

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Katedra experimentální biologie rostlin



Bc. Anna Šafránková

**Markery fyziologického stavu borovice ve vztahu ke
genetické variabilitě**

Markers of pine physiological state in relation to genetic variability

Diplomová práce

Školitelka: Prof. RNDr. Jana Albrechtová Ph.D.

Praha, 2016

Školitelka diplomové práce:

Prof. RNDr. Jana Albrechtová Ph.D., Katedra experimentální biologie rostlin PřF UK

Konzultanti diplomové práce:

Mgr. Zuzana Lhotáková, Ph.D., Katedra experimentální biologie PřF UK

RNDr. Dana Holá, Ph.D., Katedra genetiky a mikrobiologie PřF UK

Prof. Ing. Milan Lstibůrek MSc., Ph.D., Katedra genetiky a fyziologie lesích dřevin, Fakulta
lesnická a dřevařská, Česká zemědělská univerzita

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením Prof. RNDr. Jany Albrechtové Ph.D. a za konzultace Mgr. Zuzany Lhotákové, Ph.D, RNDr. Dany Holé, Ph.D a Prof. Ing. Milana Lstibůrka MSc., Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Souhlasím se zveřejňováním práce.

V Praze, dne

Podpis

Poděkování:

V první řadě bych chtěla poděkovat mojí školitelce Prof. RNDr. Janě Albrechtové Ph.D. za podnětné rady, podporu a vedení mé práce a Mgr. Zuzaně Lhotákové, Ph.D. za cenné rady, inspirativní nápady a podporu při psaní práce.

RNDr. Daně Holé, Ph.D. za cenné a podnětné rady týkající se fluorescence.

Prof. Ing. Milanu Lstibůrkovi MSc., Ph.D. a jeho kolektivu (především Ing. Janu Stejskalovi, Ph.D.) za cenné rady týkající se genetiky lesních dřevin.

Ing. Janu Kaňákovi Ph.D. za cenné informace o semenných sadech Doubrava a Silov a pomoc při terénních odběrech.

Mgr. Drahomíře Bartákové a Miroslavu Bartákovi za poučné rady a pomoc při laboratorním zpracování mých vzorků a celému kolektivu laboratoře 207 za cenné rady a přátelské a příjemné pracovní prostředí.

Dále bych chtěla poděkovat kolektivu laboratoře Genetiky rostlin a ostatním, kteří pomáhali při zpracování terénních odběrů.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mojí rodině, především mému milovanému muži, a přátelům za neochvějnou podporu a důvěru.

Abstrakt

Šlechtění jehličnatých stromů prochází v České republice v posledních desetiletích významným rozvojem, především díky molekulárně genetickým metodám, které zpřesňují a zjednodušují zmapování genotypů stromů a výběr elitních jedinců. Zatím se ovšem v ČR vybírají elitní jedinci pouze podle lesnických parametrů (jako je výška a tloušťka kmene nebo kvalitní tvárnost kmene), které ne vždy korelují se schopností stromu odolávat abiotickým a biotickým stresům. Recentně je snaha do výběrových kritérií při šlechtění jehličnatých stromů zařadit i fyziologické metody a výběr elitních jedinců provádět i podle nesespecifických indikátorů stresu, které dokáží mnohem lépe postihnout fyziologickou zdatnost stromu, než lesnické růstové parametry.

Výzkum této práce probíhal na genotypech borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.), které se nacházejí v semenných sadech Doubrava a Silov v Plzeňském kraji v České republice. Semenné sady jsou výsadby stromů, které slouží ke sběru geneticky hodnotného reprodukčního materiálu, jsou tedy součástí šlechtitelských programů. Na jehlicích borovic, odebraných v červenci roku 2015, byla provedena analýza nesespecifických indikátorů stresu -obsahu fotosyntetických pigmentů, fenolických látek, ligninu, celulózy a prolinu a byla změřena odrazivost a rychlá kinetika fluorescence chlorofylu *a*. Prvním cílem práce bylo porovnat fyziologické parametry genotypů stromů v semenném sadu Silov se stejnými genotypy stromů v semenném sadu Doubrava, který má v půdě nižší obsah dusíku a hořčíku. Druhým cílem práce bylo porovnat míru variability u stejných a různých genotypů v semenném sadu Silov a Doubrava.

Na stromy v semenných sadech se neprokázal vliv žádných stresových podmínek, nicméně hodnoty vegetačních indexů a fluorescenčních parametrů reagovaly na nižší dostupnost živin v semenném sadu Doubrava. To ukazuje na vyšší citlivost metod měření fluorescence a odrazivosti, než metod biochemické analýzy. U některých fyziologických parametrů byl prokázán nižší rozptyl u stejných genotypů než u různých genotypů, což ukazuje na geneticky podmíněnou variabilitu mezi genotypy v těchto parametrech.

To, že byla v některých sledovaných parametrech prokázána geneticky podmíněná variabilita, která je detekovatelná i v nestresových podmínkách je důkazem pro to, že se dané parametry dají využít při šlechtění. Vhodnějšími fyziologickými parametry pro šlechtění se zdají být vegetační indexy a fluorescenční parametry než metody biochemické analýzy, protože jsou citlivé i v podmínkách, které nejsou pro stromy stresové.

Klíčová slova: Semenné sady, genotypy, šlechtění, fotosyntetické pigmenty, fenolické látky, lignin, celulóza, prolin, odrazivost listu, fluorescence, vegetační indexy.

Abstract

Breeding of coniferous trees in the Czech Republic is undergoing an important development during last decades, especially thanks to molecular-genetic methods, which refine and simplify mapping of tree genotypes and the selection of superior genotypes. Recently, in the Czech Republic superior genotypes are selected based on forestry parameters (tree height, trunk diameter, and timber quality) what does not always correlate with the ability of a tree to resist abiotic and biotic stresses. Recently, there is an effort to include in the breeding also physiological parameters and select superior genotypes using nonspecific stress indicators, which are able to correspond better to tree fitness than the forestry growth parameters.

The present thesis deals with genotypes of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) growing in seed orchards Doubrava and Silov in the Pilsen region in the Czech Republic. Seed orchards are tree plantations, which serve as a reserve of the genetically valuable reproduction material, they are parts of breeding programs. Pine needles were collected in July 2015 and analyzed for non-specific stress indicators – photosynthetic pigments, phenolics, lignin, cellulose and proline contents and leaf reflectance and fast chlorophyll fluorescence measurements. First objective of the present thesis was to compare physiological parameters of the same genotypes growing in both seed orchards. The seed orchard Doubrava has got a lower content of soil nitrogen and magnesium comparing to the soil of the seed orchard Silov. the second objective of my thesis was to compare a measure of variability in followed parameters for the same and different genotypes in both seed orchards.

Trees in both seed orchards did not exhibit stress conditions, however, values of vegetation indices and fluorescence parameters responded to a lower nutrient accessibility in soil in the Doubrava orchard. It seems that methods of fluorescence and leaf reflectance measurements have higher responsiveness than methods of biochemical analysis. Some physiological parameters had a lower variance in trees of the same genotypes than in trees of different genotypes what refers to a genetic-determined variability in these parameters among genotypes.

The fact, that genetic-determined variability was proved in some of monitored physiological parameters in non-stress conditions, is important for applicability of these parameters in breeding programs of trees. More suitable physiological parameters for breeding seem to be vegetation indices and fluorescence parameters rather than methods of biochemical analysis because of their responsiveness even in non-stress conditions.

Key words: Seed orchards, genotypes, breeding, photosynthetic pigments, phenolics, lignin, cellulose, prolin, leaf reflectance, fluorescence, vegetation indeces.

Obsah

Seznam zkratk	10
1 Úvod	12
1.1 Cíle práce	13
1.2 Hypotézy	13
2 Literární úvod	15
2.1 Borovice lesní	15
2.2 Šlechtění borovice lesní v České republice	16
2.2.1 Semenné sady	17
2.2.2 Genetické markery	18
2.2.3 Využití fyziologických indikátorů ve šlechtění lesních dřevin	19
2.3 Nespecifické indikátory stresu	20
2.3.1 Fotosyntetické pigmenty	20
2.3.2 Fenolické látky	22
2.3.3 Lignin	23
2.3.4 Celulóza	24
2.3.5 Prolin	25
2.3.6 Odrazivost	26
2.3.6.1 Základní principy odrazivosti	26
2.3.6.2 Vegetační indexy	27
2.3.6.3 Využití vegetačních indexů	28
2.3.7 Fluorescence	30
2.3.7.1 Rychlá kinetika fluorescence chlorofylu a	30
2.3.7.2 Fluorescenční parametry popisující OJIP křivku	32
2.3.7.3 Využití fluorescence při měření vlivu stresu na rostlinu	33
2.4 Význam vnitrodruhové variability fyziologických parametrů pro šlechtění	34
3 Materiál a metody	37
3.1 Materiál a stanoviště	37
3.1.1 Semenné sady	37
3.1.2 Studované Genotypy	38
3.1.3 Odběr půdy	38
3.2 Terénní odběry	42

3.3	Metody výzkumu – stanovení fyziologických parametrů jehlic	42
3.3.1	Rychlá kinetika fluorescence PSII	42
3.3.2	Reflektance a stanovení vegetačních indexů	43
3.3.3	Analýza obsahu fotosyntetických pigmentů	45
3.3.4	Analýza obsahu fenolických látek	46
3.3.5	Analýza obsahu ligninu	47
3.3.6	Analýza obsahu celulózy	48
3.3.7	Analýza obsahu prolinu	48
3.4	Meteorologická data	49
3.5	Statistické metody	49
4	Výsledky	51
4.1	Meteorologická data	51
4.2	Rozbor půdy	53
4.3	Výsledky prvního cíle	55
4.4	Výsledky druhého cíle:	60
5	Diskuse	71
5.1	Diskuse použití metodických postupů	71
5.2	Diskuse návrhu experimentu	72
5.3	Diskuse experimentálních výsledků	74
5.3.1	Popis stanovišť	74
5.3.2	Výsledky prvního cíle	75
5.3.3	Výsledky druhého cíle	79
5.4	Přínos práce	80
6	Závěry	83
6.1	Cíl 1 a hypotéza 1:	83
6.2	Cíl 2 a hypotéza 2:	84
7	Seznam literatury	85

