ACTA FACULTATIS FORESTALIS (1)
ZVOLEN 2017

MOŽNOSTI VYUŽITIA RÝCHLEJ KINETIKY FLUORESCENCIE CHLOROFYLU *A* PRI HODNOTENÍ TERMOSTABILITY PSII NA PRÍKLADE BUKA LESNÉHO

Hana H Ú D O K O V Á – Alena K O N Ô P K O V Á – Daniel K U R J A K

Hana Húdoková – Alena Konôpková – Daniel Kurjak: Možnosti využitia rýchlej kinetiky fluorescencie chlorofylu *a* pri hodnotení termostability PSII na príklade buka lesného. Acta Facultatis Forestralis, Zvolen

ABSTRAKT

Meranie fluorescencie chlorofylu *a* sa využíva na hodnotenie primárnych fotochemických procesov, často v súvislosti s teplotným stresom. Hodnotenie rýchlej kinetiky fluorescencie (tzv. OKJIP kriviek) je relatívne finančne nenáročné a rýchle, čo umožňuje hodnotiť výrazne väčší súbor rastlín v porovnaní s väčšinou fyziologických parametrov. V rámci hodnotenia veľkého počtu vzoriek (v prípade viacerých variantov resp. blokov a pri simulácii rôznych teplôt) však často vzniká potreba hodnotiť zozbieraný materiál počas viacerých dní. Druhou možnosťou je priebežne materiál odoberať každý deň, čo prináša viaceré komplikácie najmä pri odberoch mimo Slovenska. Preto sme zisťovali citlivosť parametrov rýchlej kinetiky fluorescencie chlorofylu *a* na stres z vysokej teploty v deň odberu a počas ďalších dvoch dní. Merané boli parametre ako maximálny kvantový výťažok PSII *Fv/Fm*, bazálna fluorescencia F_0, počet aktívnych reakčných centier *RC/ABS*, index fotochemickej výkonnosti *PI* a hodnota K-kroku W_K, pričom sme hodnotili spoľahlivosť meraní pri nestresujúcej teplote (25 °C) a pri supraoptimálnej teplote (48 °C). Porovnávané boli dve proveniencie buka, pochádzajúce z kontrastných regiónov – slovinská proveniencia 55_SL (14°20´60´´ v. z. d., 45°43´48´´ s. z. š.; 1040 m n. m.) a poľská proveniencia 39_PL (19°10´12´´ v. z. d., 49°49´47´´ s. z. š.; 450 m n. m.). Proveniencie boli pestované na rovnakej provenienčnej ploche Tále (19°02´ v. z. d., 48°38´ s. z. š.; 810 m n. m.), aby bolo možné zistiti, či reagujú porovnateľne. Pri meraniach v nestresujúcich podmienkach (25 °C) sme pre žiadny z hodnotených parametrov nezistili štatisticky významné rozdiely ani po dvoch dňoch skladovania. Významné zmeny skladovaním však nastali v odolnosti voči vysokej teplote: pre väčšinu parametrov sme nezistili významný rozdiel jeden deň po odbere. Dva dni po odbere sa však pre všetky parametre potvrdil významný pokles termostability pri bukoch s pôvodom v Slovinsku. Pri bukoch s pôvodom v Poľsku sme zaznamenali miernejší vplyv, pričom zmeny boli štatisticky významné pre dva z piatich hodnotených parametrov. Pokles hodnoty tzv. K-kroku krivky bol identifikovateľný už prvý deň po odbere. Pre testy termostability je preto potrebné vzorky spracovať najneskôr deň po odbere, avšak K-krok možno spoľahlivo hodnotiť len v deň odberu.

Kľúčové slová: *Fagus sylvatica* L., rýchla kinetika fluorescencie chlorofylu a, OKJIP krivka, teplotný stres

ÚVOD

Podľa scenárov klimatickej zmeny očakávame zvýšený výskyt teplotných extrémov a najmä výskyt supraoptimálnych teplôt (Koppe et al., 2004). Teplota pritom predstavuje významný faktor, ktorý ovplyvňuje rast, výkonnosť a v konečnom dôsledku aj prežívanie rastlín. Dobre zdokumentovaný bol napr. prípad rozsiahlych horúčav spojených so suchom v lete 2003, kedy júlové teploty boli až o 6 °C vyššie ako dlhodobý priemer. Tieto podmienky v Európe spôsobili značný, až 30 %-ný pokles celkovej hrubej primárnej produkcie a niektoré porasty vykazovali redukciu rastu až o 50 % (Bertini et al., 2011; Ciais et al., 2005). Poznatky o reakcii fyziologických procesov drevín na vysoké teploty môžu preto prispieť k zlepšeniu ich produktivity a vitality a zmierniť nepriaznivé vplyvy klimatických zmien výberom vhodného reprodukčného materiálu pre budúce umelé zalesňovanie (Song et al., 2014)

