SMLD bývají zjevné a relativně snadno zjistitelné, odhalení nedostatků spojených s fyziologickou kvalitou bývá v provozních podmínkách často výrazně obtížnější. Fyziologické vlastnosti sazenic či

semenáčků také nemusejí být v čase konstantní – naopak mohou výrazně kolísat během období mezi vyzvednutím ve školce a výsadbou v závislosti na vnějších podmínkách. Přitom ale fyziologická kvalita sadebního materiálu bývá často klíčovým parametrem pro úspěch výsadby.

Příčiny snížené fyziologické kvality bývají velmi různorodé a často vznikají spolupůsobením více faktorů. U dlouhodobě skladovaného SMLD snížená fyziologická kvalita zpravidla pramení z nedodržení optimálních skladovacích podmínek. Významný problém představuje také manipulace se SMLD v období od jeho vyzvednutí ve školce po vlastní výsadbu. Nevhodné zacházení se SMLD může vést k významnému snížení fyziologické kvality, což v konečném důsledku vede k výrazným ztrátám při umělé obnově či zalesňování.

Vyhodnocování znaků fyziologické kvality SMLD je obvykle nutno provádět pomocí laboratorních metod a většina testů založených na fyziologické kvalitě měří pouze jednu funkci rostliny. Mezi nejčastěji zjišťované fyziologické charakteristiky patří zjišťování růstového potenciálu kořenů, měření elektrické vodivosti výluhů z jemných kořenů, obsah vody, přítomnost škrobu, odolnost nadzemní části k mrazu a v neposlední řadě také posuzování kvality SMLD pomocí kvantifikace fluorescence chlorofylu (Špulák & Martincová, 2006).

1.3 Význam měření fluorescence chlorofylu

Metoda měření chlorofylové fluorescence je považována za jednoduchý, rychlý, spolehlivý a neinvazivní způsob zhodnocení fyziologické kvality sadebního materiálu. Měření fluorescence chlorofylu poskytuje informace o změnách (resp. poklesu) aktivity fotosyntetického aparátu listu během stresových podmínek (Lichtenthaler, 1996). Platí, že za optimálních podmínek je výrazně větší část absorbované energie záření využita pro fotosyntézu než za podmínek stresových (Krause & Weis, 1991).

Přímý vliv na změny fotosyntetické aktivity mají např. vodní stres či poškození nízkými teplotami (Ritchie & Landis, 2005), nicméně sledování fluorescence chlorofylu nevede k přímé identifikaci konkrétního stresoru – pomáhá pouze odhalit intenzitu a dobu trvání působení nepříznivých podmínek, příp. umožňuje vyloučení některých konkrétních stresorů. Pro odhalení konkrétního stresového faktoru je vhodné metodu měření fluorescence chlorofylu doplnit dalšími metodami (Papageorgiou & Govindjee, 2004).

2 MĚŘENÍ FLUORESCENCE A OBSAHU CHLOROFYLU PŘENOSNÝMI PŘÍSTROJI

2.1 Dostupné přístroje pro měření obsahu a fluorescence chlorofylu

Na tuzemském trhu lze v současné době nalézt 3 hlavní typy přístrojů určených k měření obsahu (resp. koncentrace) chlorofylu v zelených částech rostlin. Jedná se o přístroj CCM-300 firmy Opti-Sciences, model CCM-200 stejné firmy a v neposlední řadě rozšířený přístroj SPAD 502 vyráběný společností Konica Minolta.

Opti-Sciences CCM-300 je ruční přenosný fluorometr (obsah chlorofylu je zjišťován pomocí měření fluorescence, viz dále), který využívá poměr mezi emisí fluorescenčního světla o vlnové délce 735 nm a 700 nm (dále označovaný $F_{735/700}$) pro stanovení relativního obsahu chlorofylu v rostlinném materiálu (Opti-Sciences Inc., manuál dostupný například z https://www.forestry-suppliers.com/Documents/1790_msds.pdf). Tento poměr se ukázal jako lineárně závislý na skutečném relativním obsahu chlorofylu v rostlinném materiálu, navíc vykazující vysokou přesnost odhadu (Gitelson et al., 1999). Lineární funkce pro odhad obsahu chlorofylu je zaznamenána přímo v přístroji a lze ji kalibrovat. Přístroj obsah chlorofylu přímo vypočítává a umožňuje okamžitý náhled na odhadovanou hodnotu obsahu chlorofylu (v mg/m² listové plochy).

Ostatní dva popisované přístroje využívají transmitanci vzorku, respektive jeho optickou hustotu. Přístroj SPAD 502 zaznamenává a vyhodnocuje poměr intenzity vzorkem propuštěného světla o vlnových délkách 940 nm a 650 nm (ozn. SPAD value), podobně jako přístroj CCM-200, který zaznamenává vzorkem propuštěné světlo o vlnových délkách 940 nm a 660 nm (ozn. CCI – chlorophyll content index) (Knighton & Bugbee, 2014).

Nevýhodou posledních dvou zmíněných přístrojů je nutnost jejich kalibrace pro každý analyzovaný druh zvlášť, přičemž samotné přístroje přímé zadání funkce pro odhad hodnoty koncentrace chlorofylu neumožňují. Oba přístroje jsou tak v případě potřeby odhadu hodnoty koncentrace chlorofylu závislé na srovnávacím laboratorním měření. Dalším problémem je u zmíněných přístrojů měření koncentrace chlorofylu u jehličnanů, kdy potřebná plocha pro měření je u přístroje CCM-200 kruh o průměru 9,53 mm, což je pro měření jehlic jehličnanů nepoužitelné. Přístroj SPAD 502 pak pro měření vyžaduje plochu zelené části vzorku minimálně 3 × 2 mm s maximální tloušťkou 1,2 mm (Opti-Sciences Inc.; Spectrum Technologies Inc.,



Obr. 1: Vlevo – nejrozšířenější přístroj určený k měření obsahu chlorofylu Konica Minolta SPAD 502 (Photo courtesy of Konica Minolta, Inc. All rights reserved) a vpravo – přístroj Opti-Sciences CCM-300 (foto: Rostislav Linda).



Obr. 2: Nejpoužívanější přístroje pro měření fluorescence chlorofylu; Hansatech FMS2 a model Pocket PEA stejného výrobce nahoře (© Hansatech Instruments Ltd), přístroj firmy Opti-Sciences OS30p+ dole (foto: Rostislav Linda).

2009), což je pro semenáčky zkoumaných jehličnanů (SM, JD, BO) taktéž nepoužitelné, či na hranici použitelnosti s rizikem vysoké nepřesnosti výsledků.

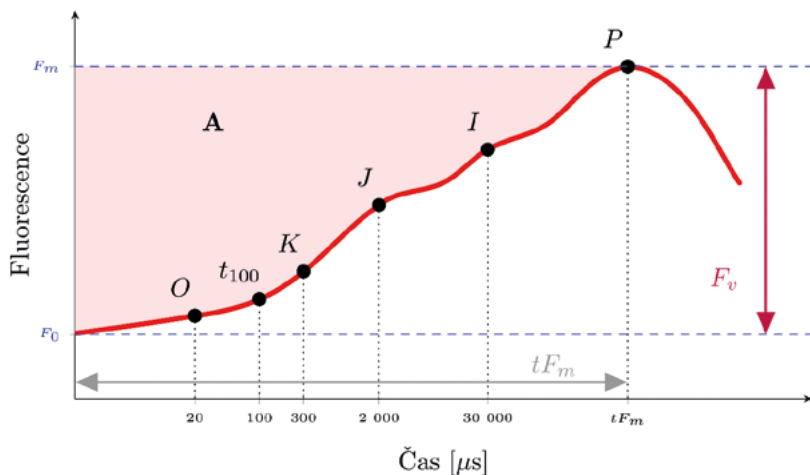
V případě přenosných fluorometrů (přístrojů určených k měření fluorescence chlorofylu) jsou mimo produktů firmy Opti-Sciences rozšířené přístroje firmy Hansatech (např. Pocket PEA či model FMS 2), PSI (FluorPen) či WALZ (model PAM-2500). Jednotlivé modely se liší vestavěnými funkcemi, softwarovou výbavou, technickým zpracováním či jinými parametry (více informací v manuálech k příslušným přístrojům), avšak všechny tyto popisované modely umožňují měřit nejpoužívanější charakteristiku fluorescence chlorofylu, kterou je poměr označovaný Fv/Fm (vysvětleno v následující kapitole) a většina z přístrojů podporuje taktéž tzv. *OJIP* protokol (taktéž viz dále).

2.2 Teoretická východiska měření fluorescence chlorofylu

Zelené rostliny obsahují ve svých buňkách různé typy barviv, přičemž každé z nich má pro rostlinu specifickou funkci. Nejvýznamnějším z těchto barviv je barvivo zelené – chlorofyl. Chlorofyl je v rámci rostlinné buňky uložen v chloroplastech, buněčných organelách čočkovitého tvaru o velikosti asi 2–5 μm . Význam chloroplastů, potažmo chlorofylu je úzce spojen s procesem fotosyntézy. Zelené barvivo se vyznačuje schopností pohlcovat sluneční záření a přeměnit ho v energii, kterou rostlina dále ukládá do zásobních látek, zejména sacharidů.

Počátkem světelné fáze fotosyntézy je zachycení fotonu a jeho přeměna v reakčních centrech Fotosystému II. Přenos energie je možný pouze tehdy, pokud skutečně dojde ke kontaktu fotonu s reakčním centrem. V opačném případě je energie fotonu přeměněna na teplo, či vyzářena zpět do prostoru (fluorescence). Množství, resp. intenzita fluorescence je tak přímo závislá na aktuálním stavu Fotosystému II (Ke, 2003). Fluorescence chlorofylu je proto vhodným prostředkem ke studiu aktuálního stavu Fotosystému II v rostlinách a přeneseně i ke zjišťování zdravotního stavu rostlin, jelikož právě poškození Fotosystému II je často spolehlivým ukazatelem vystavení rostliny stresovým podmínkám (Lichtenthaler, 1996).

Pokud jsou reakční centra Fotosystému II vystavena světelnému záření, dochází k postupnému nasycení reakčních center fotony, která jsou do doby, než přemění přijatý foton na elektron uzavřena. S poklesem dostupných reakčních center dochází ke zvyšování zpětně emitovaného (fluorescenčního) záření. Charakteristická změna v intenzitě fluorescence po krátkodobém intenzivním osvětlení chlorofylu se nazývá *Kautského efekt* (Maxwell & Johnson, 2000; Ritchie & Landis, 2005), viz Obrázek 3.