Seznam zkratek

- A – (Absorbance) - Absorbance
- ABS/RC – Průměrný tok absorpce na RC, neboli zdánlivá velikost antény PSII
- ATP - (Adenosine triphosphate) - Adenosintrifosfát
- BwB - (Breeding without breeding) - Šlechtění bez šlechtění
- CRI700 – (Carotenoid concentration index)
- ČHMÚ – Český hydrometeorologický úřad
- D_{I_0}/RC – Tok disipované energie vyjádřený na jedno RC PSII
- DNA - (Deoxyribonucleic acid) - Deoxyribonukleová kyselina
- ET_0/RC – Tok elektronů z Q_A na Q_B
- F_0 – Minimální fluorescence
- F_I – Intenzita fluorescence v bodě I OJIP křivky
- F_J – Intenzita fluorescence v bodě J OJIP křivky
- F_K – Intenzita fluorescence v bodě K OJIP křivky
- F_M (F_P) – Maximální fluorescence
- F_V - (Variable fluorescence) - Variabilní fluorescence
- F_V/F_M , ϕ_{P0} – Maximální kvantový výtěžek PSII
- Kar/Chl – Poměr množství karotenoidů a chlorofylu
- LČR - Lesy České republiky
- M_0 – Odhad směrnice relativní variabilní fluorescence V_t v okolí bodu O na OJIP křivce
- Macc01 – (Maccioni 01)
- NDCI - (Normalized difference chlorophyll index)
- NDVI - (Normalized difference vegetation index) - Normalizovaný diferenční vegetační index
- NDVI_{re} – (Normalized difference VI – red edge)
- NDWI - (Normalized difference water index) - Normalizovaný diferenční vodní index
- NIR - (Near infrared region) - Blízká infračervená oblast
- PI_{ABS} – Performační index konzervace energie od fotonů ke Q_B
- PI_{TOTAL} - Performační index konzervace energie od fotonů až k PSI
- PQ - (Plastoquinone) - Plastochinon
- PRI - (Photochemical reflectance index)

PRIm1 – (Modified photochemical reflectance index)

PSI - (Photosystem I) - Fotosystém I

PSII - (Photosystem II) - Fotosystém II

PSSRa - Pigment Specific Simple Ratio

Q_A – (Plastoquinone Q_A) – Plastochinon Q_A

Q_B – (Plastoquinone Q_B) – Plastochinon Q_B

R – (Reflectance) - Reflektance

RC – (Reaction centre) – Reakční centrum

RE_{01}/RC - Tok elektronů z Q_A až na PSI

REIP – (Red edge inflection point)

RGI – (Red/green index)

ROSAVI - Revised OSAVI

SSLPs - (Simple sequence length polymorphisms)

SSRs - (Simple sequences repeats)

STRs - (Short tandem repeats) - Krátká tandemová opakování

TCARI/OSAVI – (Transformed cab absorption in reflectance index/optimized soil adjusted vegetation index)

TR_0/RC – Maximální tok energie zachycený PSII

UV - (Ultraviolet) – Ultrafialové

ÚKZÚZ - Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

V_I - (Relative variable fluorescence) – Relativní variabilní fluorescence v bodě I

V_J - (Relative variable fluorescence) – Relativní variabilní fluorescence v bodě J

V_t - (Relative variable fluorescence) – Relativní variabilní fluorescence v čase t

ZM – (Zarco a Miller)

δ_{RE01} - Efektivita/ pravděpodobnost, s jakou bude elektron přenesen z Q_B až k PSI

γ_{RC} – Pravděpodobnost, že chlorofyl v PSII funguje jako RC

ϕ_{D0} – Kvantový výtěžek disipace zachycené energie

ϕ_{E0} – Kvantový výtěžek transportu elektronů z Q_A do Q_B

$\phi_{P0}, F_V/F_M$ – Maximální kvantový výtěžek PSII

ϕ_{RE01} - Kvantový výtěžek transportu elektronů až k PSI

ψ_{E0} – Efektivita/ pravděpodobnost, s jakou bude elektron přenesen z Q_A do Q_B

ψ_{RE0} - Efektivita/ pravděpodobnost, s jakou bude elektron přenesen až k PS

1 Úvod

Moje práce se zabývá semennými sady, tedy výsadbou stromů, jejichž semena budou za několik generací využita na výsadbu lesa. V úvodu se tedy zmíním o významu lesních ekosystémů.

K nejdůležitějším funkcím lesa z hlediska globálního koloběhu uhlíku patří fixace atmosférického oxidu uhličitého v procesu fotosyntézy a ukládání uhlíku do biomasy. Schopnost fixace atmosférického oxidu uhličitého, jako jedné z nejvýznamnějších ekosystémových služeb, nabývá na významu především v dnešní době, kdy koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře stoupá v důsledku antropogenní činnosti. Oxid uhličitý jako skleníkový plyn přispívá k projevům globální klimatické změny a lesy tak mohou zmírňovat její účinky. Další důležitá klimatická funkce lesa je ochlazování okolí vlivem evapotranspirace, a tedy podpora malého vodního koloběhu v krajině. Tato funkce je opět důležitá především do budoucna, protože se roční průměrná teplota neustále zvyšuje a zásoby vody se zužují. Neméně důležitou funkcí lesa je uchování úrodnosti půdy zabraňováním erozi a zachování biodiverzity poskytováním úkrytu ostatních organismů. Z pohledu lidské civilizace nelze zanedbat funkci hospodářskou, tedy poskytování surovin - dřeva, lesních plodin a mnoho dalšího a nesmíme opomenout ani funkci rekreační.

Pro lepší pochopení významu lesa poslouží koncept vytvořený Robertem Constanzou (1997), zabývající se službami ekosystémů. Služby ekosystémů jsou zde podle různých modelů vyjadřovány v peněžních hodnotách. Podrobně jsou služby lesních ekosystémů popsány například ve finské studii (Matero a Saastamoinen, 2007), kde shrnuli roční hodnotu lesních ekosystémů ve Finsku na 2609 miliard eur, nebo v studii oblasti Qinba v Číně (Li et al., 2006), kde je hodnota lesních ekosystémů vypočítána na přibližně 134 tisíc US dolarů za hektar lesa. V těchto finančních odhadech právě klimatizační funkce lesa hraje významnou roli. Nicméně finanční oceňování služeb má řadu metodických úskalí, které nejsou vyřešeny a bude obtížné je vyřešit i vzhledem k proměnlivosti kurzů měn a ekonomické a politické situaci, která významně podmiňuje situaci ekonomickou.

Lesy ovšem nejsou neměnný ekosystém a citlivě reagují na změny podnebí, které se v poslední době udály a dějí. Morin et al. (2008) vytvořili model, který ukazuje posun některých z 16 sledovaných druhů stromů v rámci Severní Ameriky z jihu směrem na sever díky častějším obdobím sucha. Vlivem klimatických změn, kdy se zvyšuje výskyt extrémních

meteorologických událostí, můžeme očekávat ještě rapidnější změny v druhovém složení lesa. V tomto kontextu tedy získávají na významu právě programy šlechtění stromů, které nám pomohou vybrat odolné genotypy stromů, které dokáží přežít v extrémních klimatických podmínkách a zachovají tak lesní ekosystém i do dalších generací.

V dnešní době je šlechtění jehličnatých stromů pomocí semenných sadů v České republice v počátcích, díky tomu, že se jedná o velmi dlouhodobý proces z hlediska délky lidského života. Výběr stromů se ovšem zaměřuje pouze na lesnické parametry jako je výška a tloušťka kmene či kvalitní tvárnost kmene. Fyziologické parametry, které lépe charakterizují odolnost stromu proti abiotickým i biotickým stresům zatím do procesů šlechtění nebyly v České republice začleněny. Hlavním cílem mé práce je tedy propojení klasického lesnického šlechtění borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.) s analýzou biochemických a dalších stresových markerů, které mohou do budoucna sloužit jako další selekční nástroj při šlechtění jehličnanů. Mým druhým cílem je sledování vlivu prostředí s různým složením půdy na borovici lesní pomocí analýzy stresových markerů. To, že má borovice vysokou variabilitu nejen mezi druhy, ale i variabilitu mezi různými genotypy jedinců stejného druhu, ztěžuje interpretaci výsledků pozorování. Pozorování vlivu prostředí na soubor jedinců stejného genotypu by tedy mělo přispět k eliminaci tohoto problému.

1.1 Cíle práce

- 1) Porovnat fyziologické parametry u souboru jedinců se stejným genotypem ve dvou prostředích s různými půdními podmínkami v semenných sadech Doubrava a Silov.
- 2) Porovnat, jak se liší míra variability fyziologických parametrů u různých genotypů stromů se stromy stejného genotypu v semenných sadech Doubrava a Silov.

1.2 Hypotézy

- 1) U stromů v semenném sadu Doubrava se projeví změna sledovaných fyziologických parametrů reagující na nižší dostupnost živin (zejména dusíku a hořčíku) oproti stromům ze semenného sadu Silov.

- 2) Stromy stejného genotypu budou mít na daném stanovišti nižší variabilitu ve sledovaných fyziologických parametrech než skupina stromů s různými genotypy.

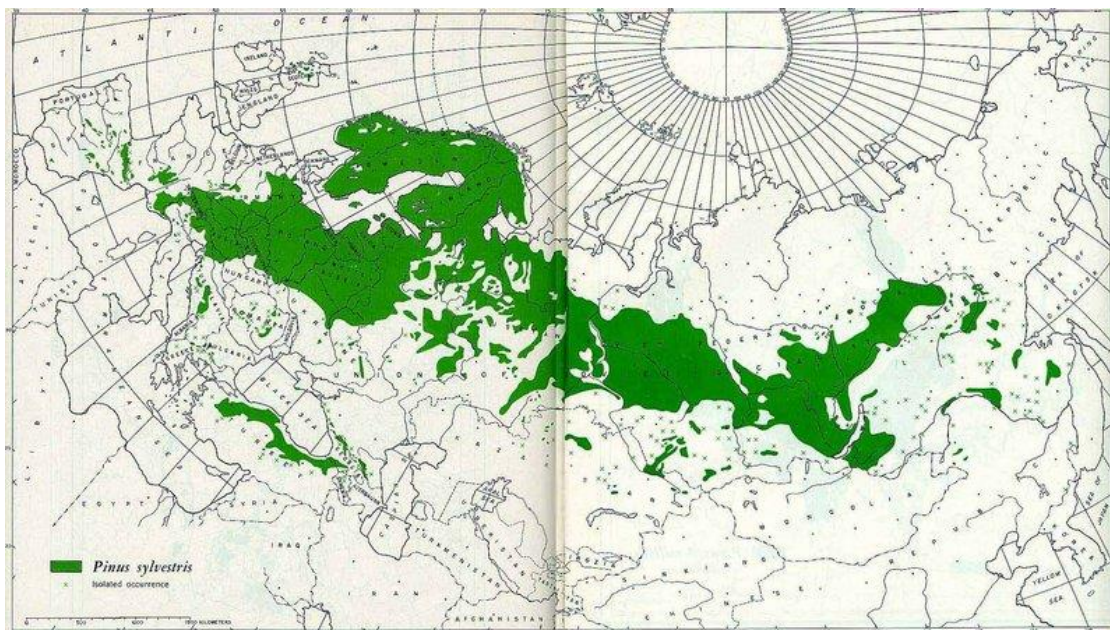
2 Literární úvod

2.1 Borovice lesní

Borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.) patří do oddělení nahosemenné (*Pinophyta*) čeledi borovicovité (*Pinaceae*). Rod borovice (*Pinus*) obsahuje nejvíce druhů ze všech jehličnatých dřevin a samotná borovice lesní se rozděluje na několik ekotypů, které někteří autoři vyčleňují jako samostatné druhy nebo poddruhy.

