

## Vliv pozdního mrazu na změnu fluorescence chlorofylu sazenic jedle bělokoré v závislosti na způsobu pěstování

*Influence of late frost on chlorophyll fluorescence response in silver fir plants depending on nursery practices*

ONDŘEJ ŠPULÁK – JARMILA MARTINCOVÁ

### Abstract

*Late frost is one of the limiting environmental factors, especially in mountain conditions and frost holes. This study aims, using methods of chlorophyll fluorescence measurement, to analyze an impact of simulated late frost and subsequent light regime on state of one year old needles of white fir planted in sunny and shaded conditions. Two instruments were used: Imaging-PAM and Plant Efficiency Analyser. The observed impact of late frost was short-term. More susceptible to the frost stress were one-year old offsets of the sprouted plants. The study confirms that when shaded day follows frost event the fluctuation of fluorescence parameters is lower and they balance earlier than in the case of a sunny day. Based on the results, it is recommended to shade the fir plants when late frost in the nursery can be expected, not only for the premise of frost attenuation but also for reduction of the radiation stress following frost event.*

**Keywords:** *sprouting, late frost, damage, chlorophyll fluorescence, fir*

### Abstrakt

Jedním z negativních faktorů prostředí převážně v horských podmínkách či v podmínkách mrazových poloh je pozdní mráz. Cílem příspěvku je pomocí analýzy maximálního výtěžku fotochemie PS II vyhodnotit vliv simulovaného pozdního mrazu a následného ozáření na stav jednoletého jehličí sazenic jedle bělokoré pěstované na plném ozáření a ve stíněných podmínkách. Fluorescence chlorofylu byla měřena dvěma přístroji – Imaging-PAM a Plant Efficiency Analyser. Pozorovaný vliv pozdního mrazu byl krátkodobý. Jednoleté výhony sazenic narašených byly vůči stresu mrazem náchylnější. Bylo potvrzeno, že když po mrazové epizodě následuje den se sníženou intenzitou záření, dochází u jedle k menšímu výkyvu hodnot parametrů fluorescence a nastává jejich rychlejší vyrovnání, než v případě slunečného dne. Na základě výsledků lze doporučit zakrývání sazenic jedle při očekávání výskytu pozdních mrazů ve školkách, a to nejen vzhledem k předpokladu tlumení mrazových špiček, ale i z hlediska snížení stresu působeného intenzivní radiací po mrazové epizodě.

**Klíčová slova:** *rašení, pozdní mráz, poškození, fluorescence chlorofylu, jedle*

### Úvod

Prosperita a růst dřevin je určen jak vnitřními (genetická predispozice), tak vnějšími (vlastností prostředí) parametry. Jedním z negativních faktorů prostředí zvláště v horských podmínkách či v podmínkách mrazových poloh je pozdní mráz (AUSSENAC 2000), mráz

v době, kdy už byly splněny předpoklady pro výstup z dormance – dehardening (BECK et al. 2004). V součinnosti s dalšími stresujícími jevy (např. sluneční záření, poškození zvětří či myšovitými hlodavci, překonávání šoku z přesazení atd.) se může poškození pozdním mrazem stát letálním faktorem. Vlivem náhlých mrazů mimo zimní období může dojít až k okamžité destrukci a odumření buněčné protoplazmy, a to v důsledku tvorby ledu v pletivech (NEUNER, BEIKIRCHER 2010; BEADLE, SANDS 2004). Uvádí se, že mimo zimní období voda v apoplastu začíná běžně mrznout při teplotách  $-1$  až  $-3$  °C, v závislosti na obsahu látek, které snižují bod tuhnutí (HOLMSGAARD 1962; SAKAI, LARCHER 1987). Přestože nejvíce náchylná jsou mladá pletiva narašených výhonů (NEUNER, BEIKIRCHER 2010), poškození pozdními mrazy se projevuje na starších výhonech a v důsledku tak ovlivňuje růst (DITTMAR et al. 2006).