Obr. 3: Charakteristická změna fluorescence chlorofylu po vystavení reakčních center Fotosystému II krátkodobému intenzivnímu záření. Při tomto jevu dochází k nárazovému zvýšení fluorescenční aktivity chlorofylu, která v určitém čase vrcholí (dochází k nasycení Fotosystému II).

Vysvětlivky ke značkám na Obrázku 3:

- F_0 – fluorescence chlorofylu při nízkém osvětlení, tzn. při úrovni osvětlení, která ještě neiniculuje proces fotosyntézy
- F_m – maximální fluorescence chlorofylu, tj. při plném nasycení Fotosystému II
- F_v – variabilní fluorescence, vypočítaná jako $F_m - F_0$
- tF_m – čas k dosažení F_m
- O – úroveň fluorescence v čase 20 μs
- t_{100} – úroveň fluorescence v čase 100 μs
- K – úroveň fluorescence v čase 300 μs
- J – úroveň fluorescence v čase 2 000 μs
- I – úroveň fluorescence v čase 30 000 μs
- P – maximální úroveň fluorescence, $P = F_m$
- A – plocha nad fluorescenční křivkou

Z těchto parametrů jsou následně odvozeny další, uplatňované např. i v této metodice, které jsou široce používány pro detekci nejrozličnějších typů fyziologického stresu rostlin. Přesný popis využití jednotlivých parametrů je uveden v následujících kapitolách.

Naměřené hodnoty fluorescence chlorofylu (a tedy i koncentrace chlorofylu, jelikož je odvozena pomocí fluorescenční aktivity vzorku) se mohou lišit mezi rubovou a lícovou stranou listu (Cordón & Lagorio, 2007). Pro zachování konzistentnosti naměřených výsledků byla veškerá měření uvedená v této metodice provedena na **lícové straně listů**.

2.3 Měření koncentrace chlorofylu přenosnými přístroji

Přenosné přístroje určené k měření obsahu (koncentrace) či fluorescence chlorofylu nabízejí jednoduché a rychlé použití za cenu nižší přesnosti v porovnání s laboratorními metodami. V obou případech probíhá měření na listu, který se vloží do měřicí hlavy či měřicího kolíku a samotné měření se jednoduše provede stiskem příslušného tlačítka či automaticky po uzavření kolíku (v případě přístroje SPAD 502). Podrobnější informace poskytují návody k příslušným přístrojům.

Měření obsahu chlorofylu lze provést bez předchozí adaptace vzorku na tmu, návody k příslušným zařízením však uvádějí nutnost měření ve stínu (resp. nedoporučují provádět měření na přímém slunci).

2.3.1 Interpretace výstupních hodnot přístroje SPAD 502

Výstupní hodnotou je v případě přístroje SPAD 502 tzv. SPAD hodnota (Spectrum Technologies Inc., 2009), jejíž základem je poměr vzorkem propuštěného světla o vlnových délkách měřených přístrojem, tj. 940 a 650 nm (Parry et al., 2014).

Pro odhad skutečné hodnoty **obsahu** chlorofylu (v **mg/g** hmotnosti čerstvého vzorku) lze pro naše nejběžnější listnáče hospodářských porostů (u jehličnanů je použití tohoto přístroje problematické) použít např. funkce definované ve studiích Percivala et al. (2008) a Uddlinga et al. (2007), a to

pro buk lesní (*Fagus sylvatica*):

$$\text{Chl}_o = -0,0029 \times \text{SPAD}^2 + 1,175 \times \text{SPAD} + 3,8506, \quad (1)$$

pro dub letní (*Quercus robur*):

$$\text{Chl}_o = 1,8159 \times \text{SPAD}^{0.8809}, \quad (2)$$

pro břízu bělokorou (*Betula pendula*):

$$\text{Chl}_o = 0,363 \times e^{0,0452 \times \text{SPAD}}, \quad (3)$$

pro javor klen (*Acer pseudoplatanus*):

$$\text{Chl}_o = 0,0075 \times \text{SPAD}^2 + 0,998 \times \text{SPAD} - 0,4916, \quad (4)$$

kde Chl_o značí **obsah** chlorofylu v **mg/g** hmotnosti čerstvého vzorku a SPAD hodnotu měřenou přístrojem SPAD 502.

V případě potřeby odhadu **koncentrace** chlorofylu (v $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ listové plochy či podobných jednotkách) lze použít funkci navrženou ve studii Cerovice et al. (2012) ve tvaru

$$\text{Chl}_k = \frac{99 \times \text{SPAD}}{144 - \text{SPAD}}, \quad (5)$$

kde Chl_k značí **koncentraci** chlorofylu v $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ listové plochy a SPAD hodnotu měřenou přístrojem SPAD 502¹.

Přesnost uvedeného vzorce pro výpočet koncentrace chlorofylu lze demonstrovat metastudií příslušných publikací (Uddling et al., 2007; Cerovic et al., 2012) za použití břízy jako referenčního druhu (viz Obrázek 4).

Z grafu (Obr. 4) je patrná vysoká přesnost funkce (5), zejména v hodnotách mezi 15 a 35 jednotkami SPAD, které jsou obvykle pro určení vitality jedince kritické (viz dále).

2.3.2 Konverze výstupů přístroje CCM-200 a SPAD 502

Přístroj společnosti Opti-Sciences CCM-200 je taktéž rozšířeným a často používaným zařízením pro měření koncentrace chlorofylu v terénních podmínkách. Výstupem měření je tzv. *CCI* (z angl. *Chlorophyll content index*) hodnota, která je definována jako propustnost vzorku pro světlo o vlnové délce 931 nm ku propustnosti vzorku pro světlo o vlnové délce 653 nm (Parry et al., 2014).

Jelikož oba přístroje měří propustnost vzorku o téměř stejných vlnových délkách, jsou jejich výstupy v těsné korelaci, resp. hodnoty lze vzájemně převádět s velmi vysokou přesností; studie Parryho et al. (2014) uvádí koeficienty determinace $R^2 = 0,99$ a $R^2 = 0,98$, což je vzhledem k přesnosti samotných přístrojů více než do-

¹ Intuitivně lze předpokládat, že je možné převést obsah na koncentraci chlorofylu pomocí koeficientu hmotnosti listu na jednotku obsahu listové plochy (v zahraniční literatuře označovaná jako *Leaf mass per area*, zkr. *LMA*). Četné studie, např. Scartazza et al. (2016) však uvádí, že tato hodnota je velmi variabilní, a to i v rámci porostu/jedinců. Zobecnění hodnoty *LMA* je tedy problematické, a to i kvůli pravděpodobné korelaci SPAD hodnoty a *LMA*. Z uvedených faktů vyplývá, že převod pomocí *LMA* lze provést pouze, pokud je tato hodnota známa pro konkrétní měřené jedince.

stačující. Samotné převodní rovnice dle Parryho et al. (2014) jsou v následujícím tvaru:

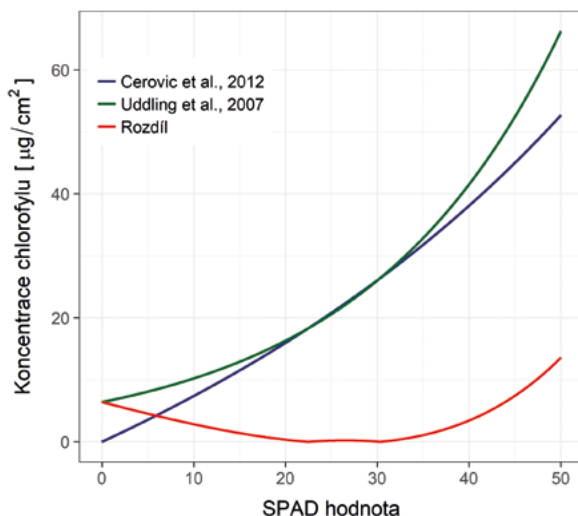
$$CCI = 1 + 0,00119 \times SPAD^{2,67} \quad (6)$$

resp.

$$SPAD = -42,9 + 42,1 \times CCI^{0,215}. \quad (7)$$

Kombinací rovnic (7) a (5) pak lze vytvořit předpis pro odhad koncentrace chlorofylu pomocí CCI hodnoty (v $\mu\text{g}/\text{cm}^2$):

$$\text{Chl}_k = \frac{99 \times (-42,9 + 42,1 \times CCI^{0,215})}{144 + (42,9 - 42,1 \times CCI^{0,215})}. \quad (8)$$

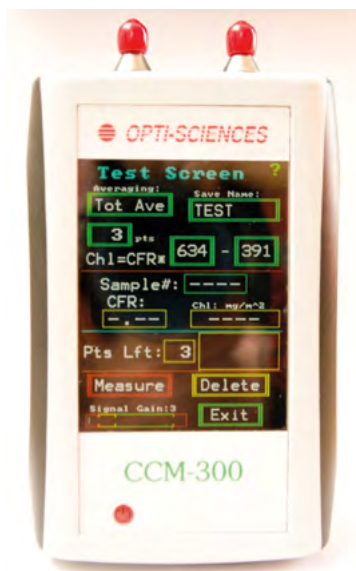


Obr. 4: Evaluace přesnosti funkce Cerovice et al. (2012) pro výpočet koncentrace chlorofylu pomocí SPAD hodnot. Jako srovnávací druh byla použita bříza bělokorá a příslušná odvozená funkce ve studii Uddlinga et al. (2007).

2.3.3 Použití a interpretace výstupů přístroje CCM-300

Zatímco oba výše zmíněné přístroje využívají pro odhad koncentrace chlorofylu optickou hustotu vzorku, přístroj CCM-300 využívá fluorescenci chlorofylu, přesněji emisi fluorescenčního světla o vlnové délce 735 nm ku emisi fluorescenčního světla o vlnové délce 700 nm (tento poměr je dále označován jako $F_{735/700}$).