Důvodem takové variability je velmi široký areál rozšíření (Obrázek 1). Borovice lesní se vyskytuje téměř po celé Eurasii. Její výskyt přesahuje severní polární kruh ve Skandinávii, dosahuje na jih až k pohoří Sierra Nevada ve Španělsku, nejzápadněji se vyskytuje ve Skotsku a dále je rozšířen na východ přes Sibiř až k Ochotskému moři (Kaňák, 2011).

Obrázek 1: Areál rozšíření borovice lesní (převzato z Critchfield a Little Jr., 1966), zelenou barvou je označen areál rozšíření.

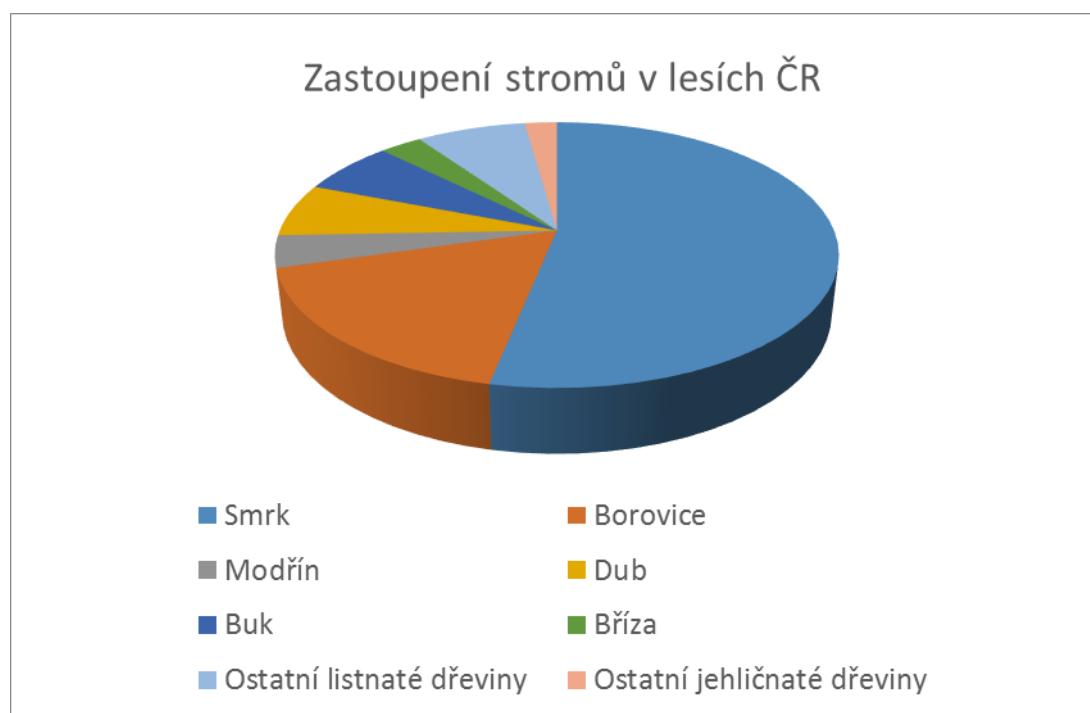


Z výše zmíněného vyplývá, že borovice lesní nemá moc velké ekologické nároky na prostředí a klima. V České republice je původně tzv. borovice reliktní (*Pinus sylvestris montana*), která na našem území přečkala dobu ledovou v jednotlivých ostrůvcích, nacházejících se především v horských pásmech. Tato borovice roste zejména v extrémních stanovištích, na suchých písčítých a skalnatých stanovištích nebo na rašeliništích (Svoboda a Pokorný, 1953).

V dnešní době je borovice lesní plnohodnotnou součástí českého lesa. Údaje z roku 2004 ukazují, že borovice je dokonce druhým nejvíce zastoupeným stromem (Obrázek 2) (LČR, 2004). Roste a je vysazována tedy i v jiných než výše zmíněných stanovištích, i když na půdách bohatých na živiny bývá vytlačena jinými stromy.

Borovice lesní je v lesích vysazována díky své odolnosti. Dobře odolává extrémním klimatickým podmínkám, požáru nebo imisím. Díky struktuře svého kořenového systému slouží při zpevňování půdy (Kaňák, 2011). Nesmíme opomenout ani hospodářský význam. Díky svým vlastnostem se dřevo borovice lesní používá na výrobu nábytku, při stavbách na výrobu železničních pražců nebo důlních podpěr.

Obrázek 2.: Zastoupení stromů v lesích ČR (sestrojeno podle dat LČR, 2014)



2.2 Šlechtění borovice lesní v České republice

První pokusy se šlechtěním borovice lesní se váží již na počátek 20. století a byly realizovány formou provenienčních pokusů. Původním cílem provenienčního výzkumu bylo zjistit, z jakého místa je možné dovážet nejkvalitnější osivo borovice lesní s nejvyššími výnosy (Kaňák, 1982). Později se provenienční pokusy rozšířily i o studie zabývající se evolucí daného druhu a areálem/ekosystémem, ve kterém dané populace rostou. V dnešní době se vytvářejí

tzv. šlechtitelské programy. Součástí těchto programů je i zakládání a udržování semenných sadů, které slouží k přenosu genetického zisku vygenerovaného ve šlechtitelském programu do provozních hospodářských výsadeb (Kaňák, 2011).

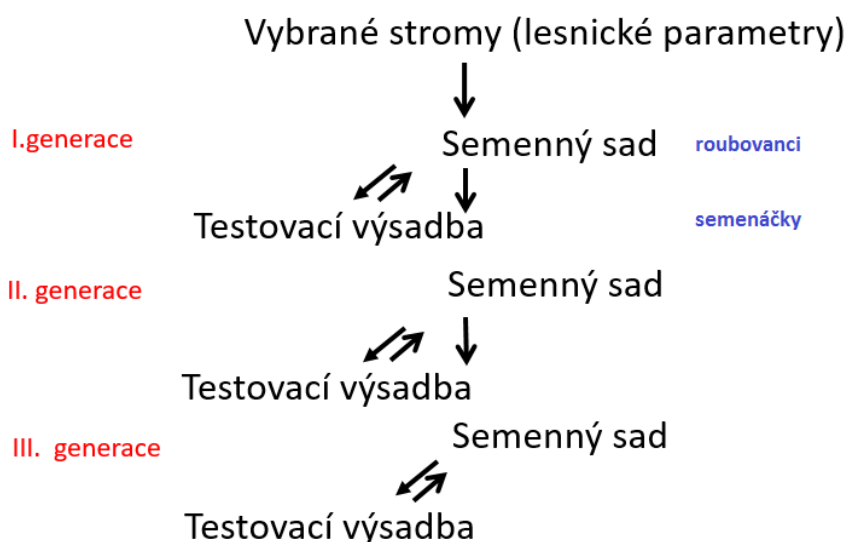
2.2.1 Semenné sady

Semenné sady jsou výsadby stromů, které slouží ke sběru reprodukčního materiálu. Tento reprodukční materiál (zejména osivo) by měl být v dostatečném množství, snadno dostupný a především geneticky hodnotný. Účelem semenných sadů je jednak sloužit jako zdroj hodnotného reprodukčního materiálu pro hospodářské účely, ale také pomoci zachovat genofond ohrožených populací lesních dřevin.

Všechny semenné sady v ČR jsou tzv. klonové semenné sady a jsou zakládány z roubovanců stromů z určité oblasti (Obrázek 3). Roubovanci (ramety), kteří pocházejí z jednoho stromu, tvoří vždy 1 genotyp. V semenném sadu je tedy vždy 1 genotyp (klon) představován více rametami (1 rameta = 1 strom) a to tak, že by se počty ramet každého klonu měly v semenném sadu přibližně shodovat. Rodičovské stromy pro sběr roubů se vybírají podle fenotypových (převážně morfologických) vlastností, které souvisejí s účelem semenných sadů zmíněným výše. Tyto sledované morfologické parametry jsou především zaměřeny na kvalitu a kvantitu dřeva v kmene. Jedná se tedy nejčastěji o výšku kmene, tloušťku kmene a tvárnost kmene (rovný průběžný kmen bez suků a boulovitosti a s vysoko nasazenou korunou se slabšími větvemi) (Kaňák, 2008). Sad založený z těchto roubovanců se nazývá semenný sad I. (první) generace. Po založení semenného sadu je nutné ověřit, zda jsou sledované znaky vybraných stromů geneticky podmíněné. Za tímto účelem se zakládá tzv. testovací výsadba ze semen stromů semenného sadu I. generace. Stromy v testovací výsadbě se označují jako polosesterské potomstvo, protože je obvykle znám pouze genotyp „matky“ (mateřského stromu). Pro další optimální postup je potřeba zjistit i otce stromů v testovací výsadbě a to ověřením genotypu stromů v testovací výsadbě a následným vytvořením jejich rodokmenu. Potomstvo, u kterého je známa matka i otec se nazývá plnosesterské. V poslední fázi se mohou probrat stromy v semenném sadu I. generace (tzv. genetická probírka), ponechat pouze ty, u kterých jsou vybrané vlastnosti geneticky podmíněné a ze semen těchto stromů založit sad II. generace. Čím vyšší stupeň semennému sadu náleží, tím větší mají stromy genetickou hodnotu (Kaňák, 2011; Korecký 2012).

Nejstarší semenné sady v ČR byly zakládány v 70. letech 20. století, ale až od 80. let se začalo sledovat, aby vybrané stromy reprezentovaly konkrétní regionální populace (Kaňák, 2011). Protože šlechtění borovice je dlouhodobý proces, všechny semenné sady v ČR jsou v současnosti I. generace (Kaňák et al., 2009 in Korecký, 2012). V roce 2012 bylo semenných sadů borovice lesní v ČR 37, z nich 24 ve vlastnictví Lesů České republiky (Korecký, 2012). Na dvou z nich (Doubrava a Silov) byl proveden výzkum v experimentální část této práce.