Měření fluorescence chlorofylu se osvědčilo jako jedna z metod v řadě aplikací fyziologického výzkumu. Fluorescence chlorofylu dává informaci o stavu fotosystému II (PSII), o rozsahu, v jakém je PSII schopen využít energii absorbovanou chlorofyly. Poškození PSII je první projev stresu listů (MAXWELL, JOHNSON 2000). Parametry fluorescence chlorofylu u jehličí, nejčastěji maximální kvantový výtěžek fotosystému II – Fv/Fm, byly využity také jako indikátory stresu mrazem (BINDER, FIELDER 1996; SILFVER et al. 2008, PEGUERO-PINA et al. 2008). V závislosti na použité technologii měření lze touto metodou vyhodnotit dostatečné množství vzorků.

Je známo, že intenzivní sluneční záření následující po pozdních mrazech zvyrazňuje jejich stresující efekt na vegetaci. Například stínění u smrku snížilo rozsah viditelného i vnitřního poškození jehličí (ORLANDER 1993; WELANDER et al. 1994; LANGVALL, ORLANDER 2001).

Cílem tohoto příspěvku je pomocí analýzy vybraného parametru fluorescence chlorofylu (maximálního kvantového výtěžku fotochemie PS II) vyhodnotit vliv simulovaného pozdního mrazu a následného ozáření na stav jednoletého jehličí sazenic jedle bělokoré s různou historií pěstování.

## MATERIÁL A METODY

### Materiál

Sazenice jedle bělokoré z výsevu v roce 2007 byly pěstované 2 roky na stíněném (stínící textilí) a nestíněném pařníku, v roce 2009 přeškolovány do shodných variant světelných podmínek.

Dne 26. 3. 2012 bylo vždy 12 sazenic ve třech opakováních na variantu přesazeno do přepravek. Jedle pěstovaná na plném slunci vykazovala vzhled oslabeného jedince a redukci asimilačního aparátu. Přepravky byly umístěny do řízených podmínek růstové komory. Nastaven byl 16hodinový den o teplotě 17 °C (intenzita záření cca 15 000 lux) a noc o teplotě 10 °C.

V průběhu vystavení sazenic řízeným podmínkám bylo v týdenních intervalech hodnoceno rašení jedlí pomocí empirických stupňů rašení (Tab. 1). Průběh teplot a relativní vlhkosti vzduchu v klimatizované komoře byl monitorován pomocí loggerů S3631 (firma Comet System).

**Tab. 1:** Empirická stupnice rašení jedle.**Tab. 1:** Empirical scale of fir sprouting

Stav / State	Index
Neraší / Not sprouting	0
Zvětšené pupeny / Enlarged buds	1
Prosvítají zelené jehlice / Green needles show in buds	2
Sevřené svazečky jehlic vyrůstají mezi šupinami / Confined bundle of needles growing from buds	3
Rozevřené svazečky jehlic, začátek prodlužovacího růstu / Open bundle of needles, beginning extension growth	4
Prodlužovací růst nových výhonů / Extension growth of new sprouts	5

### Mrazový test

Dne 17. 4. 2012 byl proveden mrazový test sazenic jedle. Teploty vzduchu v klimatizované růstové komoře se pohybovaly pod bodem mrazu po dobu 5 hodin s maximálním poklesem na  $-4,5$  °C. Následovalo období ohřevu a teploty standardního dne (17 °C a 10 °C). Mrazu byly vystaveny vždy 2 opakování (přepravky) od každé varianty. Z nich po mrazu, v době simulace dne, bylo vždy jedno opakování ozářeno plnou intenzitou osvětlení komory (světlo 1; cca 15 000 lux) a druhé pouze minimální intenzitou (světlo 0,1; cca 500 lux). Třetí opakování od každé varianty představovalo kontrolu umístěnou po dobu trvání mrazového testu až do následujícího dne mimo klimatizovanou komoru v laboratoři, při teplotě cca 20 °C (Tab. 2).