Popsaný způsob odhadu koncentrace chlorofylu je použitelný i pro situace, kdy je aplikace předchozích přístrojů problematická, například pro **listy jehličnanů** či **velmi**



Obr. 5: Základní měřicí obrazovka přístroje CCM-300. V horní části obrazovky lze zvolit průměrování výsledků spolu s počtem měření pro výpočet průměru, název souboru pro uložení hodnot a dále koeficienty převodní rovnice pro odhad koncentrace chlorofylu. Ve střední části obrazovky nalezneme hodnotu $F_{735/700}$ označenou jako CFR (z angl. Chlorophyll fluorescence ratio), hodnotu koncentrace vypočtenou dle rovnice výše a číslo vzorku. Spodní část obrazovky nabízí informaci o počtu zbývajících měření pro výpočet průměru, tlačítka pro měření a odstranění posledního záznamu, nastavení síly signálu a tlačítko pro odchod do hlavního menu. Přístroj je vybaven dotykovou obrazovkou a výběr tlačítka tak probíhá pomocí stisku aktivního segmentu obrazovky (foto: Rostislav Linda).

malé lístky listnatých stromů aj. Jelikož zde nedochází k měření optické propustnosti vzorku, vzorek nemusí pokrývat celou plochu měřicí sondy, měření navíc probíhá na stejné straně listu, na kterou dopadá modré světlo vysílané přístrojem, což dle výrobce umožňuje měřit například koncentraci chlorofylu v asimilačním aparátu mechů a lišejníků (Opti-Sciences Inc.) – to však pro použití v lesních školkách nepřináší podstatnou výhodu.

Přístroj automaticky přepočítává primární data (hodnotu $F_{735/700}$) na koncentraci chlorofylu. Ve výchozím nastavení je používána rovnice Gitelsona et al. (1999), kterou však lze uživatelsky upravovat. Měření je dle stejné studie přesné v rozsahu 41–675 mg chlorofylu na čtvereční metr listové plochy.

Přístroj kromě jiných nastavení nabízí na základní měřicí obrazovce několik možností průměrování dat, volbu názvu souboru, ve kterém budou výsledné hodnoty uloženy (ve formátu *.csv), a již zmíněnou možnost úpravy koeficientů převodní rovnice. Přístroj při každém spuštění nabídne možnost kalibrace (která je velmi doporučena) pomocí přiloženého fialového filtru.

Měření pak probíhá nastavením síly signálu (Signal gain, na stupnici 1–5, vyšší číslo značí větší sílu signálu) tak, aby byl příslušný ukazatel v zeleném poli, a stiskem tlačítka (aktivního segmentu obrazovky) „Measure“.

3 MĚŘENÍ FLUORESCENCE CHLOROFYLU PŘENOSNÝMI PŘÍSTROJI

Na rozdíl od uvedených přístrojů měřících obsah/koncentraci chlorofylu se princip měření fluorescence chlorofylu mezi srovnávanými fluorometry (OS30p+; FMS2; Pocket PEA) nijak výrazně neliší, měření je tedy při použití různých zařízení obdobné. Pro účely identifikace fyziologického stresu sadebního materiálu je v této metodice ve většině případů použit standardní protokol *Fv/Fm*, který se vyznačuje vysokou robustností a schopností detekovat různé druhy stresu v podmínkách lesních školek. Velkou výhodou tohoto ukazatele je jeho téměř absolutní nezávislost na ročním období či denní době (Ritchie & Landis, 2005; Ritchie, 2006). *OJIP* protokol je pro potřeby této metodiky využíván pouze v jednom případě, a to jako potenciální ukazatel stresu vyvolaného necílovým zasažením semenáčku/sazenice herbicidy.

3.1 Adaptace vzorků na tmu před měřením

Měření pomocí obou zde popisovaných metod (*Fv/Fm*, *OJIP*) je zpravidla prováděno po předchozí adaptaci vzorku na tmu. Ta je nejčastěji prováděna pomocí speciální svorky dodávané s přístrojem či ponecháním a následným měřením vzorků v zatemněné místnosti.

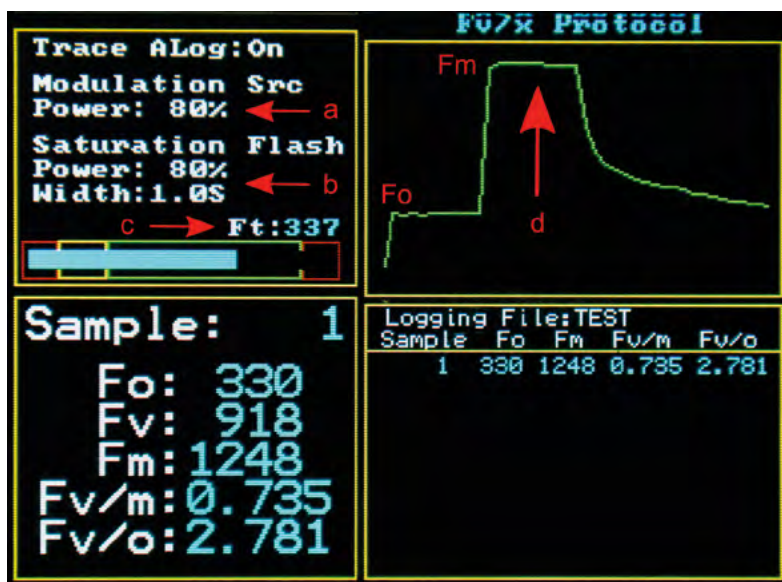
Účelem adaptace na tmu je standardizace výchozího stavu vzorku, respektive uvedení Fotosystému II do stavu, kdy jsou jeho reakční centra „otevřena“, a tedy schopna na základě excitace fotonem světla předat elektron primárnímu akceptoru (Q_A). Během ozáření chlorofylu světlem dochází k „uzavírání“ reakčních center Fotosystému II, která nejsou v daném okamžiku schopna předat další elektron, dokud není primární akceptor volný pro další elektron, respektive nepředal elektron sekundárnímu akceptoru (Q_B). Postupným uzavíráním reakčních center stoupá podíl fotonů vyzářených zpět do prostoru – fluorescence, jelikož reakční centra nejsou dostupná pro přenos energie.

3.2 Použití přístroje Opti-Sciences OS30p+

U přístroje OS30p+ se měření, podobně jako u jiných přístrojů, provádí pomocí svorky pro adaptaci vzorku na tmu. Ten se jednoduše nasadí na vzorek a posuvnou částí svorky se vzorek zatemní. Dle manuálu k přístroji by doba adaptace na tmu měla být cca 30 minut.

Ještě před samotným měřením je provedena automatická kalibrace, kdy se namíří sondou přístroje směrem k zemi, sundá se měřicí svorka a příslušným tlačítkem potvrdí kalibrace. Tento proces trvá řádově jednotky sekund.

Po uplynutí doby pro adaptaci vzorku na tmu a úspěšné kalibraci přístroje se nasune sonda přístroje do otvoru ve svorce, otevře se zatemňovací kryt svorky a na pří-



Obr. 6: Ukázka měřicí obrazovky při správně provedeném měření. Ukazatel síly modulovaného osvětlení (a) se nachází v zeleném poli (c) a saturační pulz (b) je nastaven na dostatečnou intenzitu i čas působení pro plnou saturaci Fotosystému II (d). Červený text a šipky jsou do obrázku doplněny pro ilustraci (foto: Rostislav Linda).

slušné obrazovce se provádí měření. Při správně provedeném měření se zobrazí výsledek a také graf charakteristického tvaru, viz Obrázek 6.

Přístroj umožňuje v protokolu *Fv/Fm* nastavení 3 parametrů: „*Modulation Src*“ (a), „*Saturation Flash*“ (b) a „*Width*“. Nastavení se provádí výběrem příslušné kolonky po stisku tlačítka „Menu“.

Nastavení síly modulovaného zdroje světla („*Modulation Src*“):

Přístroj umožňuje nastavení síly modulovaného světla v rozsahu 10–100 %. Správnost aktuálního nastavení se ověřuje pomocí hodnoty *Ft* (Obrázek 6, ozn. „c“), jejíž ukazatel je při správně zvolené hodnotě v zeleném poli ukazatele. Pokud se ukazatel nachází v levém červeném poli, je zvolená hodnota příliš nízká, a naopak. Vysokou nastavenou hodnotu modulovaného světla značí taktéž zvyšující se hodnota *Ft* při nasazeném vzorku na sondu během cca 30 sekund.

Nastavení saturačního pulzu („*Saturation Flash*“):

Síla saturačního pulzu se taktéž nastavuje v rozmezí 10–100 %. Správnost nastavení značí plochá část grafu (Obrázek 6, ozn. „d“). Takto tvarovaný úsek grafu značí, že došlo k plné saturaci Fotosystému II a pulz je tak nastaven na dostatečně vysokou hodnotu. Při nízké nastavené hodnotě saturačního pulzu má zmiňovaný úsek tvar špičky. Pro veškerá měření pro tvorbu této metodiky se ukázalo jako vhodné nastavení na 50 %.

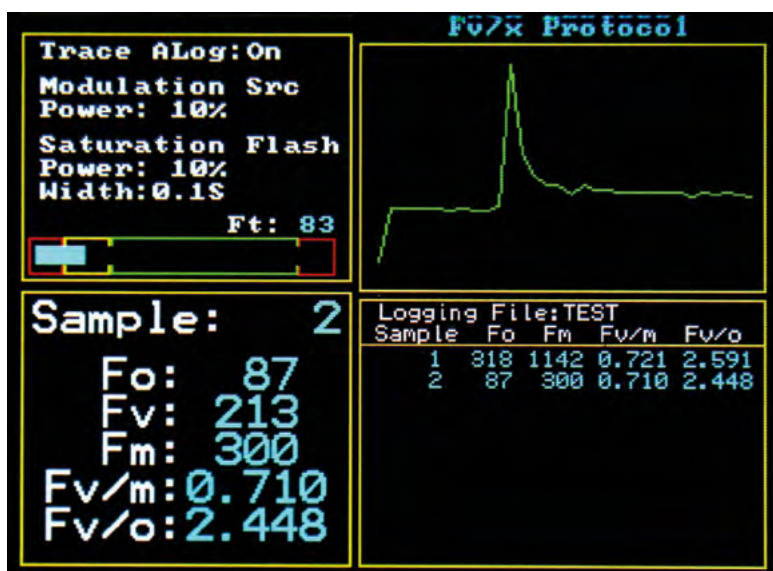
Nastavení doby saturace („*Saturation Width*“):

Dobu saturace (osvit saturačním světlem) lze nastavit v rozmezí 0,1–1,5 sekund. Nízká hodnota se projevuje stejně jako v případě nastavení saturačního pulzu. Veškerá měření pro tvorbu této metodiky byla provedena s nastavením na 1 s, stejně jako doporučuje manuál k přístroji.