Obrázek 3.: Schéma šlechtění stromů v klonových semenných sadech



2.2.2 Genetické markery

Zmapování genotypů stromů určitého druhu dřeviny v testovacích výsadbách a semenných sadech a následné sestrojení rodokmenu se provádí pomocí genetických markerů. Genetický marker je vyjádřen jakoukoli viditelnou vlastností nebo testovatelným fenotypem, u kterého se alely daného lokusu segregují podle Mendelových zákonů. Genetické markery se dělí do několika skupin. Nejméně využívané jsou morfologické markery, které zahrnují mutace, jako jsou například albinismus jehlic (Franklin, 1970) Na začátku 70. let 20. století se začaly využívat markery biochemické, jako je například složení a zastoupení monoterpenů a alozymů (alelických forem enzymů). Poslední skupinou genetických markerů, která se začala využívat v 80. letech 20. století, jsou molekulární markery, například mikrosatelity (White et al., 2007). Mikrosatelity jsou krátké segmenty DNA, které se opakují, řadí se mezi ně

tzv. krátká tandemová opakování, (short tandem repeats (STRs)), simple sequences repeats (SSRs), nebo simple sequence length polymorphisms (SSLPs) (Robinson a Harris, 1999). Mikrosatelity představují jako genetické markery tu výhodu, že vykazují vysokou variabilitu a nachází se v kódujících i nekódujících sekvencích (Zane et al., 2002). Důležité je, že zmapování genotypů pomocí mikrosatelitů odhalí též míru kontaminace pylem ze stromů mimo semenný sad. Udržet sad co nejméně kontaminovaný pylem zvenčí je zásadní pro zachování genetické „čistoty“ šlechtěné populace (Slavov et al., 2005).

Mikrosatelity pro zmapování genotypu borovic lesních využívají také prof. Milan Lstibůrek a kolektiv, kteří tuto metodu zasadili do kontextu originální strategie s názvem „šlechtění bez šlechtění“ (breeding without breeding, BwB) využitelné ve šlechtitelských programech. Výhodou metodiky BwB je především možnost vyhnout se kontrolovanému opylení a genetickému křížení. Díky tomu je možné ušetřit čas a náklady v rámci šlechtění borovice lesní. U dřevin původem ze subtropických a mírných klimatických podmínek totiž trvá minimálně 15 až 25 let než dosáhnou reprodukční zralosti. U druhů pocházejících ze severovýchodních klimatických podmínek je to dokonce 30 až 80 let (Lstibůrek et al., 2015).

2.2.3 Využití fyziologických indikátorů ve šlechtění lesních dřevin

Šlechtění dřevin bylo vždy založeno na výběru stromů dle fenotypových vlastností, avšak dříve se zaměřovalo pouze na znaky související s výnosem. V poslední době se zájmem šlechtitelů stal i výběr stromů rezistentních proti chorobám a abiotickým stresům, což se jeví důležité obzvláště v souvislosti s probíhajícími klimatickými změnami. Novým trendem se tedy stává propojení lesnické genetiky a stresové fyziologie dřevin využívající metod, které dokáží monitorovat fyziologický stav stromů. Fioranni a Schur (2013) například představují měření fluorescence a reflektance jako možné neinvazivní metody budoucnosti pro mapování fenotypů rostlin a selekci nadprůměrných genotypů. Práci na toto téma je ovšem zatím velmi málo.

Pro zahrnutí fyziologických parametrů do šlechtitelských programů lesních dřevin je nutné zjistit, zdali jsou dané parametry geneticky podmíněné. Například Čepel et al. (2016) se zabýval dědivostí parametrů odvozených od rychlé kinetiky chlorofylu *a* (OJIP test) v testovacích výsadbách borovice lesní a u 15 fluorescenčních parametrů z 18 zjistil v rámci konkrétní populace signifikantní dědivost.

Využití nespecifických indikátorů stresu pro šlechtění (obzvláště měření odrazivosti a fluorescence jako neinvazivních metod) je velmi důležitou oblastí výzkumu s ohledem k budoucnosti. V současné době je však tato metoda v počátcích a její implementace do šlechtitelských programů je stále novinkou.

2.3 Nespecifické indikátory stresu

Jako indikátory stresu jsou považovány biochemické změny, které probíhají v dané rostlině v reakci na určitý stres, jako je sucho, působení abnormálně vysokých nebo nízkých teplot, zasolení a podobně. Tyto změny jsou buď následkem porouchání daného mechanismu vlivem stresu (například rozklad chlorofylu), nebo obrana rostliny za následkem zmírnění účinků stresu (například syntéza prolinu) (Lhotáková a Albrechtová, 2016). Důležitými kritérii indikátorů stresu jsou velikost úměrná velikosti daného stresu, měřitelnost (Ernst a Peterson, 1994), stabilita během ročního a diurnálního cyklu a snadnost a dostupnost získání (Wild a Schmitt, 1995). Protože daný indikátor vždy reaguje na celou řadu stresů a je těžké určit konkrétní vliv prostředí, který na rostlinu působí, označují se indikátory jako nespecifické.

Protože každý rostlinný druh i jedinec v rámci druhu reaguje na nepříznivé podmínky jinou mírou a někdy i jiným způsobem, mohou nespecifické indikátory stresu sloužit při výběru odolných jedinců, kteří se dokáží na daný stres aklimatizovat. Tyto parametry dokáží mnohem více vypovídat o schopnosti rostliny přizpůsobovat se extrémním podmínkám, než pouze lesnické parametry (jako je například tloušťka, výška a tvárnost kmene), které se pro šlechtění borovic lesních používaly do dnešní doby.

V následujících kapitolách nejprve představím nespecifické indikátory stresu, které používám v experimentální části práce (obsah fotosyntetických pigmentů, fenolických látek, ligninu, celulózy, prolinu, vegetační indexy odvozené z odrazivosti jehlic a fluorescenční parametry) a poté bude následovat kapitola o studiu nespecifických indikátorů stresu na různých odrůdách a genotypech jednoho druhu rostlin.

2.3.1 Fotosyntetické pigmenty

Nejběžnějším nespecifickým indikátorem stresu je obsah fotosyntetických pigmentů v listech. Fotosyntetické pigmenty v cévnatých rostlinách představují chlorofyl *a*, chlorofyl *b*

a karotenoidy. Chlorofyly *a* a *b* se nachází ve světlosběrném anténním komplexu, který vychytává fotony a přesouvá jejich energii do reakčního centra fotosystému. Součástí světlosběrného komplexu jsou i karotenoidy jako je β -karoten, lutein a xantofyl, které rozšiřují spektrum záření, které může být světlosběrným komplexem pohlceno. Současně mají karotenoidy ochrannou funkci například proti vysoké ozáření, UV záření nebo mrazu (Ustin et al., 2009). Příkladem je tzv. xantofylový cyklus, při kterém se nadbytečné světelné záření převádí na teplo (Demmig-Adams a Adams, 1996). Díky funkci fotosyntetických pigmentů můžeme pomocí jejich obsahu v listech zjistit fotosyntetickou kapacitu listu.

Obsah fotosyntetických pigmentů v listech reaguje na různé vlivy okolního prostředí, jako je například sucho, nedostatek minerálních živin, znečištěné ovzduší nebo extrémní teploty. Dále se soustředím na reakci jehličnanů na stresové faktory prostředí.

Bylo pozorováno, že u borovic halepských (*Pinus halepensis*) stresovaných nedostatkem vody se snižuje množství chlorofylu *a*, chlorofylu *b* i karotenoidů. Při působení zvýšené koncentrace ozónu se v jehlicích borovic snížilo množství chlorofylu *a*, zatímco množství chlorofylu *b* zůstalo stejné a množství karotenoidů se zvýšilo. Zvýšené množství karotenoidů v jehlicích pravděpodobně souviselo s tím, že karotenoidy působí jako zhášedce volných radikálů. Při stresu suchem a zvýšeným množstvím ozónu se množství chlorofylu *a*, chlorofylu *b* a karotenoidů snížilo (Manes et al., 2001). Snížení obsahu chlorofylu a karotenoidů v jehlicích je obvyklá reakce na stres z nedostatku vody (Ditamova et al., 2009; Pukacki a Kaminska-Rozek, 2005). Přesto může být někdy reakce fotosyntetických pigmentů na stres z nedostatku vody opačná. Po 28 dnech stresu suchem se u borovic (*Pinus tabulaeformis* a *P. yunnanensis*) mírně zvýšilo celkové množství chlorofylu a karotenoidů (Gao et al., 2009).

Obsah fotosyntetických pigmentů se mění také v reakci na nedostatek minerálních živin v půdě. Například v reakci na snížené množství dusíku v půdě se snižuje obsah chlorofylu v jehlicích (Pallardy, 2008). Půda deficientní na hořčík společně se zvýšenou koncentrací ozónu způsobila snížení chlorofylu a karotenoidů u smrku ztepilého (*Picea abies* L.) (Siefertmann-Harms et al., 2004).

V zimních měsících se u borovice lesní (*P. sylvestris* L.) snížilo v rámci mrazového otužování množství chlorofylu *a* i *b* v jehlicích. Jednotlivé druhy karotenoidů reagovaly při procesu otužování různě. Množství zeaxantinu stouplalo, proteiny fotosyntetického aparátu začínaly být obohaceny o lutein a neoxantin, zatímco množství β -karotenu klesalo. Zeaxantin stejně tak lutein a neoxantin slouží v zimních teplotách pravděpodobně jako antioxidanty a působí fotoprotektivně. Klesající množství β -karotenu a chlorofylu souvisí s rozpojením

světlosběrných komplexů a zahrnutím β -karotenu do xantofylového cyklu (Sofronova et al., 2016).

Z předchozích údajů je zřejmé, že obsahy a vzájemný poměr fotosyntetických pigmentů je citlivým nespecifickým indikátorem fyziologického stavu u dřevin rodu *Pinus*.

2.3.2 Fenolické látky

Fenolické látky patří mezi sekundární metabolity. Jak napovídá název, tyto látky byly dříve považovány jako odpady, nebo „chyba“ primárního metabolismu. Později se ovšem přišlo na to, že jsou sekundární metabolity nezbytné pro život rostlin, pro vzájemnou kompetici, ochranu proti patogenům nebo vnějším vlivům prostředí (Bennett a Wallsgrove, 1994).

Fenolické látky jsou strukturně odvozeny od fenolu (benzenové jádro, na které je navázaná hydroxylová skupina). Jsou tvořeny základními fenylpropanovými jednotkami nebo jednotkami odvozenými z šikimátu (Pavlová, 2005). K fenolickým látkám u jehličnanů patří například deriváty kyseliny hydroxyskořicové, flavonoidy a další rozpustné fenoly (Häberle et al., 2009).

Fenolické látky slouží rostlině k ochraně proti patogenům (jako hmyz, houby, nematoda a ostatní herbivoři) (Bennett a Wallsgrove, 1994), v procesu alelopatie (Li et al., 2010), ale také k ochraně proti abiotickým stresům. V této kapitole se zaměřím právě na funkci fenolických látek při ochraně rostliny proti abiotickým stresům.