**Tab. 2:** Dílčí varianty pokusu mrazového testu jedle bělokoré. Pozn.: m. p. – mrazová perioda.**Tab. 2:** Partial variants of the fir frost test. Note: f. p. – frost period.

Varianta pěstování – zkratka Growing variant – abbreviation	Dílčí varianta Partial variant	Popis Description
<b>Stíněný záhon</b> Shaded seedbed – T	T-K	kontrola – mimo komoru control – outside the chamber
	T-S	po m. p. při vysoké intenzitě osvětlení (cca 15 000 lux) after f. p. in high illumination intensity (cca 15 000 lux)
	T-T	po m. p. při nízké intenzitě osvětlení (cca 500 lux) after f. p. in low illumination intensity (cca 500 lux)
<b>Nestíněný záhon</b> Sunny seedbed – S	S-K	kontrola – mimo komoru control – outside the chamber
	S-S	po m. p. při vysoké intenzitě osvětlení (cca 15 000 lux) after f. p. in high illumination intensity (cca 15 000 lux)
	S-T	po m. p. při nízké intenzitě osvětlení (cca 500 lux) after f. p. in low illumination intensity (cca 500 lux)

### Měření fluorescence chlorofylu

Fluorescence chlorofylu  $a$  posledního vyzrálého ročníku jehličí byla hodnocena den před a následující den po mrazovém testu a dále v týdenních intervalech. Mezi předposledním (3. 5. 2012) a posledním (11. 5. 2012) měřením byly sazenice umístěny na venkovním záhoně. Varianty pěstované v předchozích letech na plném slunci byly opět umístěny na slunce, sazenice pěstované původně ve stinných podmínkách pod stínící textilií.

Pro měření byly využity přístroje Plant Efficiency Analyser (PEA, Hansatech Instruments) a Imaging-PAM (Walz), které mají odlišný přístup k stínění vzorků a měření základních temnotních parametrů fluorescence chlorofylu (blíže viz ŠPULÁK, MARTINCOVÁ 2011). Rozdíly relativních hodnot (např. poměru  $F_v/F_m$ ) a reakce na působení různých vlivů by však při měření různými přístroji měly být obdobné.

Pro měření fluorescence chlorofylu **přístrojem Imaging-PAM** byly reprezentativní jehlice z roku 2011 z prvního bočního výhonu v horní části korunky lepeny na leповou destičku lícní stranou vzhůru. Každý jedinec byl zastoupen 2 opakováními (jehlicemi), tzn. 24 měření na přepravku – dílčí variantu. Vzorky byly minimálně 30 minut před měřením adaptovány na tmu. Nastavena byla intenzita měřicího světla  $3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , frekvence pulzů 1 Hz. Měření se odehrávalo v zatemněné místnosti pro udržení maximálně možného temnotního stavu asimilačního aparátu před začátkem měření.

Fluorescence chlorofylu **přístrojem PEA** byla měřena na jednoletém jehličí ze svrchní strany bočních letorostů v horní části korunky (mimo terminálu). Měřeno bylo pomocí originálních klipsen zaručujících vymezení měřeného prostoru i jeho stínění. Před měřením byly vzorky stíněny minimálně 30 minut v zatemněné místnosti. Pro testování byla intenzita záření nastavena na 50 % ( $2,1 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Každý vzorník byl měřen na dvou náhodně vybraných výhonech.

Pro vyhodnocení v tomto příspěvku byl vybrán parametr maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II pletiva adaptovaného na tmu ( $F_v/F_m$ ; MAXWELL, JOHNSON 2000) z měření oběma přístroji. Do výpočtu parametru vstupují hodnoty maximální fluorescence ( $F_m$ ) a minimální fluorescence (intenzita fluorescence v 50  $\mu\text{s}$ ;  $F_0$ ), jejichž rozdíl je označován jako variabilní fluorescence ( $F_v$ ). Hodnota  $F_v/F_m$  byla dopočítána obslužným softwarem podle vztahu  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ .

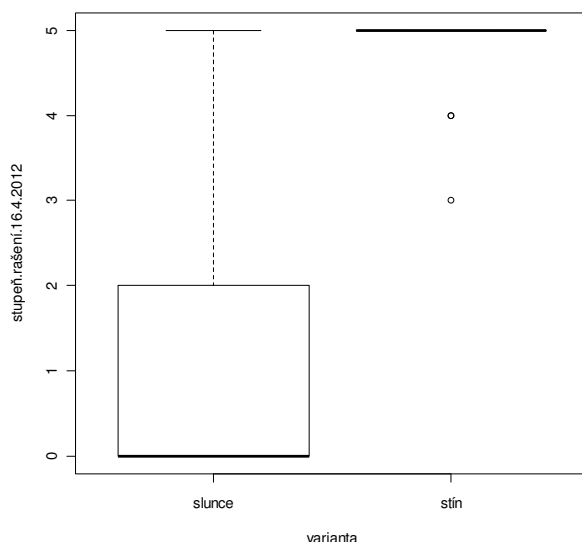
### Statistické hodnocení

Po odstranění odlehlých měření pozbývajících biofyzikální smysl byla data jednotlivých parametrů pro zlepšení parametru normality a stabilizaci rozptylů transformována pomocí Box-Coxovy transformace (BOX, COX 1964; FOX, WEISBERG 2011). Podle charakteru úlohy byla data porovnávána pomocí analýzy rozptylu (ANOVA), jestliže ani transformace nezabezpečila statistickou shodnost rozptylů pak pomocí Kruskal-Wallisova testu (příslušné dílčí varianty), nebo pomocí studentova t-testu (varianty stínění před mrazovým testem). Testy byly prováděny ve statistickém programu Unistat 5.601 a v prostředí R (2.10.1, The R Foundation for Statistical Computing 2011). Rozdíly byly považovány za průkazné, jestliže  $P < 0.05$ .

## VÝSLEDKY A DISKUSE

### Rašení a poškození nových výhonů

Po třech týdnech v řízených podmínkách růstové komory, v den předcházející aplikaci mrazu, byly sazenice stíněné varianty (T) již plně narašené, nové výhony až na výjimky byly hodnoceny indexem rašení 5, tzn. výhony ve fázi délkového růstu. Naproti tomu sazenice pěstované v předchozích letech na plném slunci vykazovaly výrazně pomalejší průběh rašení, téměř 70 % jedinců nejevilo stále známky probouzení pupenů (Obr. 1).



**Obr. 1:** Rozdělení stupňů rašení jedlí podle variant před aplikací mrazu dne 16. 4. 2012.

**Fig. 1:** Distribution of degrees of sprouting in firs according to variants prior simulated frost – on the 16. 4. 2012.

Řízený stres mrazem způsobil poškození rašících letorostů u variant pěstovaných v předchozích letech ve stíněných podmínkách (T). U 33 % jedinců dílčí varianty T-T (po mraze při nízké intenzitě osvětlení) se vyskytovalo letální poškození nových výhonů (stupeň poškození 2), u dílčí varianty T-S (po mraze při vysoké intenzitě osvětlení) bylo zjištěno u 58 % jedinců. Podíl částečně poškozených výhonů byl u obou variant srovnatelný (17 %). S ohledem na nízký stupeň narašení nebylo poškození nových výhonů pozorováno u sazenic variant pěstovaných v předchozích letech na slunci. Všeobecně jsou pupeny mající nižší stupně rašení odolnější vůči působení pozdního mrazu, jak dotvrzují také BURR (1990) nebo BIGRAS et al. (2004).