V případě použití OJIP protokolu lze nastavit sílu modulačního osvětlení podobně jako v předchozím případě (v rozmezí 30–80 %), dále intenzitu aktinového světla (ve výchozím nastavení 3 500 μmol) a dobu expozice vzorku (ve výchozím nastavení 3 s). Pro testování OJIP protokolu pro tuto metodiku se tato nastavení ukázala jako vhodná pro všechny takto analyzované vzorky. Více informací o nastavení zmíněných parametrů popisuje např. Ralph & Gademann (2005).

3.3 Odpověď fluorescence chlorofylu na stres

Četné studie publikované v minulosti ukazují na možnost identifikace různých stresových faktorů dle fluorescence chlorofylu. Klíčovým parametrem je v mnoha případech poměr F_v/F_m , jehož velikost může pomoci detekovat fyziologický stres, avšak bez ohledu na jeho příčinu. Výhodou je rychlost změny tohoto parametru, ke které po vyvolání stresových podmínek dochází rychle, řádově v jednotkách minut až hodin, výjimečně dnů v závislosti na aktuální intenzitě stresu a druhu stresoru. Při rychlém, intenzivním šoku způsobujícím destrukci fotosyntetického aparátu je odpověď okamžitá.



Obr. 7: Ukázka chybného nastavení parametrů měření. Síla modulovaného osvětlení je nastavena na nízkou hodnotu (ukazatel F_t není v zeleném poli) a saturační pulz je nastaven na příliš nízkou hodnotu intenzity i času působení – graf má charakteristický špičatý tvar, který značí nedostatečnou saturaci Fotosystému II (foto: Rostislav Linda).

Nejdůležitější stresory identifikovatelné měřením fluorescence chlorofylu jsou:

a) sucho

Stres suchem je pomocí poměru F_v/F_m detekovatelný, až pokud dosáhne relativně vysoké intenzity (Flexas et al., 2000; Da Silva & Arrabaça, 2004; Mauer & Houšková, 2017), nicméně v případě, že je sucho navíc doprovázeno vysokými teplotami, je možné tento typ stresu určit dle hodnoty F_v/F_m spolehlivě (Templer et al., 2017). Kombinace stresu suchem a mrazem byla pro účely vytvoření této metodiky testována v klimatizovaných růstových komorách, viz dále.

b) nedostatek světla

Stres nedostatkem světla není v podmínkách lesních školek reálnou hrozbou, nicméně jeho projev je dobře detekovatelný poklesem hodnoty F_v/F_m (Adams & Demmig-Adams, 2004).

c) vysoké a nízké teploty

U našich druhů stromů lze očekávat, že se vysoké teploty na parametru F_v/F_m projevují, až když dosáhnou cca 40 °C a více, jak ukazuje například pokus Haldimanna & Felleri (2004) na dubu pýřitém. Podobné výsledky ukazují studie na polních plodinách (Havaux, 1995; Crafts-Brandner & Law, 2000).

Naopak, stres vyvolaný nízkými teplotami je možné detekovat relativně dobře, což dokládá kupříkladu studie Öquist & Huner (1991) provedená na semenáčcích borovice lesní, či studie Adamse et al. (1995) provedená na 7 druzích rostlin včetně douglasky tisolisté či borovice těžké. Odpověď fluorescence chlorofylu (parametru F_v/F_m) na stres nízkými teplotami byla ověřena v rámci této metodiky na vybraných druzích: smrku ztepilém (SM), borovici lesní (BO), jedli bělokoré (JD), buku lesním (BK) a dubu letním (DB) se stejnými výsledky.

d) nedostatek živin

V minulosti byly publikovány studie ukazující na odezvu parametrů chlorofylu na stres nedostatkem živin zejména na polních plodinách, poklesem hodnoty F_v/F_m se projevil stres nedostatkem hořčíku na řepě obecné (Hermans et al., 2004), na rajčatech byl pozorován pokles této hodnoty důsledkem nedostatku fosforu (Starck et al., 2000). Pro identifikaci stresu nedostatkem dusíku či síry je vhodnější použít měření koncentrace chlorofylu v asimilačních orgánech, viz dále.

e) poškození herbicidy

Poškození herbicidy bylo pozorováno u různých plodin zejména na změně hodnoty V_j [odvození parametru V_j viz např. Živčák et al. (2008)] při měření pomocí OJIP protokolu (Nedbal et al., 2000; Hiraki et al., 2003; Christensen et al., 2003).

Pro vytvoření této metodiky byla sledována odpověď parametru V_j na sazenicích výše zmíněných druhů po aplikaci glyfosátu. Efekt zvýšení této hodnoty se v provedeném experimentu potvrdil pouze u listnáčů (DB, BK), přičemž lze říci, že **poškození glyfosátem lze brát v úvahu při zvýšení hodnoty V_j nad cca 0,35**.

V našich podmínkách jsou nejvýznamnějšími abiotickými faktory ohrožujícími vitalitu sadebního materiálu v lesních školkách nedostatek vody a případný mrazový šok. Uvedené stresory byly pro účely vytvoření této metodiky testovány v simulovaném prostředí růstových komor – pro odhalení stresu byla sledována hodnota F_v/F_m na našich nejvýznamnějších dřevinách (SM, BO, JD, BK, DB). Tyto hodnoty jsou dle studií uvedených výše schopny indikovat stres u rostlin působený různými příčinami a jeví se tak jako nejuniverzálnější metoda pro detekci stresu sadebního materiálu.

Parametr F_v/F_m vykazoval statisticky významné rozdíly ($p < 0,001$ ve všech případech) mezi těmito hodnotami pro nestresované jedince a jedince stresované v růstové komoře za použití níže uvedeného programu (Tabulka 1) u všech zájmových dřevin.

Tab. 1: Nastavený program pro vyvolání stresu sadebního materiálu zájmových dřevin v podmínkách růstové komory. Vzorky byly zavlažovány nižší intenzitou, než je v lesních školkách běžné pro vyvolání výraznějšího projevu fyziologického stresu.

Č. segmentu	Popis segmentu	Trvání
1	Příprava růstové komory (temperování na 15 °C)	do 1 hodiny
2	15 °C, osvětlení cca 5 000 lx	10 dnů
3	Skokové snížení teploty na -8 °C	cca 2 hodiny
4	-8 °C, bez osvětlení	10 hodin
KONEC		

Poznámka: program byl zvolen jako krajní varianta možných teplotních změn v přírodním prostředí. Podobné teplotní změny, jaké byly nastaveny v růstové komoře, nastávají např. v mrazové kotlině osady Jizerka na přelomu dubna a května.

Hodnoty parametru F_v/F_m pro fyziologicky zdravé jedince jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tab. 2: Pozorované hodnoty parametru F_v/F_m pro zdravé jedince.

Dřevina	F_v/F_m	
	Průměr	Interval spolehlivosti (95 %)
SM	0,74	0,73 – 0,75
BO	0,815	0,80 – 0,83
JD	0,73	0,72 – 0,74
BK	0,7	0,68 – 0,72
DB	0,75	0,74 – 0,76

Poměr F_v/F_m se s narůstající intenzitou stresu snižuje, **pokles F_v/F_m pod 0,7 již zpravidla značí nastupující stresové podmínky**. Hodnoty okolo 0,6 a nižší již ukazují na přítomnost silných stresorů a poškození začíná být v mnoha případech viditelné.

3.4 Odpověď koncentrace chlorofylu na stres

V minulosti se koncentrace chlorofylu (měřená přístroji CCM-200 či SPAD 502) u některých druhů ukázala jako vhodný ukazatel stresu z nedostatku **dusíku** (např. Van Den Berg & Perkins, 2004; Ghasemi et al., 2011). Problémem je však obtížnost stanovení univerzální hodnoty, která značí nedostatek živin, a to kvůli vysoké variabilitě v měřených hodnotách v rámci jednoho jedince. Zde hraje podstatnou roli osvit/zastínění rostliny či vertikální pozice listu na sazenici, taktéž **v rámci roku je obsah/koncentrace chlorofylu v asimilačních orgánech rostlin obecně velmi variabilní** (Demarez, 1999; Dawson et al., 2003; Peng et al., 2011).

Tab. 3: Měřené hodnoty CFR přístrojem CCM-300 na zdravých sazenicích a konverze těchto hodnot na hodnoty CCI a SPAD pomocí rovnic (5) a (6). Vyznačený interval značí 95% interval spolehlivosti. U jehličnanů není možné měření hodnot CCI a SPAD z technických důvodů provést, hodnoty tak nejsou uvedeny.

Dřevina	CFR	CCI	SPAD
SM	$1,04 \pm 0,04$	–	–
BO	$1,12 \pm 0,03$	–	–
JD	$1,34 \pm 0,05$	–	–
BK	$1,28 \pm 0,03$	$28,2 \pm 2,3$	$42,9 \pm 1,4$
DB	$1,20 \pm 0,02$	$22,3 \pm 1,4$	$39,2 \pm 1,0$



Obr. 8. Různé zabarvení jehlic (zde například jedle) je spojeno s různou koncentrací chlorofylu: tmavé jehlice mají oproti světlým i více než dvakrát vyšší koncentraci. Světlé a tmavé části jsou pro ilustraci zvětšeny ve vyznačených obdélnících (foto: Rostislav Linda).

U zkoumaných jedinců nebyly zjištěny žádné pozorovatelné rozdíly mezi hodnotami CFR (tzn. obsahem chlorofylu měřeným přístrojem CCM-300) pro zdravé jedince a stejné jedince stresované nastaveným programem (Tabulka 1). Pozorované průměrné odchylky byly (v jednotkách CFR) následující: SM – 0,002; BO – 0,11; JD – 0,03; BK – 0,01; DB – 0,06. Takto nízké rozdíly nelze při vysoké variabilitě měření, která je běžná, pozorovat. Za stresové podmínky tak lze označit hodnoty výrazně nižší než uvedené v Tabulce 3 za předpokladu dlouhodobého živinového stresu, který je v podmínkách lesních školek téměř vyloučen.