Syntéza fenolických látek v reakci na sucho se velmi liší podle druhu rostliny i daného jedince. Jednotlivé genotypy borovice lesní se například výrazně liší v množství taxifolinu v jehlicích (Laracine-Pittet a Lebreton, 1988). Odlišně na stres reagují stromy, které rostou ve venkovním prostředí, než stromy, které rostou ve skleníku. Je to dáno tím, že stromy nacházející se ve venkovním prostředí mají obecně větší množství fenolických látek, a proto nemusí na stres reagovat jejich syntézou oproti stromům v uzavřených prostorách (Turtola et al., 2006). Množství fenolických látek závisí také na stáří jehlic, ve studii Räisänen et al. (2008) bylo zaznamenáno vyšší množství fenolických látek v jehlicích letošního roku než v jehlicích loňského roku.

Borovice smolná (*Pinus resinosa*) nakažená houbou *Sphaeropsis sapinea* při stresování suchem syntetizovala méně fenolických látek než borovice nakažená houbou a nestresovaná suchem. Borovice, které byly nakažené se mezi stresovanými a nestresovanými suchem v množství fenolických látek významně nelišily (Blodgett a Stanosz, 1998).

Studie Räisänen et al. (2008) nezaznamenala změnu v množství fenolických látek v jehlicích při zvýšené teplotě ani při zvýšené koncentraci oxidu uhličitého u borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.).

Hnojení (N:P:K) snížilo množství fenolických látek v jehlicích borovice smolné (*Pinus resinosa*) (Blodgett et al., 2005). Naopak při nízkém množství dusíku v půdě se množství fenolických látek v smrku sitka (*Picea sitchensis*) zvýšilo (Wainhouse et al., 1998).

Množství fenolických látek u borovice lesní se v závislosti na ozáření nižším nebo vyšším UV zářením výrazně neměnilo. Prostředí pod filtrem nepropouštějícím záření UVA a UVB ovlivnilo množství pěti z 46 zkoumaných druhů fenolických látek v jehlicích borovic lesních (*Pinus sylvestris* L.), tři druhy fenolických látek vykazovaly snížené množství oproti kontrole a dva druhy naopak zvýšené množství oproti kontrole. Borovice, které rostly pod filtrem nepropouštějícím pouze UVB záření, neměly oproti kontrole rozdílné množství fenolických látek. Celkové množství fenolických látek nebylo ovlivněno ani přidáním filtru nepropouštějícího záření UVB, ani přidáním filtru nepropouštějícího záření UVA a UVB (Martz et al. 2007). Semenáčky borovice lesní a smrku ztepilého (*Picea abies*), které rostly po dobu dvou (u borovice) a tří (u smrku) vegetačních období při zvýšeném záření UVB (o 30% vyšší než u kontroly) neovlivnilo množství fenolických látek v jehlicích (Turtola et al., 2006).

Fenolické látky jsou syntetizovány v reakci na znečištěné ovzduší. U borovice halepské (*Pinus halepensis*) i borovice lesní se zvýšilo množství fenolických látek při zvýšené koncentraci oxidu siřičitého v okolním prostředí. Při zvýšené koncentraci oxidu dusičitého a oxidu dusnatého se množství fenolických látek u borovice halepské v jehlicích naopak snížilo (Pasqualini et al., 2003; Karolewski a Gietrich, 1995 in Pasqualini et al., 2003).

Nutné je mít na paměti, že jednotlivé druhy fenolických látek mohou na daný stres reagovat různě, a proto je nemůžeme brát jako jednoznačný indikátor stresu. Například na hnojení borovice smolná reagovala celkově snížením fenolických látek, ale jednotlivé druhy fenolických látek reagovaly různě (některé svoje množství snížily a některé zvýšily) (Blodgett et al., 2005).

2.3.3 Lignin

Mezi fenolické látky patří také lignin. Je to vysoce větvený polymer složený z fenylypropanoidových jednotek. V rostlinách je součástí buněčné stěny a dodává pletivu pevnost v tlaku i tahu. Po celulóze je to druhá nejčetnější organická látka v rostlinách a tvoří

přibližně 30 % organického uhlíku v biosféře (Boerjan et al., 2003 in Moura et al., 2010; Pavlová, 2005).

Změnou syntézy ligninu rostliny reagují na řadu biotických a abiotických stresů (Moura et al., 2010). Já se dále zaměřím na stres z nedostatku vody, vysokých teplot a z nedostatku živin, zejména dusíku, protože jsou relevantní pro moji práci.

Více prací na téma syntéza ligninu u rostlin stresovaných suchem se zabývá kořeny rostlin, kde se syntéza ligninu při stresu z nedostatku vody zvyšuje (Moura et al., 2010). U listu kukuřice (*Zea mays*) se při stresu z nedostatku vody přesune místo nejvyšší lignifikace (nad elongační zónou) směrem k bázi listu. Současně se celkově sníží lignifikace v celém listu. Vysoká lignifikace při zastavení růstu listu by totiž mohla ohrozit růst listu po rehydrataci rostliny (Vincent et al., 2005). Naopak u listu jetele plazivého (*Trifolium repens*) se při těžkém nedostatku vody (kdy je vodní potenciál méně než – 1,67 MPa) syntéza ligninu v buňkách zvyšuje současně s inhibicí růstu listu (Lee et al., 2007). Na práce týkající se borovic jsem bohužel nenarazila.

Borovice lesní (*Pinus sylvestris*), které rostly za vyšší teploty, měly ve kmeni vyšší množství ligninu (Kilpeläinen et al., 2003).

Rostliny změnou syntézy ligninu reagují na abnormálně vysoké nebo nízké koncentrace prvků v půdě. Množství ligninu v jehlicích borovic lesních, které rostly na půdách s různým obsahem minerálních živin, bylo mezi stanovišti rozdílné. Neprokázala se však korelace mezi množstvím ligninu v jehlicích a obsahem živin v půdě (Sanger et al., 1996). Co se týče vlivu dusíku v půdě na množství ligninu v rostlinách, našla jsem pouze práce týkající se vlivu dusíkatých hnojiv. Jejich vliv se liší podle druhu, části rostliny nebo podle jejího stáří. U semenáčků borovice bahenní (*Pinus palustris*) se po silném pohnojení dusíkem sníží množství ligninu v kořenech, ale koncentrace ligninu v nadzemních částech zůstává stejná (Entry et al., 1998 in Moura et al., 2010). Blodgett (2005) říká, že hnojení (N:P:K) snižuje množství ligninu ve větvích borovice smolné (*Pinus resinosa*) a zvyšuje tak její náchylnost k houbovému patogenu *Sphaeropsis sapinea*. Naopak po pohnojení dusíkem se u smrku ztepilého (*Picea abies* L.) množství ligninu v kmeni zvýšilo (Konstiainen et al., 2004).

2.3.4 Celulóza

Celulóza je polysacharid složený z jednotek glukózy. Je součástí primární i sekundární buněčné stěny (může tvořit až 90 % sekundární buněčné stěny) a je považována za nejčastější

biopolymer na Zemi. Celulóza dává buněčné stěně pevnost a stálost v tvaru (Pavlová, 2005). Celulóza není tak citlivý nespecifický indikátor stresu jako například fenolické látky, nicméně je často do studií zařazována společně s určováním množství ligninu (Atwell et al., 2003; Kilpeläinen et al., 2003; Kostianen et al., 2004)

Většina prací zabývajících se množstvím celulózy v reakci na abiotický stres je prováděna na kmenech borovic. Dále jsem vybrala práce zabývající se syntézou celulózy v reakci na stres z nedostatku vody, na vysoké teploty a množství dusíku v půdě. Stinné jehlice borovice těžké (*Pinus ponderosa*) obsahovaly menší množství celulózy než slunné jehlice, a díky tomu byly méně tolerantní na stres z nedostatku vody (Vance a Zaerr, 1991). Při růstu borovic lesních za vyšších teplot se neměnilo množství celulózy ve kmeni (Kilpeläinen et al., 2003). Ve studii Kostianena et al. (2004) se množství celulózy ve kmeni smrku ztepilého (*Picea abies* L.) po pohnojení dusíkem také nezměnilo. Stejně výsledky byly i u borovice montereyské (*Pinus radiata*) (Atwell et al., 2003). Množství celulózy se neměnilo ani ve kmeni borovice lesní (*Pinus sylvestris*), při růstu v půdě chudé na dusík (Kilpeläinen et al., 2003).

2.3.5 Prolin

Prolin je aminokyselina, která je nejen součástí proteinů, ale volný prolin působí i proti osmotickému stresu, především proti suchu a zasolení, ale i například proti extrémním teplotám, nedostatku živin, těžkým kovům a UV záření. Prolin působí jako organický kompatibilní solut. Tyto vysoce rozpustné nízkomolekulární látky nejsou ve vysokých koncentracích toxické. Při osmotickém stresu například deaktivují kyslíkové radikály, pomáhají udržet membránovou integritu a membránový potenciál a stabilizují buněčné proteiny (Ashraf a Foolad, 2007).

Díky tomu, že akumulace prolinu působí proti některým stresům, byly zaznamenány úspěchy s transgenními rostlinami, které syntetizují více prolinu, například u tabáku (*Nicotiana tabacum*) (Hong et al., 2000) nebo huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) (Nanjo et al., 2003) a úspěchy s exogenní aplikací prolinu do rostlin (Ashraf a Foolad, 2007).

Já se teď zaměřím na případy, kdy prolin sloužil jako nespecifický indikátor stresu na borovicích nebo jiných jehličnanech.

Borovice (*Pinus densata*, *P. tabuliformis* a *P. yunnanensis*) měly po 28 dnech stresu z nedostatku vody zvýšené množství prolinu v jehlicích (Gao et al., 2009). Také u borovice pinie (*Pinus pinea* L.) se po 21 dnech stresování suchem prokazatelně zvýšilo množství prolinu

v jehlicích (Deligoz a Gur, 2015). Borovice montereyské, které se aklimatizovaly na sucho, měly větší množství aminokyselin, především prolinu (De Diego et al., 2015)

U borovice montereyské (*Pinus radiata*) se po třech dnech stresu vysokými teplotami (40 °C) zvýšilo množství prolinu v jehlicích. Po pěti dnech stresu vysokými teplotami a následnému vrácení k normálním teplotám se množství prolinu vrátilo na původní hodnotu. Tento jev byl chápán jako aklimační mechanismus borovice (Escandón et al., 2016).

Jehlice smrku ztepilého (*Picea Abies*), které byly poškozené (horským žloutnutím smrků v Černém lese, měly vyšší množství prolinu než nepoškozené stromy (Richter et al., 1995).

Protože nesespecifické indikátory stresu reagují změnou svého obsahu na různé abiotické stresy s jinou citlivostí, je vhodné použít vždy více nesespecifických indikátorů stresu zároveň. To dokazují i výše citované práce, například kombinace vlivu hnojení na množství fenolických látek a ligninu (Blodgett et al., 2005), nebo vlivu stresu suchem na množství fotosyntetických pigmentů a prolinu (Gao et al., 2009).