Viacero autorov považuje fotosyntézu a konkrétne PSII, za najcitlivejší komponent rastlín vo vzťahu k teplotnému stresu. Je teda evidentné, že jedným z vhodných kritérií pre posúdenie citlivosti genetických zdrojov na vysokú teplotu je analýza aktivity PSII a to hlavne prostredníctvom parametrov fluorescencie chlorofylu *a*. Meranie rýchlej kinetiky fluorescencie chlorofylu je navyše rýchle, efektívne a spoľahlivé a umožňuje zmerať veľké množstvo údajov za kratší čas ako pri iných metódach hodnotenia fyziologických funkcií rastliny (Ashraf and Harris, 2013; Brestič et al., 2010; Haldimann and Feller, 2004; Yamasaki et al., 2002). Pri meraní veľkého množstva vzoriek je však niekedy nutné spracovávať vzorky dlhšie ako jeden deň, a preto je potrebné ich uskladniť. V prípade vzoriek, ktoré nepochádzajú zo Slovenska a je potrebný ich transport, sa doba skladovania môže predĺžiť. Z tohto dôvodu sme sa v práci zamerali na skúmanie možností využitia rýchlej kinetiky fluorescencie chlorofylu *a* pre hodnotenie miery teplotného stresu a hodnotili sme taktiež vplyv skladovania v chladiacom zariadení na spoľahlivosť získaných výsledkov termostability PSII.

Ako experimentálny materiál bol pre prácu vybraný buk lesný, ktorý patrí k našim najvýznamnejším drevinám a s podielom viac ako 32% je aj najrozšírenejšou drevinou. Plocha lesných ekosystémov, kde je prímesou aj buk, zaberá v súčasnosti viac ako 85% z rozlohy lesného pôdneho fondu na Slovensku (Gömöry, 2011).

MATERIÁL A METÓDY

Rastlinný materiál

Rastlinný materiál bol zozbieraný na provenienčnej ploche Tále (48° 38´ s. z. š., 19° 02´ v. z. d., 810 m n.m). Provenienčná plocha Tále bola založená v roku 2000 s využitím dvojročných sadeníc 24 proveniencií buka lesného. Plocha zahŕňa tri náhodne usporiadané, kontinuálne bloky, s východiskovým počtom 50 sadeníc na provenienciu (Gömöry et al., 2015).

Pre experiment sme použili listy odobrané z poľskej proveniencie 39_PL a slovinskej proveniencie 55_SL, ktoré pochádzajú z kontrastných regiónov. Miesto pôvodu poľskej proveniencie 39_PL sa nachádza v klimatickom optime buka v nadmorskej výške 450 m

n. m. s priemernou ročnou teplotou 6,6 °C, počas vegetačnej sezóny je priemerná teplota 13,9 °C, priemerný ročný úhrn zrážok je 903 mm a v priebehu vegetačného obdobia 533 mm. Naopak, pôvod slovinskej proveniencie 55_SI je lokalizovaný mierne nad klimatickým optimom buka, v nadmorskej výške 1040 m n. m. Priemerná ročná teplota na tejto ploche je 8,1 °C vo vegetačnom období až 14,9 °C. Priemerný ročný úhrn zrážok sa pohybuje okolo 1345 mm, počas vegetačnej sezóny 586 mm.

Test termotolerancie

Vzorky sme odoberali na konci augusta 2016 v poludňajších hodinách. Odbery sme realizovali zo sĺnnej časti hornej tretiny koruny, pričom sme odoberali vetvy z troch stromov, vždy v dvoch blokoch na provenienciu. Vetvy sme po odobratí uložili do uzatvárateľných igelitových vreciek, aby nestratili vlhkosť a uložili do chladiaceho zariadenia (8°C), aby neboli vystavené vplyvom počasia a podmienkam počas transportu. Odobraté vzorky sme testovali v laboratórnych podmienkach. Pre každého jedinca sme testovali tri listy a to pri izbovej teplote 25°C a teplotnom strese pri 48°C, počas troch dní, vrátane dňa, kedy boli vzorky odobraté.

Sledovali sme parametre rýchlej kinetiky fluorescencie chlorofylu *a*, odvodené z OKJIP krivky ako maximálny kvantový výťažok PSII *Fv/Fm*, bazálna fluorescencia F_0, počet aktívnych reakčných centier *RC/ABS*, index fotochemickej výkonnosti *PI* a hodnota K-kroku W_K, s použitím fluorimetra Handy PEA (Hanstech Ltd., Veľká Británia). Listy, ktoré neboli vystavené teplotnému stresu (pri izbovej teplote) sme 30 minút adaptovali na tmu pomocou listových klapiek a následne v priebehu jednej sekundy ožiarili saturačným pulzom s intenzitou 3500 µmol $e^{-1}.m^{-2}.s^{-1}$. Pomocou saturačného pulzu sme indukovali fluorescenciu chlorofylu *a*, ktorá bola počas ožiarenia saturačným pulzom zaznamenávaná každých 10 µs. Druhú časť vzoriek sme vystavili teplote 48 °C. Teplotný stres sme simulovali pomocou vodného kúpeľa WNE22 (Memmert, Nemecko) po dobu 30 minút. Listy sme pred vložením do vodného kúpeľa uzatvorili do sklenených erlenmeyerových baniek. Po vystavení teplotnému stresu sme postupovali rovnako ako v predošlom prípade: vzorky sme adaptovali na tmu a následne zopakovali ožiarenie saturačným pulzom. Pre všetky stromy sme merania robili v dvoch opakovaniach s použitím nového listu, vždy z rovnakej vetvy.