4 IDENTIFIKACE MOŽNÝCH PROBLÉMŮ PŘI POUŽITÍ PŘENOSNÝCH PŘÍSTROJŮ

Následující kapitola uvádí možné komplikace, které mohou nastat při použití výše zmíněných přístrojů, přitom nenahrazuje, avšak doplňuje tak příslušné manuály k jednotlivým zařízením o praktické zkušenosti z terénních měření.

4.1 Vliv okolního světla

Manuály ke všem zmíněným přístrojům doporučují provádět měření mimo přímý zdroj světla. Při dodržení této podmínky (max. cca 8 000 lx) nebyly pro přístroje OS30p+ a CCM-300 zaznamenány významné rozdíly mezi naměřenými hodnotami v závislosti na intenzitě okolního osvětlení. Pokud jsou měřené hodnoty předmětem další analýzy naměřených dat, lze **doporučit provádět měření ve stejných podmínkách v průběhu celého pokusu** pro zachování konzistentnosti výsledků. V případě měření fluorescence je toto doporučení samozřejmě platné pouze v případě použití zatemňovacích svorek, v žádném případě nesmí dojít k expozici měřené části listu před měřením (musí dojít k plné adaptaci měřené části na tmu), například pokud je adaptace na tmu prováděna přemístěním celých stromků do temné místnosti.

4.2 Přesnost a variabilita měřených hodnot

V případě měření fluorescence chlorofylu přístrojem OS30p+ a referenčním měřením v laboratoři pomocí přístroje PSI FluorPen nebyly prokázány žádné významné rozdíly. Odchytky ve výsledných hodnotách parametru F_v/F_m jsou zanedbatelné (v řádech setin), viz Tabulka 4.

Tab. 4: Odchylyky parametru Fv/Fm mezi přístrojem OS30p+ a referenčním měřením pomocí přístroje PSI FluorPen.

Dřevina	Průměrná odchylka Fv/Fm	Max. odchylka (prav. 95 %)
SM	0,06	0,073
BO	0,02	0,034
JD	0,05	0,064
BK	0,02	0,036
DB	0,04	0,046
CELKEM	0,038	0,044

Pro určení obsahu chlorofylu v asimilačních orgánech sadebního materiálu se při použití přístroje CCM-300 používá rovnice dle Gitelsona et al. (1999) ve tvaru

$$Chl_k \text{ [mg/m}^2\text{]} = 634 \times \text{CFR} - 391, \quad (9)$$

která je v přístroji ve výchozím stavu přednastavena, přístroj CCM-300 však nabízí uživatelskou úpravu koeficientů lineární rovnice. Tabulka níže uvádí doporučená nastavení pro dřeviny používané v této metodice; příslušné hodnoty byly stanoveny pomocí kalibrace lineární rovnice dle referenčního měření spektrofotometrickou metodou v laboratoři.

Tab. 5: Doporučené hodnoty pro nastavení převodní rovnice pro výpočet koncentrace chlorofylu pomocí CFR hodnoty měřené přístrojem CCM-300.

Dřevina	Doporučené nastavení	Průměrná odchylka [mg/m ²]	Max. odchylka měření [mg/m ² ; prav. 95 %]
SM	868 x CFR – 702	89	111
BO	151 x CFR – 4	17	23
JD	453 x CFR – 273	38	70
BK	202 x CFR – 46	29	36
DB	460 x CFR – 321	38	49

Hodnoty koeficientů determinace se zde pohybují cca okolo 0,6, což je výrazně méně oproti hodnotám uváděným v práci Gitelsona et al. (1999), kde jsou uváděny hodnoty vyšší než 0,95. Nejmenší přesnost byla pozorována u smrku, to je však způsobeno vysokou hodnotou směrnice přímky, kdy i nejmenší odchyly v zaznamenaném CFR poměru způsobují relativně vysoké odchyly v přepočítané

koncentraci chlorofylu. Nejnižší hodnota koeficientu determinace byla pozorována u borovice ($R^2 = 0,45$), nicméně díky nízké hodnotě směrnice přímký je celková chybovost velice malá.

Obsah (či koncentrace) chlorofylu je kromě abiotických činitelů výrazně ovlivňována ročním obdobím. Hodnoty uvedené v tabulkách 3 a 5 tak platí pro období, kdy je obsah chlorofylu v rámci roku nejvyšší (cca od poloviny června do poloviny srpna) (Demarez, 1999; Dawson et al., 2003).

V případě stanovení koncentrace i fluorescence chlorofylu přenosnými přístroji je vhodné provádět měření na více částech dané sazenice/semenáčku a tyto hodnoty následně průměrovat. V případě fluorescence chlorofylu (pomocí které je stanovována i koncentrace chlorofylu) mohou být mezi jednotlivými částmi rostliny nezanedbatelné rozdíly. Pro ilustraci rozdělení fluorescence chlorofylu mezi letorosty viz příloha.

4.3 Adaptace na tmu

Měření fluorescence chlorofylu pomocí F_v/F_m či *OJIP* protokolu vyžaduje předchozí adaptaci vzorku na tmu. Tu lze provést pomocí zatemňovacích svorek dodaných s přístrojem či jiným způsobem, nicméně je důležité ponechat vzorky v úplné tmě minimálně 30 minut. V případě potřeby analýzy velkého množství vzorků je možné adaptaci na tmu provádět v zatemněné místnosti, avšak je nutné dbát zvýšené opatrnosti, aby nedošlo k osvětlení vzorků např. při vstupu do místnosti. V případě, že budou naměřená data využita k dalším analýzám, je **nutné dodržovat stejnou dobu adaptace na tmu v průběhu experimentu**.

U některých druhů, zejména jehličnanů (v našem případě platí pro borovici lesní) se může vyskytnout problém s nedovřením zatemňovací svorky z důvodu vysokého profilu jehlice s relativně vysokou tvrdostí. Svorka poté není světlotěsná. V takovém případě je vhodné vzorek ve svorce lehce zmáčknout a zkontrolovat případný vnik světla do svorky.

5 DOPORUČENÝ POSTUP

Tato závěrečná kapitola zjednodušeně uvádí doporučený postup při měření parametrů chlorofylu a identifikaci potenciálních stresových podmínek a shrnuje tak výše uvedené poznatky doplněné o zkušenosti autorů této metodiky.

Pro zjištění zdravotního stavu sazenic a semenáčků v lesních školkách je vhodné používat měření obou zmíněných parametrů, tzn. fluorescence i koncentrace chlorofylu v listech jedinců. Vzhledem k univerzálnosti je vhodné začít s měřením fluorescence chlorofylu pomocí F_v/F_m protokolu.

Měření fluorescence i obsahu (koncentrace) chlorofylu je vhodné provádět 3×, lépe 5× na jednom vzorku (na různých místech) a analyzovat průměrnou hodnotu pro každého jedince. Měření fluorescence se provádí po min. 30 minutách adaptace na tmu, koncentrace chlorofylu je měřena bez předchozí adaptace. Měření není vhodné provádět na přímém slunci.

$F_v/F_m > 0,7$ a není podezření na poškození herbicidy:

Analýzovaný vzorek netrpí v důsledku nedostatku vody, světla či extrémními teplotami a lze jej považovat za vitální.

$F_v/F_m > 0,7$ a existuje podezření na poškození herbicidy:

V případě podezření na poškození herbicidy je vhodné provést test znovu pomocí *OJIP* protokolu. Po provedení měření je nutné vzorek znovu adaptovat na tmu. Stres aplikací herbicidů je pravděpodobný, pokud **parametr V_j přesáhne hodnotu 0,35**.

$F_v/F_m < 0,7$:

Sadební materiál je stresován vysokými či nízkými teplotami, nedostatkem zálivky či kombinací zmíněných stresorů. Konkrétní případ lze identifikovat vylučovací metodou. V případě možnosti vyloučení všech negativních vlivů lze provést test na stres herbicidy, viz výše. Pokud jsou všechny možnosti vyloučeny a sadební materiál je viditelně poškozen, přejdeme k měření koncentrace chlorofylu.

Pokud jsou při měření obsahu (koncentrace) chlorofylu na vzorkách zjištěny výrazně nižší hodnoty než uvedené v Tabulce 3:

U jedinců je pravděpodobně vyvolán stres dlouhodobým nedostatkem živin.

6 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Tato metodika popisuje možnost kvantifikace fyziologické kvality sadebního materiálu v lesních školkách nad rámec vlastností uvedených v ČSN 48 2115. Měření obsahu a fluorescence chlorofylu může poskytovat cenné informace o zdravotním stavu sadebního materiálu přímo ve školkařském provozu, popřípadě po vysazení sadebního materiálu na cílovou lokalitu.

Ačkoliv existuje poměrně velké množství studií s tematikou měření parametrů chlorofylu, využití těchto měření v lesních školkách je dokumentováno pouze velmi omezeně. Předkládaná práce je první metodickou publikací komplexně shrnující použití přenosných přístrojů včetně interpretace výsledků pro sadební materiál našich nejpoužívanějších dřevin s důrazem na praktické využití přístrojů v terénních podmínkách.

7 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Primárním uživatelem metodiky bude spoluřešitel projektu, díky jehož podpoře tato metodika vznikla, tzn. společnost Suchopýr z. s., a také hlavní řešitel projektu – Česká zemědělská univerzita v Praze. Praktické poznatky shrnuté v této publikaci budou taktéž zapojeny do výuky na Fakultě lesnické a dřevařské ČZU v Praze.

V budoucnu se díky obecnému popisu zjišťování fyziologické kvality sadebního materiálu pomocí měření parametrů chlorofylu mohou stát uživateli této metodiky veškeré školkařské provozy v ČR, jelikož použité metody lze uplatnit obecně, či by se uvedené postupy mohly stát součástí školkařské kontroly VÚLHM, VS Opočno.

8 EKONOMICKÉ ASPEKTY UPLATNĚNÍ METODIKY

Kvalitní sadební materiál je jedním ze základních předpokladů úspěšné obnovy lesa a je tak nenahraditelným článkem v ekonomickém cyklu hospodaření s lesem. Průběžné zjišťování fyziologické kvality sadebního materiálu a případná identifikace stresových podmínek přináší velkou výhodu pro školkaře, kteří mohou vhodným zásahem zabránit jeho dalšímu poškozování.