### Fluorescence chlorofylu

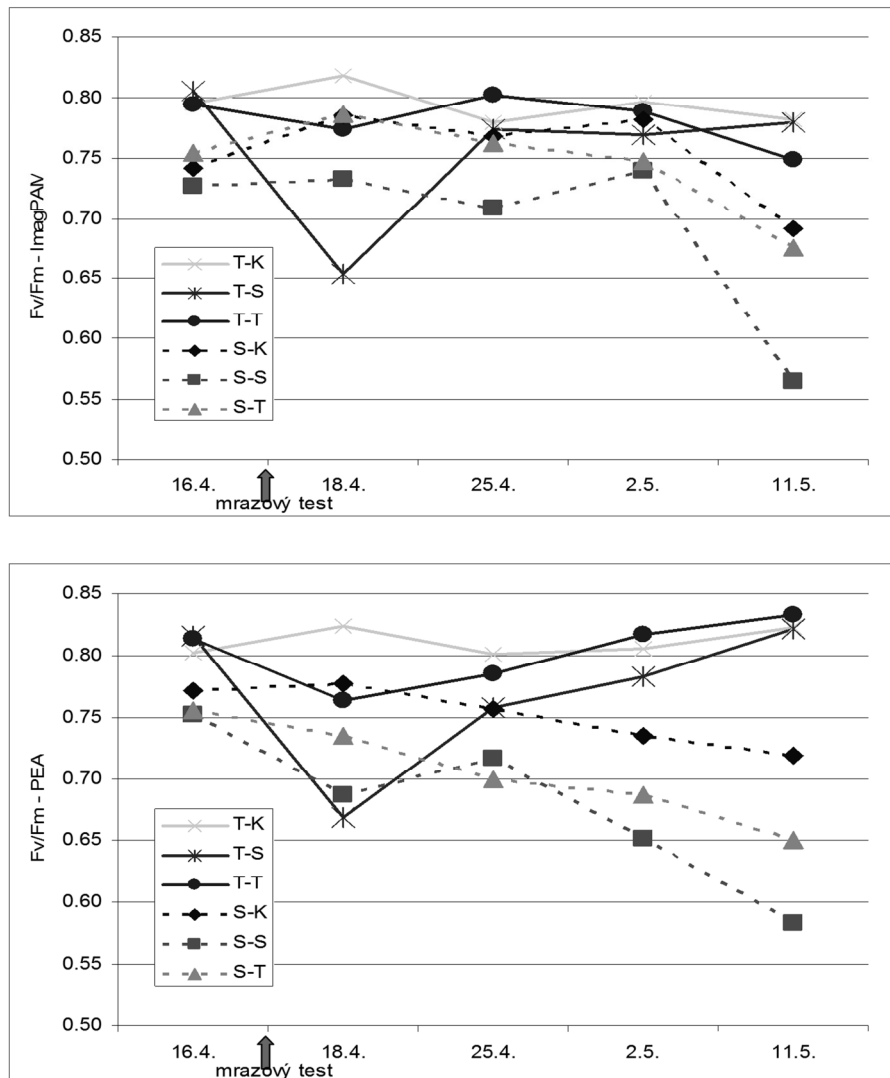
#### Maximální kvantový výtěžek

Vyšší hodnoty maximálního kvantového výtěžku  $F_v/F_m$ , až na výjimky, byly naměřeny přístrojem PEA. Vychází to z podstaty principu měření jednotlivými přístroji – přístroj PEA umožňuje stabilnější stínění a měření skutečných temnotních parametrů (LICHTENTHALER et al. 2005). Standardizace podmínek při měření přístrojem PAM však bylo zajištěno měřením v zatemněné laboratoři.

Před aplikací mrazového testu (16. 4.) se pohybovaly průměrné hodnoty  $F_v/F_m$  u sazenic pěstovaných pod stíněním (T) v rozmezí 0,79 až 0,84, které je obecně (MAXWELL, JOHNSON 2000) považováno za optimální pro většinu druhů rostlin. Svědčí to o plné funkčnosti fotochemických procesů. Naproti tomu parametr  $F_v/F_m$  u varianty S potvrdzoval oslabení sazenic (Obr. 2). Rozdíly mezi variantami T a S byly statisticky průkazné.