Matematicko-štatistické vyhodnotenie

Štatistické vyhodnotenie nameraných údajov sme robili pomocou programu STATISTICA 12 (StatSoft®, USA). Bola testovaná normalita rozdelenia výberu dát Shapiro-Wilkovým testom. Rozdiely medzi provenienciami a termínmi merania sme testovali jednofaktorovou analýzou variancie. Následne sme stanovili párové kontrasty na hladine významnosti 5% použitím Tukeyovho post-hoc testu.

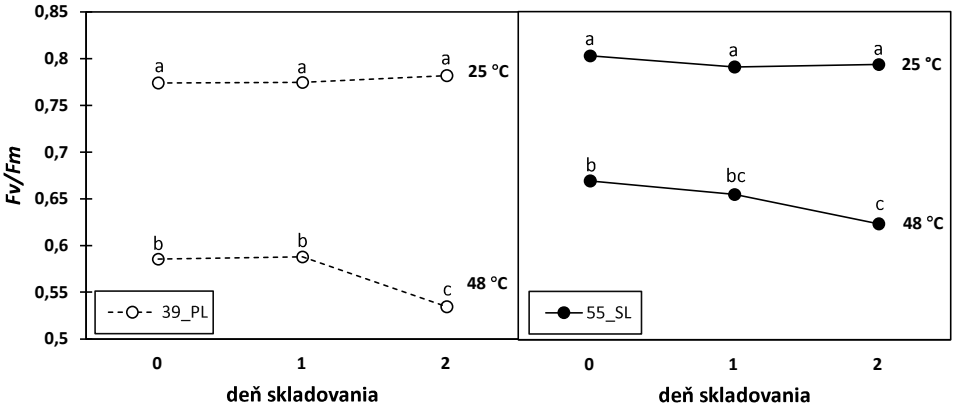
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe metódy merania rýchlej kinetiky fluorescencie chlorofylu *a* (tzv. OJIP kinetiky) je možné kalkulovať veľké množstvo informácií a parametrov pre hodnotenie miery teplotného stresu u rastlín a ich reakcie na vysokú teplotu ako stresový faktor (Bilger et al., 1984; Brestič et al., 2013; Brestic and Zivcak, 2013). Priebeh OJIP krivky sa totiž vplyvom supraoptimálnych teplôt mení, čo sa pripisuje konformačným zmenám PSII a zmene využitia tepelnej energie: (i) bazálna fluorescencia (F_0) prudko narastá, čo odráža ireverzibilné poškodenie PSII v dôsledku odpojenia svetlozberných komplexov od reakčných centier PSII, (ii) maximálna fluorescencia (*Fm*) lineárne klesá so stúpajúcou teplotou, čo je pravdepodobne spojené s postupným uzatváraním reakčných centier PSII v dôsledku porušenia transportu elektrónov, pričom tieto zmeny v konečnom dôsledku vedú k (iii) zníženiu maximálneho kvantového výťažku PS II (*Fv/Fm*) (Brestic and Zivcak, 2013; Briantais et al., 1996; Pastenes and Horton, 1996; Pospíšil et al., 1998).

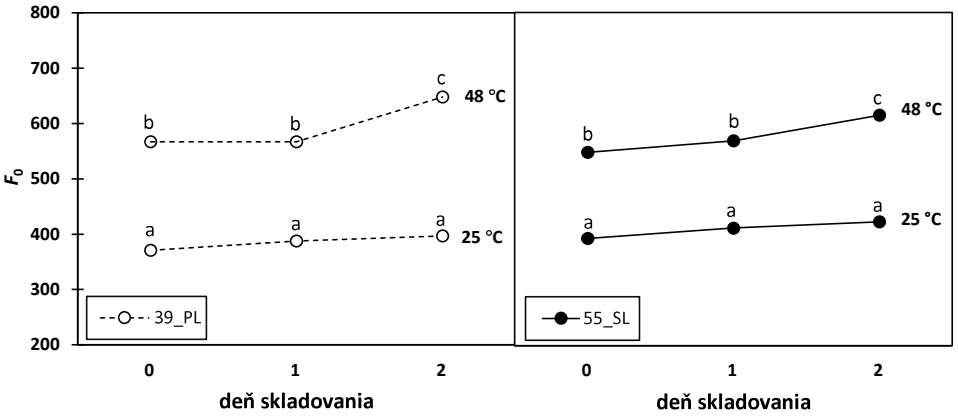
Prvým stanoveným parametrom bol preto maximálny kvantový výťažok PSII (*Fv/Fm*), ktorý je stále jeden z parametrov najčastejšie využívaných pri hodnotení stavu fotosyntetického aparátu. Ide o pomer medzi variabilnou a maximálnou fluorescenciou chlorofylu *a* pri asimilačných orgánoch adaptovaných na tmu. Pri nestresovaných vzorkách sa hodnoty *Fv/Fm* pohybujú v rozmedzí od 0,78 až 0,84, avšak pri stresových podmienkach je maximálna fotochemická efektívnosť značne redukovaná (Björkman and Demmig--Adams, 1995; Stirbet and Govindjee, 2011). V našom prípade sa pri nestresovaných vzorkách hodnoty *Fv/Fm* pohybovali u oboch proveniencií okolo 0,77 až 0,8. Hodnoty *Fv/Fm* boli počas všetkých testovaných dní viac-menej identické, čiže doba skladovania nemala žiadny vplyv na referenčné hodnoty *Fv/Fm*. Po vystavení teplotnému stresu, síce listy rozdielnych proveniencií reagujú podobne (Obr.1).