Ačkoliv jsou abiotické faktory v lesních školkách z části kontrolovány personálem, při náhlé změně podmínek může dojít k fyziologickému stresu např. mrazovým poškozením či nechtěnou aplikací herbicidů, přičemž známky stresu nemusí být na pohled patrné. Včasná identifikace stresových podmínek může pomoci zabránit většímu poškození či úhynu sadebního materiálu, a eliminovat tak značné ekonomické ztráty.

Testování fyziologické kvality sazenic neopadavých dřevin při přejímce sadebního materiálu v rámci expedice z lesní školky nebo po přepravě na lesní stanoviště navíc může předejít sporům školkařů s odběrateli, zda je za ztráty odpovědný producent, anebo zda byly ztráty způsobeny porušením technologických postupů či klimatickými podmínkami po výsadbě na stanoviště. Bez objektivního testování jsou příčiny úhynu sazenic těžko prokazatelné.

V případě včasné identifikace stresových podmínek v lesních školkách (např. mrazového poškození) i v případě kontroly fyziologické kvality sadebního materiálu neopadavých dřevin před výsadbou se mohou ztráty snížit až o cca 20 % celkového množství sadebního materiálu. Orientační cena sazenic se pohybuje u prostokořenného sadebního materiálu smrku (velikost 26–35 cm) okolo 6 500,- Kč/tisíc sazenic, u buku stejné velikosti okolo 6 900,- Kč/tisíc sazenic. Pokud budeme uvažovat zmíněné 20% úspory a objem 500 000 kusů (expedice menší až středně velké lesní školky), jedná se již o ztrátu 100 000 kusů sazenic v celkové hodnotě 650 000–690 000,- Kč. Další ekonomické ztráty se přičítají při výsadbě, kdy se cena práce pohybuje okolo 6 000,- Kč za výsadbu tisíce sazenic, což při počtu zmíněných 100 000 kusů znamená ztrátu dalších 600 000,- Kč. Současně při aktuálním nedostatku pracovníků pro pěstební činnost a poklesu cen dříví je žádoucí, aby stávající kapacity i příjmy byly co nejefektivněji využity.

Z výše uvedeného vyplývá, že testování sazenic při expedici ze školky nebo naopak přejímce před výsadbou může znamenat úspory v řádu statisíců korun, a to zejména v současných klimatických podmínkách, které jsou pro produkci i využití prostokořenného sadebního materiálu velmi nepříznivé.

Náklady na měření jsou v případě pořízení vlastních přístrojů okolo 200 000,- Kč v závislosti na typu zakoupených přístrojů, které jsou pak použitelné mnoho let. Jednorázově lze využít služeb některé z laboratoří, které mohou požadované parametry změřit za cca 70,- Kč/vzorek.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adams WW & Demmig-Adams B (2004) Chlorophyll fluorescence as a tool to monitor plant response to the environment. Chlorophyll a fluorescence. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 583–604.
- Adams WI, Demmig-Adams B, Verhoeven A & Barker D (1995) “Photoinhibition” during winter stress: involvement of sustained xanthophyll cycle-dependent energy dissipation. Australian Journal of Plant Physiology 22:261.
- Van Den Berg AK & Perkins TD (2004) Evaluation of a portable chlorophyll meter to estimate chlorophyll and nitrogen contents in sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) leaves. Forest Ecology and Management 200:113–117.
- Cerovic ZG, Masdoumier G, Ghazlen N Ben & Latouche G (2012) A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. Physiologia Plantarum 146:251–260.
- Christensen MG, Teicher HB & Streibig JC (2003) Linking fluorescence induction curve and biomass in herbicide screening. Pest Management Science 59:1303–1310.
- Cordón GB & Lagorio MG (2007) Optical properties of the adaxial and abaxial faces of leaves. Chlorophyll fluorescence, absorption and scattering coefficients. Photochemical and Photobiological Sciences 6:873–882.
- Crafts-Brandner SJ & Law RD (2000) Effect of heat stress on the inhibition and recovery of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation state. Planta 212:67–74.
- Dawson TP, North PRJ, Plummer SE & Curran PJ (2003) Forest ecosystem chlorophyll content: Implications for remotely sensed estimates of net primary productivity. International Journal of Remote Sensing 24:611–617.

- Demarez V (1999) Seasonal variation of leaf chlorophyll content of a temperate forest. Inversion of the PROSPECT model. *International Journal of Remote Sensing* 20:879–894.
- Flexas J, Briantais JM, Cerovic Z, Medrano H & Moya I (2000) Steady-state and maximum chlorophyll fluorescence responses to water stress in grapevine leaves: A new remote sensing system. *Remote Sensing of Environment* 73:283–297.
- Ghasemi M, Arzani K, Yadollahi A, Ghasemi S & Sarikhani Khorrami S (2011) Estimate of leaf chlorophyll and nitrogen content in Asian pear (*Pyrus serotina* Rehd.) by CCM-200. *Notulae Scientia Biologicae* 3:91–94.
- Gitelson AA, Buschmann C & Lichtenthaler HK (1999) The chlorophyll fluorescence ratio F735/F700 as an accurate measure of the chlorophyll content in plants. *Remote Sensing of Environment* 69:296–302.
- Haldimann P & Feller U (2004) Inhibition of photosynthesis by high temperature in oak (*Quercus pubescens* L.) leaves grown under natural conditions closely correlates with a reversible heat-dependent reduction of the activation state of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant, Cell and Environment* 27:1169–1183.
- Havaux M (1995) Temperature sensitivity of the photochemical function of photosynthesis in potato (*Solanum tuberosum*) and a cultivated Andean Hybrid (*Solanum* × *juzepczukii*). *Journal of Plant Physiology* 146:47–53.
- Hermans C, Johnson GN, Strasser RJ & Verbruggen N (2004) Physiological characterisation of magnesium deficiency in sugar beet: Acclimation to low magnesium differentially affects photosystems I and II. *Planta* 220:344–355.
- Hiraki M, Rensen JJS van, Vredenberg WJ & Wakabayashi K (2003) Characterization of the alterations of the chlorophyll a fluorescence induction curve after addition of Photosystem II inhibiting herbicides. *Photosynthesis Research* 78:35–46.
- Houšková K & Mauer O (2017) Physiological and Morphological changes in young woody plants stressed by drought. In: Fialová J & Pernicová D. *Public recreation and landscape protection – with nature hand in hand*. 1. vyd. Brno: Mendel University in Brno: s. 249–259.
- Jurásek A & Martincová J (2000) Návrh národního standardu kvality sadebního materiálu. In: *Kontrola kvality reprodukčního materiálu lesních dřevin. Sborník referátů z celostátního odborného semináře s mezinárodní účastí*. Opočno, VÚLHM – Výzkumná stanice: 9–20.

- Jurásek A, Nárovcová J & Nárovec V (2012) ČSN 48 2115 – Sadební materiál lesních dřevin. Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, Strnady.
- Ke B (2001) Photosynthesis – Photobiochemistry and Photobiophysics. Dordrecht, Kluwer: 763 s.
- Knighton N & Bugbee B (2014) A comparison of opti-sciences CCM-200 chlorophyll meter and the Minolta SPAD 502 chlorophyll meter. :4–5.
- Kotrla P & Indra P (2000) Kvalita reprodukčního materiálu v praxi LČR, s. p. (využití normy a standardů sadebního materiálu, kontrola kvality v návaznosti na legislativu). In: Kontrola kvality reprodukčního materiálu lesních dřevin. Sborník referátů z celostátního odborného semináře s mezinárodní účastí reprodukčního materiálu lesních dřevin. Opočno, VÚLHM – Výzkumná stanice: 21–24.
- Krause GH & Weis E (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 42:313–349.
- Lichtenthaler HK (1996) Vegetation Stress: an Introduction to the stress concept in plants. Journal of Plant Physiology 148:4–14.
- Lokvenc T (1980) Kvalita sadebního materiálu lesních dřevin. Studijní informace - Lesnictví č. 1/80. VÚLHM, Jíloviště-Strnady.
- Lokvenc T (1984) Kvalita sadbového materiálu, její hodnocení a význam pro zalesňování. Hlavní směry v pěstování lesů. Racionalizace školkařské výroby. Skriptum pro postgraduální studium. Ed. M .Volná; Vysoká škola zemědělská v Brně, Brno: 20–30.
- Maxwell K & Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. Journal of Experimental Botany 51:659–668.
- Nedbal L, Soukupová J, Whitmarsh J & Trtílek M (2000) Postharvest imaging of chlorophyll fluorescence from lemons can be used to predict fruit quality. Photosynthetica 38:571–579.
- Opti-Sciences Inc. CCM-300 Chlorophyll Content Meter for very small leaves – Operation manual. Hudson, USA.
- Opti-Sciences Inc. CCM-200 plus Chlorophyll Content Meter operator's manual. Hudson, USA.
- Öquist G & Huner N (1991) Effects of cold acclimation on the susceptibility of photosynthesis to photoinhibition in Scots pine and in winter and spring cereals: a fluorescence analysis. Functional Ecology 5:91.

- Papageorgiou GC & Govindjee (2004) Chlorophyll a fluorescence. Dordrecht Springer: 818 s.
- Parry C, Blonquist JM & Bugbee B (2014) In situ measurement of leaf chlorophyll concentration: Analysis of the optical/absolute relationship. *Plant, Cell and Environment* 37:2508–2520.
- Peng Y, Gitelson AA, Keydan G, Rundquist DC & Moses W (2011) Remote estimation of gross primary production in maize and support for a new paradigm based on total crop chlorophyll content. *Remote Sensing of Environment* 115:978–989.
- Percival GC, Keary IP & Noviss K (2008) The potential of a chlorophyll content SPAD meter to quantify nutrient stress in foliar tissue of sycamore (*Acer pseudoplatanus*), English oak (*Quercus robur*), and European beech (*Fagus sylvatica*). *Arboriculture and Urban Forestry* 34:89–100.
- Ralph PJ & Gademann R (2005) Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquatic Botany* 82:222–237.
- Ritchie GA (2006) Chlorophyll fluorescence : what is it and what do the numbers mean ? The physiological basis of chlorophyll fluorescence. *Consultant*:34–43.
- Ritchie G & Landis TD (2005) Seedling quality tests: chlorophyll fluorescence. *USDA Forest Service Nursery Notes R6-CP-TP-1*:12–16.
- Scartazza A, Di Baccio D, Bertolotto P, Gavrichkova O & Matteucci G (2016) Investigating the European beech (*Fagus sylvatica* L.) leaf characteristics along the vertical canopy profile: Leaf structure, photosynthetic capacity, light energy dissipation and photoprotection mechanisms. *Tree Physiology* 36:1060–1076.
- Silva JM Da & Arrabaça MC (2004) Photosynthesis in the water-stressed C4 grass *Setaria sphacelata* is mainly limited by stomata with both rapidly and slowly imposed water deficits. *Physiologia Plantarum* 121:409–420.
- Spectrum Technologies Inc. (2009) SPAD 502 Plus Chlorophyll Meter Product Manual. Plainfield, USA.
- Starck Z, Niemyska B, Bogdan J & Akour Tawalbeh RN (2000) Response of tomato plants to chilling stress in association with nutrient or phosphorus starvation. *Plant and Soil* 226:99–106.
- Špulák O & Martincová J (2006) Hodnocení změn fluorescence chlorofylu smrku ztepilého na začátku jarní růstové aktivity. In: Stabilization of forest functions in biotopes disturbed by anthropogenic activity. Jíloviště Strnady, VÚLHM – VS Opočno: 425–434.