2.3.6 Odrazivost

Záření dopadající na list je z určité části listem pohlceno, odraženo, nebo listem prochází. V oblasti fotosynteticky aktivního záření, je podíl odražené části okolo 15 % (Gates et al. 1965). Odrazivost (reflektance) rostliny lze měřit na několika úrovních. Jednou možností je snímání v rámci rostliny přenosným spektrometrem a druhou možností je snímání v rámci celého porostu pomocí dálkového průzkumu Země, z letadla nebo satelitu (Ustin et al. 2009).

2.3.6.1 Základní principy odrazivosti

Odrazivost listu popisuje křivka (Obrázek 4), která ukazuje procento odrazivosti pro jednotlivé vlnové délky spektra slunečního záření (nejčastěji od 400 nm do 2500 nm). Tyto procenta se vztahují k materiálu, který má téměř 100 % odrazivost (např. tzv. lambertiánský spektralon). Odrazivost vegetace je nejvyšší v blízkém infračerveném spektru (NIR) a na začátku krátkovlnné infračervené oblasti (700 – 1200 nm). Tím, že rostliny toto záření

nepohlcejí v tak velkém množství, předcházejí přehřívání (Gates et al. 1965). Tato část reflektanční křivky závisí na vnitřní struktuře mezofylu (Slaton et al., 2001).

Nejméně odražené a nejvíce absorbované záření je ve viditelné oblasti spektra, především tam, kde záření absorbují chlorofyly, v červeném (650 - 700 nm) a modrém spektru (400 – 500 nm) (Gates et al. 1965). Karotenoidy, stejně jako chlorofyly, absorbují v modrém spektru záření a antokyany absorbují také v podobných vlnových délkách jako chlorofyly (Feild et al. 2001). Přítomnost karotenoidů a antokyanů můžeme tedy na křivce poznat pouze zúžením křivky v odražené části záření v 500 – 650 nm. (Gates et al. 1965).

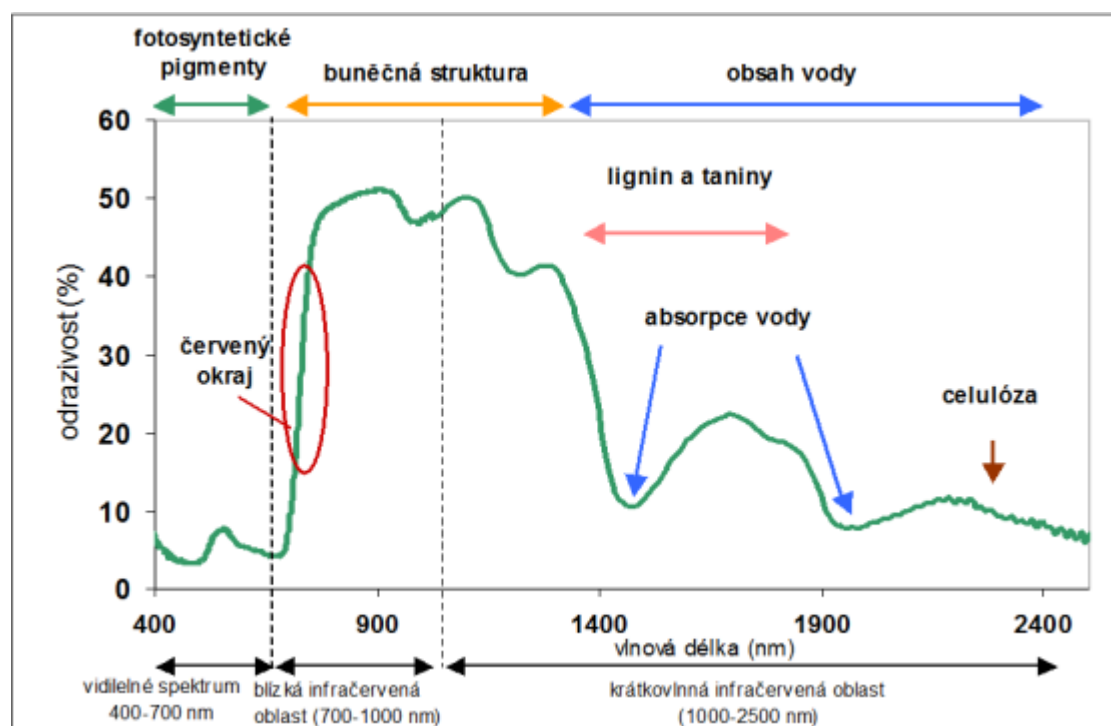
Ve vzdáleném infračerveném spektru je záření pohlcováno především vodou a poté ligninem, taniny a celulózu. Díky tomu, že se vlnové délky odrazivosti těchto složek překrývají, je lepší měřit obsah ligninu, celulózy a taninů u suchých listů (Kokaly a Clark 1999).

2.3.6.2 *Vegetační indexy*

Za účelem hodnocení fyziologického stavu vegetace nebo odhadu obsahu biochemických látek v listu jsou z reflektanční křivky odvozovány tzv. vegetační indexy. Hodnota vegetačních indexů se vypočítá podle konkrétních vzorců, jejichž nejdůležitější složkou jsou hodnoty odrazivosti příslušící k určitým vlnovým délkám, vybraných podle toho, jaký parametr listu chceme sledovat. Existují vegetační indexy popisující obsah vody v listech, obsah fotosyntetických pigmentů, antokyanů nebo například obsah dusíku v listech (Ollinger, 2010). Nejčastěji využívané vegetační indexy popisující obsah vody v listech jsou Normalized Difference Water Index (NDWI) (Gao, 1996) a Water Index (WI) (Penuelas et al., 1997). Pro odhad obsahu fotosyntetických pigmentů bylo vyvinuto mnoho vegetačních indexů (Ustin et al., 2009). K indexům popisujícím obsah chlorofylu je například Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) (Gamon et al, 1997), k indexům popisujícím obsah karotenoidů patří například Photochemical Reflectance Index (PRI) (Gamon et al., 1992) a k indexům popisujícím obsah antokyanů patří například Red/Green Index (RGI) (Gamon a Surfus, 1999). Důležitým parametrem vypovídajícím o fyziologickém stavu rostliny je REIP (Red Edge Inflection Point) (Guyot a Baret, 1988). Tento index odpovídá pozici inflexního bodu červeného okraje, kde v oblasti červeného okraje elektronmagnetického spektra (Obrázek 4) je derivace reflektanční křivky nulová (Rock et al., 1988). Protože vztahy mezi indexy a biochemií probíhající v listech mohou být často druhově specifické, pro moji práci jsem vybrala vegetační indexy vyzkoušené na borovici lesní v testovacích výsadbách Skelná Hut' a Nepomuk

(na potomcích stromů v semenném sadu Doubrava a Silov) (Palovská, 2015). Jsou to kromě výše zmíněných vegetačních indexů (WI, NDWI, REIP a PRI) také TCARI/OSAVI (Haboudane et al. 2002), PSSRa (Blackburn, 1998), Datt99 (Datt, 1999), Macc01 (Maccioni et al. 2001), NDVIre (Gitelson a Merzlyak, 1994), ROSAVI (Wu et al., 2008) a ZM (Zarco-Tejada et al., 2001), které korelují s množstvím chlorofylu a CRI700 (Gitelson et al., 2003) a PRIm1 (Hernández-Clemente et al., 2011), které korelují s množstvím karotenoidů.

Obrázek 4: Reflektanční křivka listu (upraveno podle Lhotáková 2009)



2.3.6.3 Využití vegetačních indexů

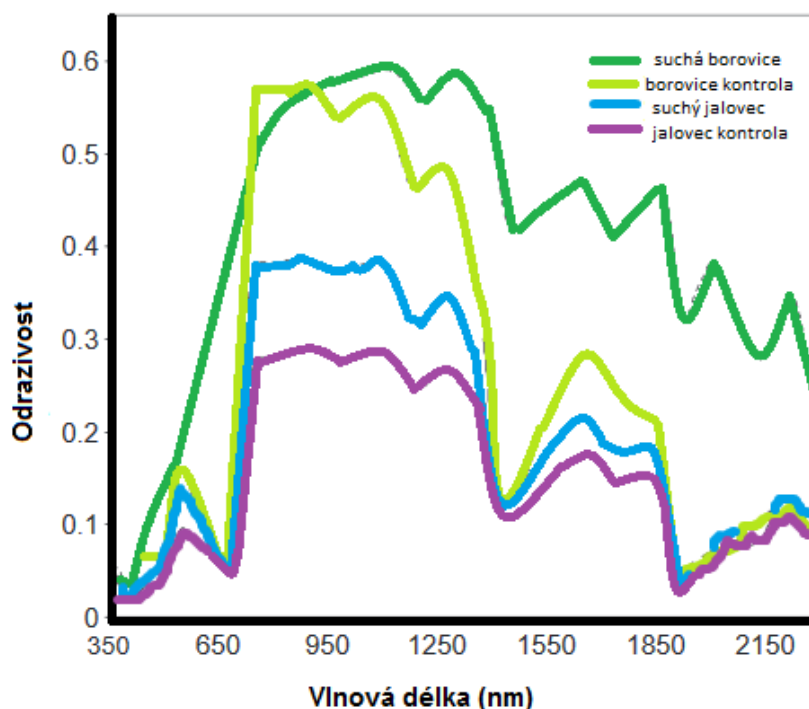
Z výše uvedeného vyplývá, že z reflektance můžeme získat cenné informace o obsahu vody, obsahu pigmentů, nepigmentových složek listů (jako například obsah dusíku) nebo o vnitřní struktuře listů. Já se ve své práci budu zabývat pouze obsahem vody a fotosyntetických pigmentů.

Obsahu vody odpovídá reflektanční křivka v oblasti spektra 1450–1950 nm. Čím menší je obsah vody v rostlině, tím méně list v dané oblasti absorbuje záření a reflektance je v té oblasti vyšší. Nutné je si uvědomit, že nízký obsah vody v listu s sebou nese i vedlejší efekty, jako je nízký obsah pigmentů nebo změna ve struktuře listu. Tyto efekty zvyšují

reflektanci i ve viditelné části spektra a v oblasti NIR (Zygielbaum et al. 2009). Stimson et al. (2004) porovnávali vlastnosti odraženého záření u dvou druhů rostlin: borovice coloradské (*Pinus edulis*) a jalovce *Juniperus monosperma*, které byly stresovány suchem. Vybrané indexy, NDVI a NDWI, u borovice coloradské korelovaly s naměřeným vodním potenciálem a obsahem vody (v %). Reflektanční křivka borovice coloradské a jalovce s nízkým a vysokým obsahem vody je v Obrázku 5.