Počas prvých dvoch dní merania sa totiž hodnota tohto parametra signifikantne nemenila a významne klesla až tretí deň merania. Avšak ako vyplýva z Obr.1 poľská proveniencia 39_PL reagovala na teplotný stres citlivejšie ako slovinská proveniencia 55_SI. Hodnoty maximálneho kvantového výťažku PSII pri proveniencii 39_PL sa pohybovali v rozmedzí od 0,59 po 0,53 a pri proveniencii 55_SI od 0,67 po 0,62.

Ďalším stanoveným parametrom bola bazálna fluorescencia chlorofylu *a* (F_0), ktorá predstavuje hodnotu fluorescencie nameranej v čase 50 µs od začiatku saturačného pulzu (Olšovská et al., 2013). Ako už bolo spomenuté, hodnota F_0 pri teplotnom strese prudko narastá, čo pravdepodobne odráža nezvratnú súhrnnú dezorganizáciu komplexov PSII v dôsledku oddelenia svetlozberných komplexov od reakčných centier PSII (Yamane et al., 1998; Živčák, 2015). Pri nestresujúcich podmienkach sme nezaznamenali výrazné zmeny bazálnej fluorescencie počas troch dní meraní a to ani u poľskej ani u slovinskej proveniencie (Obr. 2). Podľa predpokladu však bazálna fluorescencia výrazne vzrástla pri vzorkách, ktoré boli vystavené teplotnému stresu. Počas prvých dvoch dní boli hodnoty F_0 pri stresovaných jedincoch vyrovnané. Tretí deň sme však zaznamenali výrazný nárast pri oboch provenienciách, čo bol pravdepodobne zapríčinené vplyvom skladovania vzoriek. Pri vzorkách skladovaných tri dni sme teda, rovnako ako v prípade parametra *Fv/Fm*, zaznamenali citlivejšiu reakciu na supraoptimálne teploty ako pri vzorkách, ktoré boli skladované kratší čas poprípade spracované hneď po odbere.

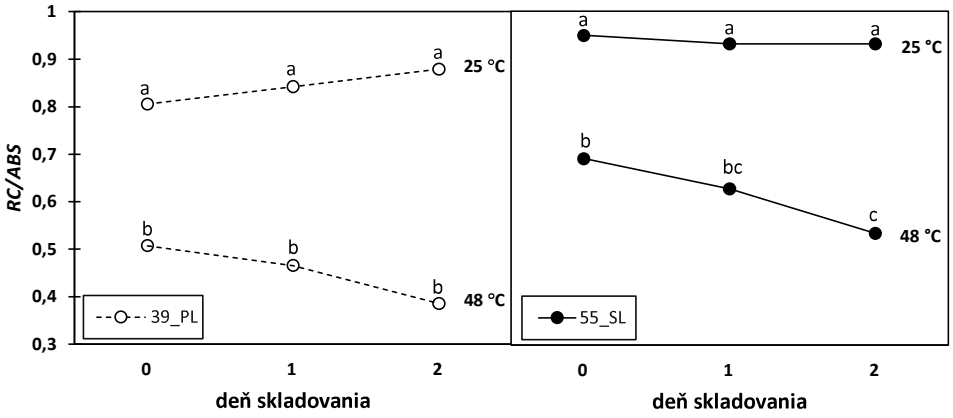


Obr. 1 Maximálny kvantový výťažok PSII (Fv/Fm) v deň odberu a 1 resp. 2 dni po odbere. Hodnoty merané pri teplote 25 °C a 48 °C, zvlášť pre provenienciu 39_PL a 55_SI. Odlišné písmená označujú významnosť rozdielov na hladine α=0,05.
Fig. 1 Maximal quantum yield of PSII (Fv/Fm) measured on the day of sampling, the first and the second day after sampling, respectively. Values were measured at teplerature of 25 °C and 48 °C, separately for provenance 39_PL and 55_SI. Different letters indicate the differences at significance level of α=0,05.