Následující den po mrazovém testu došlo k výraznému poklesu maximálního výtěžku fotochemie ( $F_v/F_m$ ) u dílčí varianty (dv) T-S, a to při měření oběma přístroji, hodnoty byly statisticky průkazně nižší, než u dv S-K a S-T. Pokles byl pozorován i u dílčí varianty T-T.

V následujících termínech měření docházelo k postupnému vyrovnávání hodnot maximálního výtěžku fotochemie u testovaných variant pěstovaných ve stíněných podmínkách, delší období stabilizace bylo pozorováno u varianty T-S. Nejednoznačné kolísání lze pozorovat mezi výsledky obou přístrojů u sazenic pocházejících ze slunce. Celkově je u nich však trend sestupný, poukazující na zhoršující se stav fotosyntetických reakcí nejen u testovaných dílčích variant (S-S a S-T), ale také u kontroly (S-K). Výrazný zlom nastal přenesením sazenic do venkovního prostředí.



**Obř. 2:** Změny průměrného parametru  $F_v/F_m$  v čase za dílčích varianty. Nahoře měřeno přístrojem Imaging-PAM, dole přístrojem PEA.

**Fig. 2:** Changes of mean  $F_v/F_m$  parameter of partial variants in time. Up – measured by Imaging-PAM; down – measured by PEA.

Je možné, že se poškození mrazem projevuje rozdílně na lícni a boční (spodní) straně jehlic, zvláště u oslabených jedinců. To by mohlo vysvětlovat rozdíly v pozorovaných trendech parametru  $F_v/F_m$  mezi přístroji. Přístrojem Imaging-PAM byla striktně měřena svrchní, lícni strana jehličí, stínící klipsny přístroje PEA však zploštily strukturu jehlic, a tím mohly být hodnoty měřeny na jejich svrchní nebo i boční straně. K úplnému obrácení jehlic rubovou stranou vzhůru u jedle bělokoré dochází zřídka, neboť má jehlice ploché a umístěné plošným způsobem. Tento faktor by se mohl výrazněji projevit při měření např. u smrku. Druhým ze zdrojů rozdílů pak bude přirozená variabilita hodnot mezi jednotlivými listy (jehlicemi) v rámci jedince (ŠPULÁK, MARTINCOVÁ 2011).

## ZÁVĚR

Ze studie vyplývá, že vliv pozdního mrazu na fluorescenci chlorofylu jednoletých výhonů mladých jedinců jedle bělokoré je krátkodobý. Vůči stresu mrazem jsou náchylnější jednoleté výhony sazenic narašených. Jako u řady druhů dřevin bylo i u jedle potvrzeno, že když po mrazové epizodě následuje den se sníženou intenzitou záření, dochází k menšímu výkyvu hodnot parametrů fluorescence a nastává jejich rychlejší vyrovnání, než v případě slunečného dne. Zakrývání sazenic jedle při očekávání výskytu pozdních mrazů ve školkách se tak jeví účelné nejen vzhledem k předpokladu tlumení mrazových špiček, ale i z hlediska snížení stresu působeného intenzivní radiací po mrazové epizodě.

## Poděkování

Příspěvek vznikl díky podpoře výzkumného záměru 0002070203 „Stabilizace funkcí lesa v antropogenně narušených a měnících se podmínkách prostředí“.

## LITERATURA

- AUSSENAC, G. (2000): Interactions between forest stands and microclimate: Ecophysiological aspects and consequences for silviculture. *Annals of Forest Science*, 57: 287–301.
- BEADLE, C. – SANDS, R. (2004): Physiology and Silviculture. In: *Encyclopedia of Forest Sciences*, Volume Four. Elsevier, Oxford, 2061 s.
- BECK, E. H. – HEIM, R. – HANSEN, J. (2004): Plant resistance to cold stress: Mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening; *Journal of Bioscience*, 29: 449–459.
- BOX, G. E. P. – COX, D. R. (1964): An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 26: 211–246.
- BIGRAS, F. J. – COURSOLE, C. – MARGOLIS, H. A. (2004): Survival and growth of *Picea glauca* seedlings as a function of freezing temperatures and exposure times during budbreak and shoot elongation. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 19: 3: 206–216.
- BINDER, W. D. – FIELDER, P. (1996): Chlorophyll fluorescence as an indicator of frost hardiness in white spruce seedlings from different latitudes. *New Forests*, 11: 233–253.
- BURR, K. E. (1990): The target seedling concepts: Bud dormancy and cold hardiness. *Target Seedlings Symposium: Proceedings Meeting of the Western Forest nursery Associations*. 13–17. 4. 1990, Roseburg, Oregon. USDA Forest Service. General Technical Report RM-200, s. 79–90.