Jak už bylo zmíněno výše, fotosyntetické pigmenty absorbují záření ve viditelné části spektra. Při sníženém množství chlorofylu v listu se odrazivost ve viditelné oblasti zvýší a zároveň se směrem ke kratším vlnovým délkám posouvá REIP. Díky tomu můžeme na reflektanční křivce pozorovat vliv rostlinných stresů, které způsobují změnu obsahu pigmentů v listu (například chlorózu listů) (Gates et al. 1965). Vystavení rostliny stresovým faktorům může mít na pohyb REIP i opačné, než výše zmíněné, účinky. Po působení atmosferického ozónu na borovici těžkou (*Pinus ponderosa*) se REIP posunul k delším vlnovým délkám, namísto ke kratším, které by měly naznačovat nižší obsah chlorofylu. Tento efekt byl vysvětlen jako důsledek změny struktury chloroplastů, která probíhá brzy po vystavení rostliny ozónu (Curtiss a Ustin 1989).

Obrázek 5.: Reflektanční křivky borovice coloradské (*Pinus edulis*) a jalovce *Juniperus monosperma* s nízkým vodním potenciálem (suchá/ý) a vysokým vodním potenciálem (kontrola) (upraveno podle Stimson et al. 2004)



2.3.7 Fluorescence

V minulé kapitole bylo zmíněno, že světelné záření dopadající na list je z určité části listem pohlceno, odraženo, nebo listem prochází. V této části se budeme zabývat zářením, které je listem pohlceno. V oblasti fotosyntetického záření je to okolo 75% (Gates et al., 1965). Záření je pohlceno pigmenty, jako jsou chlorofyly či karotenoidy. Světelná energie pohlcená chlorofyly může být dále zpracována třemi způsoby. Buď je přeměněna na energii chemických vazeb v procesu fotosyntézy, nebo přeměněna na teplo, nebo vyzářena zářením o vyšší vlnové délce v procesu zvaném fluorescence (záření vydané fluorescencí činí 2 – 10 % pohlceného světla) (Trissl et al., 1993). Tyto tři procesy jsou v neustálé rovnováze. Snížení účinnosti jednoho procesu zapříčiní zvýšení účinnosti jiného. Proto můžeme měřením fluorescence zjistit mnohé o změnách v procesu světelné fáze fotosyntézy nebo o distribuci tepla (Misra et al., 2012).

2.3.7.1 Rychlá kinetika fluorescence chlorofylu *a*

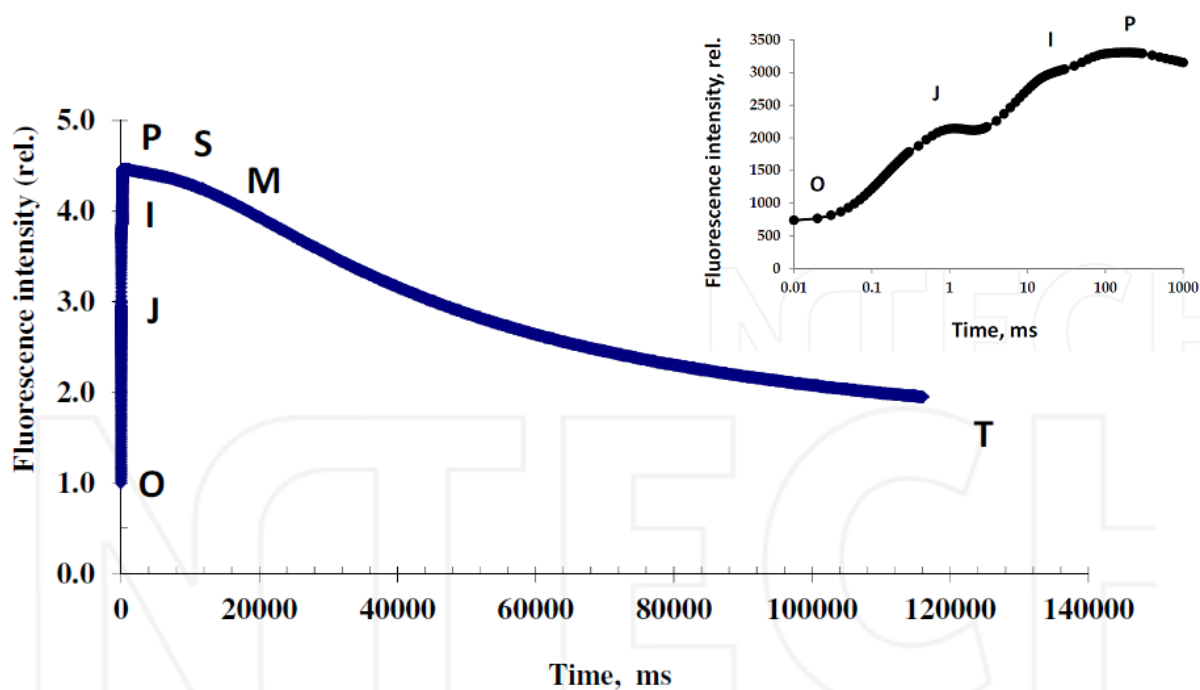
Metod měření fluorescence chlorofylu *a* je více (Misra et al., 2012). V mojí práci se zaměřím na rychlou kinetiku fluorescence chlorofylu *a*, protože ji dále využívám v experimentální části práce.

Po zatemnění vzorku a následném osvětlení prudkým světlem chlorofyl *a* vyzáří záření v podobě fluorescence. Zachycení tohoto záření v čase vytváří charakteristickou křivku, nazvanou podle svého objevitele Kautskyho křivka (Obrázek 6) (Kautsky a Hirsch, 1931 in Misra et al., 2012). V první části křivky intenzita fluorescence prudce stoupá (tato část trvá méně než sekundu) a v druhé části křivky intenzita fluorescence pomalu klesá (tato část trvá několik minut). První stoupající část křivky se nazývá OJIP křivka. Tato část křivky vypovídá o procesu přenosu elektronu ve fotosyntetickém elektron-transportním řetězci. Pomalá fáze křivky je označována jako SMT a vypovídá o faktorech jako je syntéza ATP, fixace CO₂ apod.

Písmeno O v OJIP křivce je podle slova počátek (origin) a vyznačuje intenzitu fluorescence měřenou v 20 – 50 μs po ozáření. Hodnota fluorescence v tomto bodě se označuje jako F₀. Písmena J a I jsou mezistavy fluorescence měřené v 2 a 30 ms. Maximum naměřené fluorescence je v bodě P (peak, vrchol). Fluorescence se v tomto bodě označuje jako maximální, F_M. Mezi O a J je tzv. fotochemická fáze a mezi J a I a mezi I a P jsou tzv. teplotně senzitivní fáze (Misra et al., 2012, Stirbet a Govindjee, 2011).

Analýza OJIP křivky vypovídá především o stavu fotosystému II (PSII), v pozdější fázi (za bodem I) také o části elektron-transportního řetězce za plastochinonovými (PQ) akceptory. Když je vzorek zatemněný, reakční centrum PSII je v základním stavu a čeká na příjem fotonu. Tento stav odpovídá místu O na OJIP křivce (F_0), kdy je fluorescence minimální a veškerá přijatá světelná energie může být využita na fotochemické reakce (tzv. „otevřené“ reakční centrum). Mezi body O a J se redukují molekuly Q_A a Q_B . V místě J dochází k dočasné rovnováze v rychlosti redukce Q_A a Q_B a odběrem elektronů PQ. V bodě I je dočasně vyrovnána rychlost mezi redukcí PQ a jeho oxidací PSI skrz cytochrom b_6f (Stirbet a Govindjee, 2011). V místě P (F_M) jsou všechny molekuly PQ redukovány v důsledku zablokovaného akceptorového místa na fotosystému I (PSI) a elektron-transportního řetězce plně saturovaného elektrony. V tomto bodě nelze použít světelnou energii na fotochemické reakce (reakční centrum je „zavřené“) a fluorescence je tedy maximální (Schansker et al., 2005).

Obrázek 6.: Kautskyho křivka zdravého listu a OJIP křivka (v semilogaritmickém měřítku) (Misra et al, 2012). Na ose y je intenzita fluorescence a na ose čas po ozáření listu.



2.3.7.2 Fluorescenční parametry popisující OJIP křivku

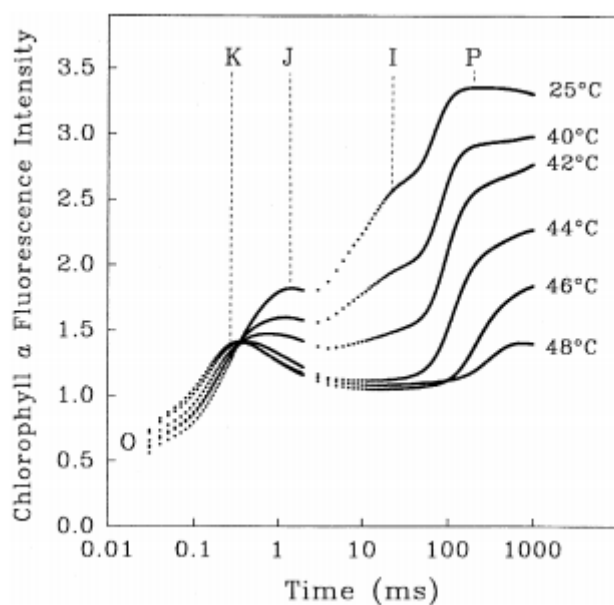
Hodnoty z OJIP křivky lze využít pro výpočet velkého množství fluorescenčních parametrů, které vypovídají o aktivitě a účinnosti jednotlivých složek elektron-transportního řetězce. Tyto parametry byly vyvinuty na základě tzv. JIP testu (Strasser et al., 2000). Ten je založen na základních tocích energie na membránách tylakoidů, nicméně v určitých ohledech je značně zjednodušen. Například v něm není zahrnuta konektivita mezi podjednotkami PSII a přenos energie mezi nimi (Stirbet a Govindjee, 2011). Fluorescenční parametry vycházejí ze základních fluorescenčních hodnot OJIP křivky, F_0 , F_J (v místě J OJIP křivky), F_I (v místě I OJIP křivky) a F_M . Nejběžnějšími parametry, které slouží pro sledování vlivu okolního prostředí na rostlinu, jsou variabilní fluorescence F_V , která udává rozdíl mezi počátečním stavem před osvětlením a maximální intenzitou fluorescence ($F_M - F_0$), a parametr F_V/F_M (v experimentální části práce označen jako ϕ_{PO}) (Stirbet a Govindjee, 2011). Dalšími parametry s nimiž JIP test pracuje a vychází se z nich při dalších výpočtech jsou relativní variabilní fluorescence V_J a V_I tedy normalizované intenzity fluorescence mezi místy O a J nebo O a I na OJIP křivce ($(F_J - F_0)/(F_M - F_0)$ a $(F_I - F_0)/(F_M - F_0)$) (Rensburg et al., 1996), případně relativní variabilní fluorescence V_t ($V_t = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$), tento parametr udává počet zavřených reakčních center v libovolném čase t po ozáření (Misra et al., 2012). Z těchto parametrů lze např. vypočítat účinnosti/ pravděpodobnosti, s nimiž je elektron přenášen v různých částech elektron-transportního řetězce ($\psi_{E0} = 1 - V_J$ – přenos mezi Q_A a Q_B ; $\delta_{RE10} = (1 - V_J)/(1 - V_I)$ – přenos mezi Q_B a PSI elektronovými akceptory; $\psi_{RE01} = 1 - V_I$ – přenos mezi Q_A a PSI elektronovými akceptory). Jejich dalšími kombinacemi spolu s parametrem M_0 , vyjadřujícím počáteční sklon OJIP křivky a počítaným jako $4(F_{300ms} - F_0)/(F_M - F_0)$, lze dospět např. k odhadům průměrného toku fotonů absorbovaných světlosběrnou anténou asociovanou s jedním funkčním reakčním centrem PSII ($ABS/RC = (M_0/V_J)/(1/\phi_{PO})$), maximálního toku energie zachyceného jedním reakčním centrem PSII ($TR_0/RC = M_0/V_J$), toků elektronů z Q_A na Q_B (nebo až k akceptorům PSI), vyjádřeným opět na jedno reakční centrum PSII ($ET_0/RC = (M_0/V_J)/(1 - V_J)$, resp. $RE_{10}/RC = (M_0/V_J)/(1 - V_I)$) nebo toku energie disipované jako teplo ($DI_0/RC = ABS/RC - TR_0/RC$). Existuje ale i mnoho dalších parametrů, které lze z OJIP křivky vypočítat a jsou přehledně uvedeny např. ve Stirbet a Govindjee (2011).