Obr. 2 Bazálna fluorescencia (F_0) v deň odberu a 1 resp. 2 dni po odbere. Hodnoty merané pri teplote 25 °C a 48 °C, zvlášť pre provenienciu 39_PL a 55_SI. Odlišné písmená označujú významnosť rozdielov na hladine α=0,05.
Fig. 2 Basal fluorescence (F_0) measured on the day of sampling, the first and the second day after sampling, respectively. Values were measured at teplerature of 25 °C and 48 °C, separately for provenance 39_PL and 55_SI. Different letters indicate the differences at significance level of α=0,05.

Ďalšie dva parametre, množstvo aktívnych reakčných centier PSII (*RC/ABS*) a index výkonnosti (*PI*), vykazovali rovnaký vzorec odozvy v závislosti od dĺžky uskladnenia pred meraním termostability PSII (Obr. 3 a Obr. 4). Živčák (2015) hodnotí *PI* ako parameter, ktorý zoskupuje tri navzájom nezávislé parametre: množstvo reakčných centier, ktoré sú plne funkčné, ďalej najvyšší kvantový výťažok PSII a zároveň aj možnosť, že elektrón skutočne vstúpi do transportného elektrónového reťazca. Pri parametri *PI* zistil, že reagoval na teplotný stres citlivejšie v porovnaní s najčastejšie používaným parametrom F_v/F_m. Pri tomto parametri sú zohľadňované aj zmeny, ktoré zasiahli PSII len nepriamo a vyznačoval sa, aj pri štúdii s rôznymi odrodami pšenice, veľkou medzigenotypovou variabilitou.

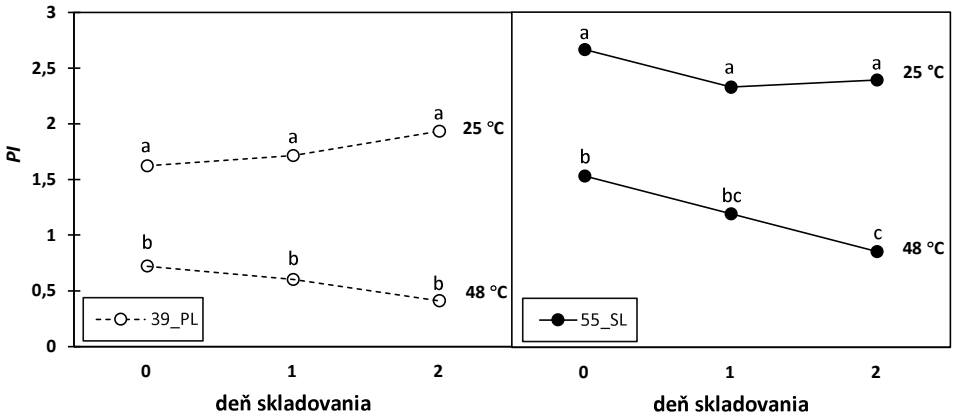


Obr. 3 Počet aktívnych reakčných centier (RC/ABS) v deň odberu a 1 resp. 2 dni po odbere. Hodnoty merané pri teplote 25 °C a 48 °C, zvlášť pre provenienciu 39_PL a 55_SI. Odlišné písmená označujú významnosť rozdielov na hladine α=0,05.
Fig. 3 Number of active reaction centers (RC/ABS) measured on the day of sampling, the first and the second day after sampling, respectively. Values were measured at teplerature of 25 °C and 48 °C, separately for provenance 39_PL and 55_SI. Different letters indicate the differences at significance level of α=0,05.

V nestresujúcich podmienkach sa nenašli štatisticky významné rozdiely v množstve reakčných centier PSII a indexe výkonnosti medzi rôznymi dňami merania. Vplyv skladovania na nestresované vzorky nebol významný a preto by bolo možné realizovať merania dní po odbere. Po vystavení supraoptimálnym teplotám sú však rozdiely v počte aktívnych reakčných centier a indexe výkonnosti medzi prvým a tretím dňom merania markantné. Z Obr. 3 a Obr. 4 rovnako vyplýva, že proveniencia 55_SI prosperovala oveľa lepšie v nestresujúcich podmienkach a takisto vykazovala vyššiu mieru termostability PSII v porovnaní s poľskou provenienciou 39_PL.