- DITTMAR, CH. – FRICKE, W. – ELLING, W. (2006): Impact of late frost events on radial growth of common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Southern Germany. *European Journal of Forest Research*, 125: 249–259.
- FOX, J. – WEISBERG, S. (2011): *An R Companion to Applied Regression*, Second Edition, Sage.
- NEUNER, G. – BEIKIRCHER, B. (2010): Critically reduced frost resistance of *Picea abies* dutiny sprouting could be linked to cytological changes. *Protoplasma*, 243: 145–152.
- HOLMSGAARD, E. (1962): The influence of weather on growth and reproduction of beech. *Communications Institutii Forestalis Fenniae*, 55: 1–5.
- LICHTENTHALER, H. K. – BUSCHMANN, C. – KNAPP, M. (2005): How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R<sub>Fd</sub> of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica*, 43: 3: 379–393.
- PEGUERO-PINA, J. J. – MORALES, F. – GIL-PELEGRÍN, E. (2008): Frost damage in *Pinus sylvestris* L. stems assessed by chlorophyll fluorescence in cortical bark chlorenchyma. *Annals of Forest Science*, 65: 813.
- LANGVALL, O. – ORLANDER, G. (2001): Effects of pine shelterwoods on microclimate and frost damage to Norway spruce seedlings. *Canadian Journal of Forest Research*, 31: 1: 155–164.
- MAXWELL, K. – JOHNSON, G. J. (2000): Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51: 659–668.
- NEUNER, G. – BEIKIRCHER, B. (2010): Critically reduced frost resistance of *Picea abies* during sprouting could be linked to cytological changes. *Protoplasma*, 243: 145–152.
- ORLANDER, G. (1993): Shading reduces both visible and invisible frost damage to Norway spruce seedlings in the field. *Forestry – Oxford*, 66 1: 27–36.
- SAKAI, A. – LARCHER, W. (1987): *Frost survival of plants*. *Ecological Studies* 62. Springer-Verlag, Berlin, 321 s
- SILFVER, T. – HÄIKIÖ, E. – ROUSI, M. – HOLOPAINEN, T. – OKSANEN, E. (2008): Interactive effects of elevated ozone and springtime frost on growth and physiology of birch (*Betula pendula*) in field conditions. *Trees*, 22: 291–301.
- ŠPULÁK, O., MARTINCOVÁ, J. (2011): Variabilita parametrů fluorescence chlorofylu v rámci mladých stíněných a nestíněných sazenic jedle bělokoré (*Abies alba* Mill.) měřená dvěma odlišnými přístupy. *Zprávy lesnického výzkumu*, 56: 3: 189–197.
- WELANDER, N. T. – GEMMEL, P. – HELLGREN, O. – OTTOSSON, B. (1994): The consequences of freezing temperatures followed by high irradiance on in vivo chlorophyll fluorescence and growth in *Picea abies*. *Physiologia Plantarum*, 91: 1: 121–127.

**Adresa autorů**

Ing. ONDŘEJ ŠPULÁK, Ph.D.

RNDr. JARMILA MARTINCOVÁ

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

Výzkumná stanice Opočno

Na Olivě 550

517 73 Opočno

tel.: 494 668 391

e-mail: [spulak@vulhmop.cz](mailto:spulak@vulhmop.cz)