- Templer SE, Ammon A, Pscheidt D, Ciobotea O, Schuy C, McCollum C, Sonnewald U, Hanemann A, Förster J, Ordon F, von Korff M & Voll LM (2017) Metabolite profiling of barley flag leaves under drought and combined heat and drought stress reveals metabolic QTLs for metabolites associated with antioxidant defense. *Journal of Experimental Botany* 68:1697–1713.
- Uddling J, Gelang-Alfredsson J, Piikki K & Pleijel H (2007) Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynthesis Research* 91:37–46.
- Živčák M, Brestič M, Olšovská K & Slamka P (2008) Performance index as a sensitive indicator of water stress in *Triticum aestivum* L. *Plant, Soil and Environment* 54:133–139.

10 SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Nováková O, Gallo J, Baláš M, Špulák O & Kuneš I (2015) Vliv brassinosteroidů na výškový přírůst, fluorescenci chlorofylu a mortalitu sazenic smrku ztepilého a borovice lesní v podmínkách lesní školky. *Zprávy lesnického výzkumu* 60:122–129.
- Špulák O, Vítámvás J, Kacálek D & Kuneš I (2011) Fluorescence chlorofylu, chemismus a obsah fotosynteticky aktivních pigmentů listů buků vápněných do jamky. *Zprávy lesnického výzkumu* 56:301–309.

IDENTIFICATION OF PHYSIOLOGICAL STRESS OF PLANT MATERIAL OF FOREST TREE SPECIES

Summary

High-quality planting stock is essential for successful artificial forest regeneration and it is characterized by favourable genetic, physiological and morphological attributes of plants. At present, the quality control of planting stock is more frequently evaluated prior to outplanting on a forest site to avoid the use of low-quality plants and, therefore save substantial amounts of money. Moreover, it is almost impossible to perform a retrospective evaluation of vitality of plants and trace back why they failed after being planted on a forest site.

Unlike genetic properties and morphological attributes that are relatively easy to assess, physiological features (i.e. vitality) of plants are very difficult to quantify. However, it is exactly the vitality that is extremely important, since it governs the plants' successful growth.

Lowered physiological quality is often a result of more factors synergy. One of the most common problems are unfavourable conditions during storage or transportation to a site of outplanting. Reduced vitality, however, may not be visually recognizable (at least at the beginning) and could be often detected only by laboratory testing (before outplanting).

One of the options to quantify the vitality of plant material is the measuring of chlorophyll parameters (leaf chlorophyll concentration and fluorescence). The measuring of chlorophyll parameters provides quick, reliable, non-invasive method for evaluation of physiological quality of plant material. The information about chlorophyll concentration and fluorescence could help to evaluate actual status of photosynthetic activity (Photosystem II) and thus actual vitality of the plant. It is worth mentioning that these measurements can, in most cases, only detect physiological stress and are not, generally, able to reveal its cause.

Today, there are various devices for chlorophyll parameters measurements available on the market. For preparation of this methodology, CCM-300 and OS30p+ devices by Opti-Sciences were used. However, some other widely used devices are also mentioned. As the measurement procedures are very similar for many of these devices, the methods suggested in this publication could be applicable also for some other instruments.

The measurement of chlorophyll content is widely used in agriculture for detecting long-term stress conditions caused mainly by a lack of nutrients. There are two most frequently used devices for chlorophyll content/concentration measurements: Konica Minolta SPAD 502 and OptiSciences CCM-200. Neither of these devices directly measures chlorophyll content or concentration, but relative values (called “SPAD value” in the case of SPAD 502 and “CCI” in the case of CCM-200) that need to be recalculated for obtaining chlorophyll content value. Suggested equations taken from previous studies by other authors including the SPAD/CCI conversion equation are provided in this methodology (Eq. 1–8).

Unlike previous devices, chlorophyll content meter OptiSciences CCM-300 uses chlorophyll fluorescence at specific wavelengths instead of optical density of a tissue for chlorophyll content measurement. This allows measurement on a very small leaf sample area, e.g. on conifers. The measured parameter is marked ($F_{735/700}$) and converted into chlorophyll concentration by the device using equation suggested by Gitelson et al. (1999) that can be further edited, if necessary.

Chlorophyll fluorescence (dark-adapted chlorophyll fluorescence) is usually measured using plastic cuvettes for dark-adaptation of the tissue before measurement. Dark-adaptation is necessary for enabling the reaction centres of Photosystem II to fully open and absorb maximum possible amount of light. The tissues should be dark-adapted at least 30 minutes before measurement.

For evaluation of the chlorophyll fluorescence, two main approaches are used: the *Fv/Fm* measurement and *OJIP* measurement. The differences between these options are described in more detail in Chapter 2. Correctly performed measurement using *Fv/Fm* protocol is depicted in Fig. 6 (characteristic shape of fluorescence curve); Fig. 7 shows incorrect measurement which resulted from incorrect parameter settings (more information about correct parameter setting is provided in the particular device manual).

It was documented that the measurements of chlorophyll content/concentration in leaves could provide information about long-term nutrient stress in plants if significantly lower values than normal are observed. Observed values for nonstressed individuals are summarised in Tab. 3; conversion approaches for SPAD and CCI values are provided.

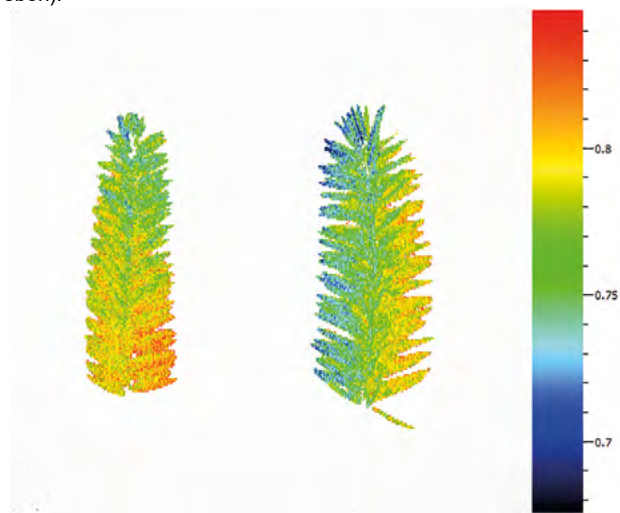
Chlorophyll fluorescence, on the other hand, can reveal current or short-term stress. It was demonstrated that chlorophyll fluorescence is sensitive to an increasingly imminent risk of exposure of plants to simultaneous droughts and

high temperatures, as well as frost stress present mainly in the spring season. If the parameter F_v/F_m drops below 0.7, it usually indicates the plants are stressed. Detailed measurements also enable us to detect specific damage caused by exposure to lower concentration of herbicides (parameter V_j from *OJIP* protocol rises over 0.35).

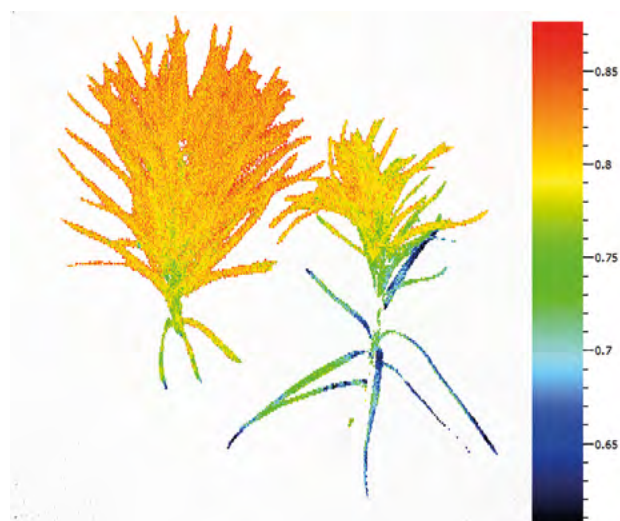
The accuracy and reliability of described methods were satisfactory. Table 4 shows the differences between two independent chlorophyll fluorescence measurements of one tissue, which were observed to be very low. In Table 5, recommended settings and observed differences from provided functions are summarised for estimation of chlorophyll concentration using the CCM-300 device. Insufficient dark-adaptation in the case of fluorescence measurements and the effect of direct bright light (sunlight) were identified as the most common factors that could negatively influence the reliability of the described methods.

PŘÍLOHY

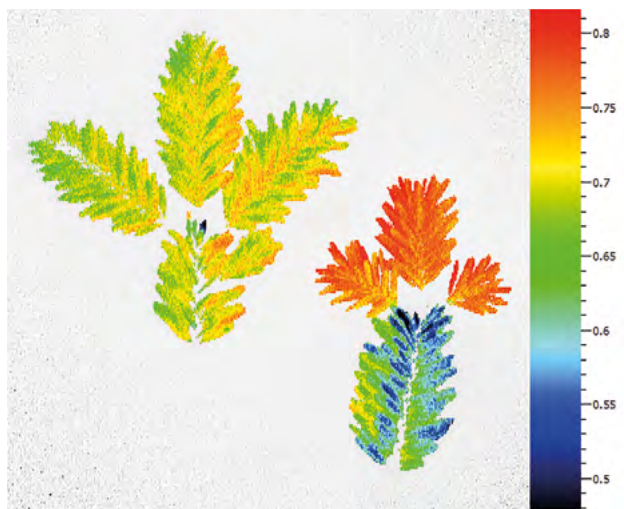
(autor: Jana Kvíderová, Botanický ústav AV ČR, Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, pracoviště Třeboň).