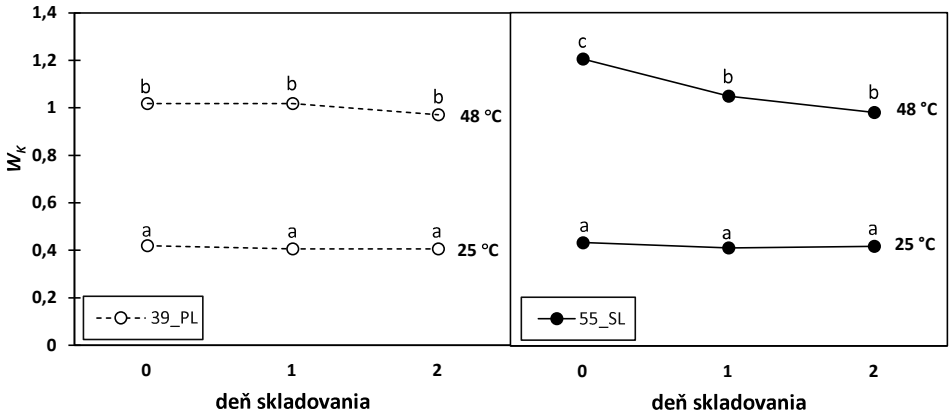
Posledným meraným parametrom je W_K, ktorý je špecifický pri meraní termostability PSII. Objavenie sa ďalšieho vrcholu na fluorescenčnej OJIP krivke v čase asi 0,3 ms (tzv. K-kroku) je totiž jedným z hlavných indikátorov teplotného stresu u rastlín. K-krok naznačuje nezvratné, teplom-indukované poškodenie PSII, a to buď modifikáciou svet-

lozberných komplexov, alebo inhibíciou transportu elektrónov z feofytínu na chinón A. Takisto to môže byť spojené s poškodením kyslík-vyvíjajúceho komplexu (Lazár et al., 1999; Srivastava et al., 1997; Strasser, 1997). Aj v práci Brestica and Zivcaka (2013) sa tento parameter uvádza ako najvhodnejší pre meranie stresu z vysokej teploty, pretože na ostatné stresové faktory nereaguje tak citlivo ako na teplotný stres.



Obr. 4 Index výkonnosti (PI) v deň odberu a 1 resp. 2 dni po odbere. Hodnoty merané pri teplote 25 °C a 48 °C, zvlášť pre provenienciu 39_PL a 55_SI. Odlišné písmená označujú významnosť rozdielov na hladine α=0,05.
Fig. 4 Performance index (PI) measured on the day of sampling, the first and the second day after sampling, respectively. Values were measured at teplerature of 25 °C and 48 °C, separately for provenance 39_PL and 55_SI. Different letters indicate the differences at significance level of α=0,05.

Výskyt K-kroku je teda špecifickým prejavom teplotného stresu a pomocou neho je možné stanoviť v akej miere je PSII poškodený. Hodnota variabilnej fluorescencie v K-vrchole (W_K) sa pri nestresujúcich jedincoch pohybovala v rozmedzí od 0,41−0,44 (Obr. 5), čo korešponduje s hodnotou, ktorú na intaktných jedincoch pšenice popisuje aj Brestič et al. (2010). Hodnoty W_K pri nestresovaných vzorkách z oboch proveniencií vykazujú rovnaké hodnoty počas všetkých troch meraných dní, takže ich môžeme v nestresujúcich podmienkach merať aj počas dlhšieho časového intervalu. Po vystavení teplotnému stresu pri vzorkách z poľskej proveniencie parameter W_K značne stúpol, ale jeho hodnoty sa vplyvom skladovania menia len nevýznamne. Avšak pri slovinskej proveniencii sú rozdiely medzi dňami meraní výraznejšie, kedy v prvý deň reagujú vzorky na stresovú teplotu výraznejšie ako počas ostatných dní. Počas druhého aj tretieho dňa sa hodnoty znivelizovali a nenastali takmer žiadne zmeny medzi druhým a tretím dňom merania. Hodnotenie tohto citlivého parametra môžeme teda robiť spoľahlivo v deň odberu, nakoľko už po prvom dni skladovania dochádza k poklesu a vyrovnávaniu hodnôt tohto parametra a tým by mohla byť spôsobená odchýlka od reálnych hodnôt pri testovaní termostability PSII. Pri nestresovaných vzorkách sa hodnoty W_K výrazne nemenia.



Obr. 5 Hodnota variabilnej fluorescencie v K-vrchole (W_K) v deň odberu a 1 resp. 2 dni po odbere. Hodnoty merané pri teplote 25 °C a 48 °C, zvlášť pre provenienciu 39_PL a 55_SI. Odlišné písmená označujú významnosť rozdielov na hladine α=0,05.
Fig. 5 The value of variable fluorescence in the K-step (W_K) measured on the day of sampling, the first and the second day after sampling, respectively. Values were measured at teplerature of 25 °C and 48 °C, separately for provenance 39_PL and 55_SI. Different letters indicate the differences at significance level of α=0,05.

ZÁVER

Stres z vysokej teploty je faktorom, ktorý čoraz viac zasahuje do fyziologických procesov drevín. Je preto zaujímavým podnetom pre výskumy a pre hľadanie nových spôsobov, ktorými by bolo možné identifikovať odolnejšie a lepšie adaptované genotypy.

Meranie rýchlej kinetiky fluorescencie chlorofylu *a* je v dnešných časoch veľmi využívaná metóda pri posúdení miery teplotného stresu. Je dobre rozvinutá a vhodne zabezpečená technickými prostriedkami a umožňuje teda poskytovať veľké množstvo informácií, ktoré môžeme pri správnom nastavení výskumu a meraní získať. Hoci je používanie metódy rýchlej kinetiky fluorescencie chlorofylu *a* bežné, je potrebné, aby sme brali do úvahy aj obmedzenia, ktoré sa týkajú tejto metódy. Jedným z hlavných obmedzení v terénnych podmienkach je to, že mnohokrát je vzorky potrebné analyzovať počas viacerých dní. Zaujímavým aspektom je preto sledovanie vplyvu skladovania asimilačných orgánov na presnosť a dôveryhodnosť získaných výsledkov. V rámci predloženej práce sme sa preto snažili zistiť, ako významne ovplyvňuje skladovanie zmeny hodnôt parametrov rýchlej kinetiky fluorescencie chlorofylu *a*. Potvrdilo sa, že pri nestresujúcich podmienkach je možné meranie počas všetkých troch dní, pričom nedochádza k významnej zmene parametrov ani po dvoch dňoch skladovania. Pri stresovaných vzorkách je však spoľahlivé meranie možné maximálne deň po odbere. Zvlášť viditeľné to bolo pri parametri W_K, pri ktorom došlo k takmer úplnému vyrovnaniu hodnôt už po prvom dni skladovania, pričom tieto merania by sa nemohli spoľahlivo realizovať počas viacerých dní.

LITERATÚRA

Ashraf, M., Harris, P.J.C., 2013. Photosynthesis under stressful environments: An overview. Photosynthetica 51, 163–190. doi:10.1007/s11099-013-0021-6

Bertini, G., Amoriello, T., Fabbio, G., Piovosi, M., 2011. Forest growth and climate change: evidences from the ICP-Forests intensive monitoring in Italy. IForest - Biogeosciences For. 4, 262. doi:10.3832/ifor0596-004

Bilger, H.W., Schreiber, U., Lange, O.L., 1984. Determination of leaf heat resistance: comparative investigation of chlorophyll fluorescence changes and tissue necrosis methods. Oecologia 63, 256–262.

Björkman, O., Demmig-Adams, B., 1995. Regulation of Photosynthetic Light Energy Capture, Conversion, and Dissipation in Leaves of Higher Plants, in: Schulze, P.D.E.-D., Caldwell, P.D.M.M. (Eds.), Ecophysiology of Photosynthesis, Springer Study Edition. Springer Berlin Heidelberg, pp. 17–47. doi:10.1007/978-3-642-79354-7_2

Brestič, M., Olšovská, K., Pivková, J., 2010. Bioindikácia termotolerancie fotosyntetického aparátu pšenice ozimnej (Triticum aestivum L.). Acta Fytochemica Zootech. 67–71.

Brestic, M., Zivcak, M., 2013. PSII Fluorescence Techniques for Measurement of Drought and High Temperature Stress Signal in Crop Plants: Protocols and Applications, in: Rout, G.R., Das, A.B. (Eds.), Molecular Stress Physiology of Plants. Springer India, India, pp. 87–131. doi:10.1007/978-81-322-0807-5_4

Brestič, M., Živčák, M., Olšovská, K., Repková, J., 2013. Involvement of chlorophyll a fluorescence analyses for identification of sensit iveness of the photosynthetic apparatus to high temperature in sel ected wheat genotypes, in: Kuang, T., Zhang, L., Lu, C. (Eds.), Photosynthesis Research for Food, Fuel and the Future. Zhejiang Univ. Press Springer, Hangzhou.

Briantais, J.M., Dacosta, J., Goulas, Y., Ducruet, J.-M., Moya, I., 1996. Heat stress induces in leaves an increase of the minimum level of chlorophyll fluorescence, Fo: A time-resolved analysis. Photosynth. Res. 48, 189–196. doi:10.1007/BF00041008

Ciais, P., Reichstein, M., Viovy, N., Granier, A., Ogée, J., Allard, V., Aubinet, M., Buchmann, N., Bernhofer, C., Carrara, A., Chevallier, F., Noblet, N.D., Friend, A.D., Friedlingstein, P., Grünwald, T., Heinesch, B., Keronen, P., Knohl, A., Krinner, G., Loustau, D., Manca, G., Matteucci, G., Miglietta, F., Ourcival, J.M., Papale, D., Pilegaard, K., Rambal, S., Seufert, G., Soussana, J.F., Sanz, M.J., Schulze, E.D., Vesala, T., Valentini, R., 2005. Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. Nature 437, 529–533. doi:10.1038/nature03972

Gömöry, D., 2011. Súčasné rozšírenie buka lesného v Európe. Buk Bukové Ekosystémy Slov. 636.

Gömöry, D., Ditmarová, Ľ., Hrivnák, M., Jamnická, G., Kmeť, J., Krajmerová, D., Kurjak, D., 2015. Differentiation in phenological and physiological traits in European beech (Fagus sylvatica L.). Eur. J. For. Res. 134, 1075–1085. doi:10.1007/s10342-015-0910-2

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 Environ. 27, 1169–1183.