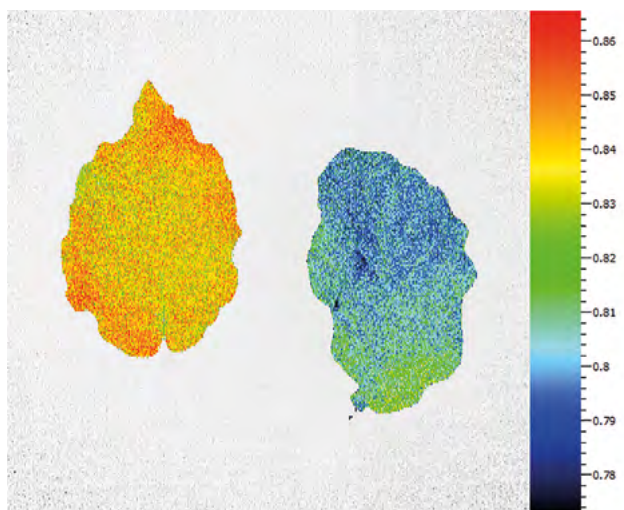
Příloha 1: Ukázka variability parametru F_v/F_m v rámci letorostu na vzorku smrku (*Picea abies*). Měření je provedeno na lícové straně vzorku. Datum měření: 7/2018.



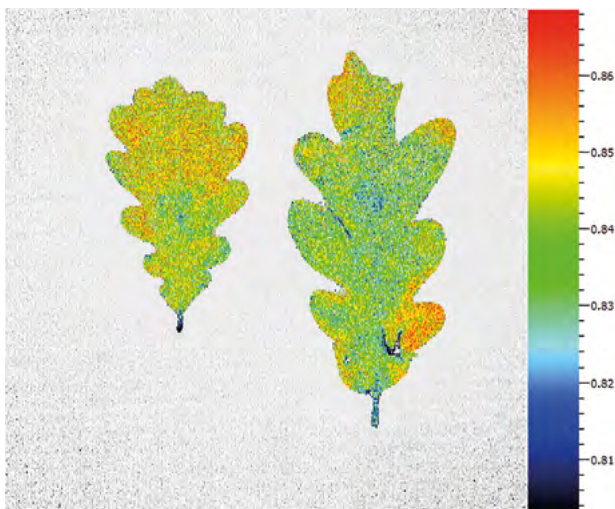
Příloha 2: Ukázka variability parametru F_v/F_m v rámci letorostu na vzorku borovice (*Pinus sylvestris*). Měření je provedeno na lícové straně vzorku. Datum měření: 7/2018.



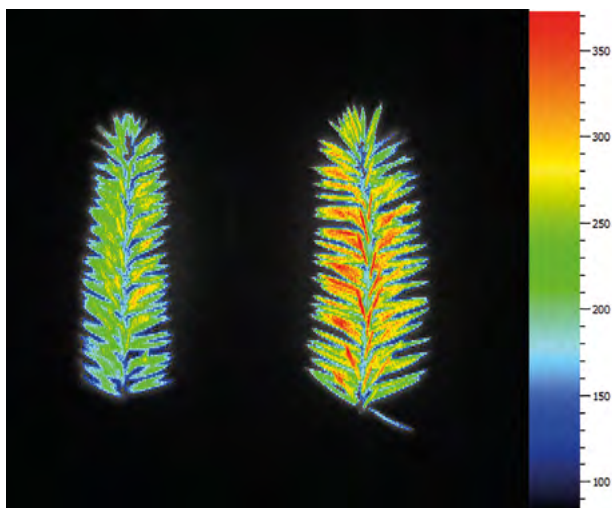
Příloha 3: Ukázka variability parametru F_v/F_m v rámci letorostu na vzorku jedle (*Abies alba*). Měření je provedeno na lícové straně vzorku. Datum měření: 7/2018.



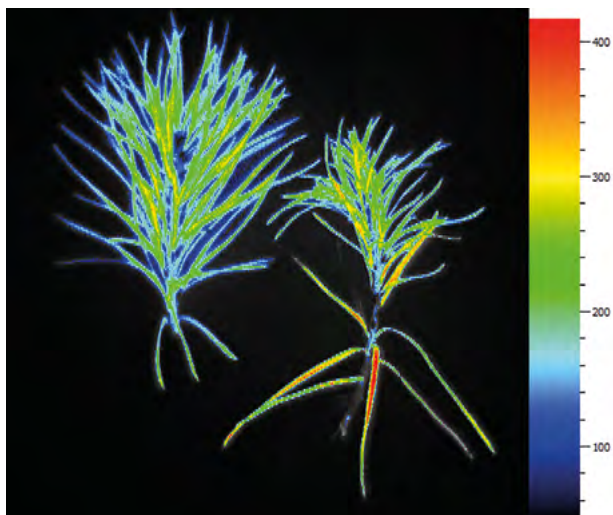
Příloha 4: Ukázka variability parametru F_v/F_m v rámci listu na vzorku buku (*Fagus sylvatica*). Měření je provedeno na lícové straně vzorku. Datum měření: 7/2018.



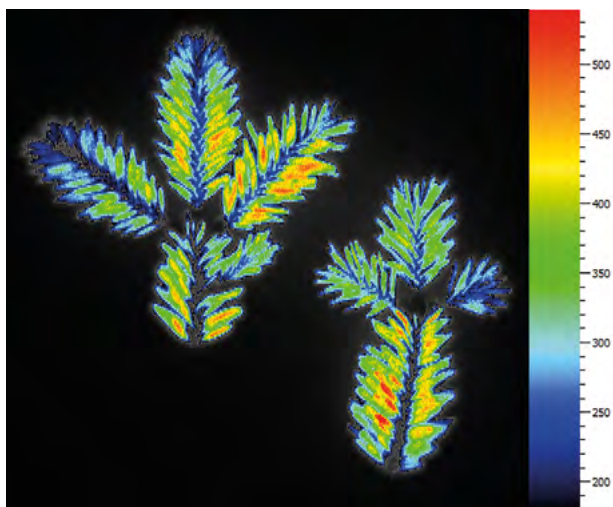
Příloha 5: Ukázka variability parametru F_v/F_m v rámci listu na vzorku dubu (*Quercus robur*). Měření je provedeno na líčové straně vzorku. Datum měření: 7/2018.



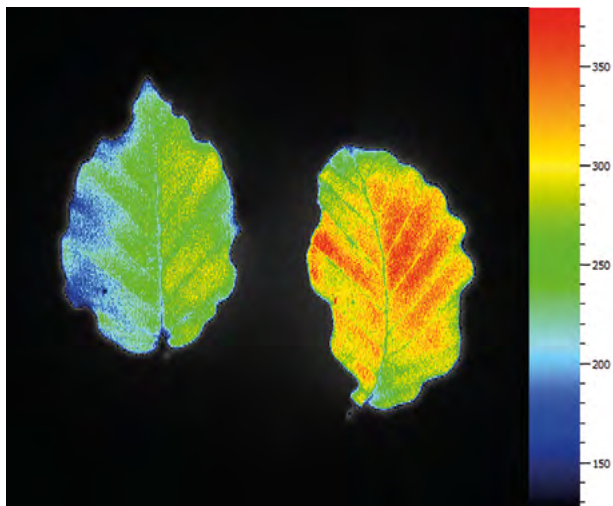
Příloha 6: Ukázka variability parametru F_0 v rámci letorostu na vzorku smrku (*Picea abies*). Měření je provedeno na líčové straně vzorku. Datum měření: 7/2018. Pro měření je použit stejný vzorek jako v případě parametru F_v/F_m (Příloha 1).



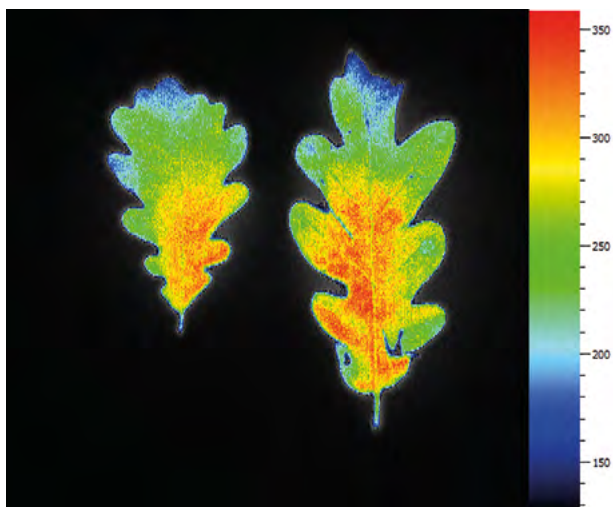
Příloha 7: Ukázka variability parametru F_0 v rámci letorostu na vzorku borovice (*Pinus sylvestris*). Měření je provedeno na líčové straně vzorku. Datum měření: 7/2018. Pro měření je použit stejný vzorek jako v případě parametru Fv/Fm (Příloha 2).



Příloha 8: Ukázka variability parametru F_0 v rámci letorostu na vzorku jedle (*Abies alba*). Měření je provedeno na líčové straně vzorku. Datum měření: 7/2018. Pro měření je použit stejný vzorek jako v případě parametru Fv/Fm (Příloha 3).



Příloha 9: Ukázka variability parametru F_0 v rámci letorostu na vzorku buku (*Fagus sylvatica*). Měření je provedeno na lícové straně vzorku. Datum měření: 7/2018. Pro měření je použit stejný vzorek jako v případě parametru Fv/Fm (Příloha 4).



Příloha 10: Ukázka variability parametru F_0 v rámci letorostu na vzorku dubu (*Quercus robur*). Měření je provedeno na lícové straně vzorku. Datum měření: 7/2018. Pro měření je použit stejný vzorek jako v případě parametru Fv/Fm (Příloha 5).



Výzkumný ústav
lesního hospodářství
a myslivosti, v. v. i.

www.vulhm.cz

LESNICKÝ PRŮVODCE 2/2019