Koppe, C., Kovats, S., Jendritzky, G., Menne, B., 2004. Heat waves: risks and responses, 2nd ed. Regional Office for Europe, World Health Organization.

Lazár, D., Pospíšil, P., Nauš, J., 1999. Decrease of fluorescence intensity after the K step in chlorophyll a fluorescence induction is suppressed by electron acceptors and donors to photosystem 2. Photosynthetica 2, 255–265.

Olšovská, K., Živčák, M., Hunková, E., Dreveňáková, P., 2013. Assessment of the photosynthesis-related traits and high temperature resistance in tetraploid wheat (Triticum L.) genotypes. J. Cent. Eur. Agric. 14, 289–302. doi:10.5513/JCEA01/14.2.1261

Pastenes, C., Horton, P., 1996. Effect of High Temperature on Photosynthesis in Beans (I. Oxygen Evolution and Chlorophyll Fluorescence). Plant Physiol. 112, 1245–1251.

Pospíšil, P., Skotnica, J., Nauš, J., 1998. Low and high temperature dependence of minimum F0 and maximum FM chlorophyll fluorescence in vivo. Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg. 1363, 95–99. doi:10.1016/S0005-2728(97)00095-9

Song, Y., Chen, Q., Ci, D., Shao, X., Zhang, D., 2014. Effects of high temperature on photosynthesis and related gene expression in poplar. BMC Plant Biol. 14, 111. doi:10.1186/1471-2229-14-111

Srivastava, A., Guissé, B., Greppin, H., Strasser, R.J., 1997. Regulation of antenna structure and electron transport in Photosystem II of Pisum sativum under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll a fluorescence transient: OKJIP. Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg. 1320, 95–106. doi:10.1016/S0005-2728(97)00017-0

Stirbet, A., Govindjee, 2011. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. J. Photochem. Photobiol. B 104, 236–257. doi:10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010

Strasser, B.J., 1997. Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients. Photosynth. Res. 52, 147–155. doi:10.1023/A:1005896029778

Yamane, Y., Kashino, Y., Koike, H., Satoh, K., 1998. Effects of high temperatures on the photosynthetic systems in spinach: Oxygen-evolving activities, fluorescence characteristics and the denaturation process. Photosynth. Res. 57, 51–59. doi:10.1023/A:1006019102619

Yamasaki, T., Yamakawa, T., Yamane, Y., Koike, H., Satoh, K., Katoh, S., 2002. Temperature acclimation of photosynthesis and related changes in photosystem II electron transport in winter wheat. Plant Physiol. 128, 1087–1097.

Živčák, M., 2015. Využitie nedeštrukčných metód pri štúdiu účinkov sucha a vysokej teploty na fotosyntetický aparát (Habilitačná práca). Slovenská poľnohospodárska univerzita, Nitra.

Uvedená práca vznikla s finančnou podporou projektov *VEGA č. 2/0034/14*, *APVV-0744-12* a *APVV-0480-12*.

Adresa autorov:

Bc. Hana Húdoková
Mgr. Alena Konôpková
Ing. Daniel Kurjak, PhD.
Fakulta integrovanej ochrany lesa a krajiny
Lesnícka fakulta
Technická Univerzita vo Zvolene
T. G. Masaryka 24
960 01 Zvolen
e-mail: hhudokova@gmail.com
e-mail: alena.konopkova@tuzvo.sk
e-mail: kurjak@tuzvo.sk

The possibilities of using of fast kinetic of chlorophyll *a* fluorescence for the assessment of PSII thermostability, on the example of European beech

SUMMARY

Measuring of chlorophyll *a* fluorescence is used for evaluating primary photochemical processes, often in relation with stress from high temperature. Evaluating of fast kinetics of fluorescence (OJIP curves) is relatively fast and cheap, which allows us to measure larger set of plants in comparison with most other physiological parameters. However, when there is a large number of samples (in case of multiple variants and many different simulated temperatures) the measuring may take over several days. The second option is to collect samples every day, which brings complications, especially when collecting outside of Slovakia. Therefore, we measured the sensibility of fluorescence parameters in the day of sampling and for next two days. We evaluated the reliability of measurements at non-stressing temperature (25°C) and at supraoptimal temperature of 48°C. Leaves of European beech with different origin (two provenances) but growing on the same plot were measured in order to find out, whether they react comparatively. When measuring at non-stressing environment (25°C), we did not detect any statistically significant differences even after two days of storage. However, the changes in thermostability occurred. Although we did not find out many significant changes during the first day after sampling, two days after the sampling, significant decrease of thermostability of individuals with origin in Slovenia was measured. There was just moderate effect on individuals originating from Poland, where only two of five measured parameters were statistically significant. When comparing the provenances, we found out, that differences in thermostability were significant only for the first and second day after collection, but not for the third day. Differences in so-called K-step of curve were identified only in the day of collection. Therefore, we are able to measure the collected material for three days in non-stress conditions. For the test of thermostability, we can measure leaves one day after sampling, but the measurement of K-step have to be done during the day of sampling.