2.3.7.3 Využití fluorescence při měření vlivu stresu na rostlinu

Měření fluorescence se mimo jiné využívá i pro detekci odezvy rostliny na stresové prostředí a na zjištění tolerance rostliny na stres. Mezi tyto environmentální stresy patří například znečištěné ovzduší, sucho, vysoké a nízké teploty, vysoká ozářenost nebo nedostatek živin.

Při vysokých teplotách je inaktivován PSII a dezorganizovány thylakoidy. To vede ke zvýšení hodnoty F_0 , snížení parametru F_M , a tím i variabilní fluorescence a parametru F_V/F_M (Havaux, 1994; Ranney a Peet, 1994; Srivastava et al., 1997). Kromě výše jmenovaných změn se vlivem vysokých teplot (a někdy i dalších stresových faktorů) na OJIP křivce může objevit nový bod nazývaný K, vzniklá křivka se nazývá OKJIP (Obrázek 7.). Tento bod se nachází v čase 200 – 300 μs po osvětlení a může v něm být i maximální intenzita fluorescence. Tento efekt je pravděpodobně dán nedostatečným zásobováním elektrontransportního řetězce elektrony z komplexu uvolňujícím kyslík na PSII a reorganizací architektury světlosběrného komplexu (Srivastava et al., 1997)

Obrázek 7.: OKJIP křivka (vliv vysokých teplot na OJIP křivku u hrášku) (Srivastava et al., 1997).



Na rozdíl od výsledků u rostlin stresovaných vysokými teplotami, rostliny stresované suchem neměly oproti nestresovaným rostlinám jinou hodnotu parametru F_V/F_M , například

u vrby (Ögren, 1990). Kultivary tabáku rezistentní na sucho měly při stresování suchem oproti kultivarům citlivým na sucho zvýšenou hodnotu variabilní fluorescence V_t a rozdílu $F_J - F_0$. Hodnota F_J , F_M a V_J ve 2 ms po ozáření u teplotně rezistentních i senzitivních kultivarů při stresování suchem klesala (Rensburg et al., 1996).

Parametr F_V/F_M se snížil u jabloně Fuji (*Malus sylvestris* L.) pouze při velmi nízkých koncentracích dusíku v listech (kolem $1,5 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$) (Cheng et al., 2000). Borovice montereyská (*Pinus radiata*), která rostla na hadcové půdě chudé na živiny, měla nižší parametr F_V/F_M , tento parametr pozitivně koreloval s množstvím draslíku v jehlicích a poměrem množství draslíku a hořčíku (K : Mg) a vápníku a hořčíku (Ca : Mg) v jehlicích (Xue et al., 2013).

U borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.) se v rámci roku při zimních nízkých teplotách snižuje fluorescenční parametr F_V/F_M (Salmela et al., 2011).

2.4 Význam vnitrodruhové variability fyziologických parametrů pro šlechtění

Jednou z úloh nesespecifických indikátorů stresu je výběr jedinců (genotypů či odrůd) rezistentních proti určitému biotickému či abiotickému stresu. Tyto výzkumy se týkají především hospodářsky významných rostlin, jako jsou zemědělské plodiny (obiloviny, kukuřice, sója apod.), ale i dřevin - borovic a jiných jehličnanů.

V důsledku nadcházejících klimatických změn je největší důraz kladen na výběr odrůd rostlin, které jsou rezistentní proti suchu nebo vysokým teplotám. De Diego et al. (2015) pomocí analýzy množství prolinu vybral odrůdy borovice montereyské (*Pinus radiata*), které se dokáží nejvíce aklimatizovat na sucho. Borovice *Pinus densata* vznikla křížením dvou borovic *Pinus tabuliformis* a *Pinus yunnanensis*. Pomocí některých indikátorů stresu, mezi nimi i množství prolinu a fotosyntetických pigmentů, se zjišťovala rezistence těchto druhů borovic proti suchu (Gao et al., 2009).

Studie zaměřené na reakce různých genotypů borovic na abiotický stres se nejčastěji zabývají buď morfologickými znaky (jako je diametrální růst kmene, délka jehlic) nebo fluorescenčním parametrem F_V/F_M .

U 40 různých genotypů borovic montereyských, které rostly na hadcové půdě chudé na živiny, se zjišťovaly hodnoty fyziologických parametrů, mezi nimi i fluorescenční parametr F_V/F_M , které by pomohly vybrat genotyp nejlépe přizpůsobený růstu v těchto podmínkách. Genotypy patřily do dvou skupin. V jedné skupině byly genotypy, u kterých byly známy

rodičovské stromy, které byly vybrány pro dobré vlastnosti růstu a kmene. V druhé skupině byly genotypy z polosesterského potomstva, a tedy s poměrně neznámými vlastnostmi. Rozdílnost v hodnotách fyziologických parametrů se lišila mezi těmito skupinami i mezi jednotlivými genotypy. Větší variabilita se ukázala mezi genotypy v rámci jednotlivých skupin než mezi skupinami. Autor konstatuje, že se dají dané fyziologické parametry využít pro šlechtění, a produktivita lesa se dá zvýšit nejen hnojením, ale i výběrem genotypů, které efektivněji využívají živiny z půdy (Xue et al., 2013).

U semenáčků borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.), které vyrostly ze semen 32 mateřských stromů, byl na jednom místě ve Skotsku měřen v rámci jednoho roku fluorescenční parametr F_V/F_M . Mateřské stromy semenáčků byly z osmi populací z různých míst ve Skotsku lišícími se průměrnými teplotami (každá populace čítala 4 stromy z různých nadmořských výšek). V důsledku zimních nízkých teplot se všem stromům parametr F_V/F_M snížil. Stromy ze semen mateřských stromů, které byly z nižších nadmořských výšek, které se vyznačují vyšší průměrnou teplotou a méně mrazivými dny, měly nižší fluorescenční parametr, tedy horší stav PSII. Tento jev dokazuje jak genetickou variabilitu mezi borovicemi, ale i lokální adaptaci na dané podmínky prostředí (Salmela et al., 2011).

Marshall et al. (2001) rozdělil jedince borovice těžké (*Pinus ponderosa*), které pocházely ze stejného místa, na skupinu s vysokým kmenem a skupinu s nízkým kmenem. Tyto skupiny se poté lišily ve fluorescenčním parametru F_V/F_M naměřeném během celého roku. Jedinci s nižším kmenem měli během roku nižší parametr F_V/F_M než jedinci s vyšším kmenem. Autor říká, že konkrétní odpovědi genotypů na teploty během roku, které se projevují na fotosyntetickém aparátu jedinců, souvisí s výškou kmene genotypů. Výsledky studie tedy naznačují, že může být fluorescenční parametr F_V/F_M a ostatní parametry v této studii použity jako selekční marker pro šlechtění borovic.

O ostatních nespécifických indikátorech stresu, které jsou předmětem této práce, jsem bohužel nenašla studie zabývající se borovicemi či jinými jehličnany. Vybrala jsem ovšem pár prací, kde figurují jiné druhy rostlin. Tyto práce ukazují, že mohou být tyto fyziologické parametry využity při šlechtění, protože v nich existuje geneticky vázaná variabilita.

U 10 genotypů vrby (křížence vrby *Salix viminalis* L. a vrby *Salix dasyclados* L.) byla variabilita mezi genotypy v množství fenolických látek větší než variabilita zapříčiněná reakcí na stres z nedostatku vody (Glynn et al., 2004).

Lignin byl jedním z parametrů při hledání genotypu pšenice odolnému proti suchu a vysokým teplotám (Bala et al., 2015).

Více prací využívá pro výběr rezistentních jedinců vegetační indexy. Nemeskéri et al. (2015) použil vegetační index NDVI při hledání odrůdy hrášku setého (*Pisum sativum* L.) rezistentní proti suchu. Mezi šesti odrůdami odpověděla na stres z nedostatku vody pouze jediná, a to zvýšením NDVI. To potvrzuje fakt, že tato varieta používá dostupnou vodu pro produkci zelených, fotosynteticky aktivních částí a ne pro produkci semen. Vegetační index NDVI též sloužil jako jeden z faktorů při výběru dvou elitních variet pšenice rezistentních na sucho (Jain et al., 2014). Su et al. (2015) rozdělili 12 kultivarů podzemnice olejné (*Arachis hypogaea* L.) podle toho, jak tolerantní jsou na železo – deficientní prostředí. Jedněmi z indikátorů, pomocí nichž od sebe kultivary rozdělovali, byly i vegetační indexy – PRI, Red edge point a NDCI (Normalized Difference Chlorophyll Index). Prací, které by se zabývaly porovnáváním nebo identifikací genotypů pomocí metody odrazivosti u dřevin zatím není mnoho. Výhodou využití metody odrazivosti při zmapování genotypů je možnost využití dálkového průzkumu Země, díky kterému se za krátký čas zmapuje velká oblast. Tuto metodu využili například Cavender-Bares et al. (2016), kteří se snažili ocharakterizovat populace v rámci druhu *Quercus oleoides* a Madritch et al. (2014), kteří pomocí této metody rozlišili genotypy druhu topolu *Populus tremuloides*.

3 Materiál a metody

3.1 Materiál a stanoviště

3.1.1 Semenné sady

Jako materiál jsem použila jehlice na loňských výhonech (ročník 2014) borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.) ze dvou semenných sadů první generace, Doubrava a Silov. Tyto semenné sady byly založeny za účelem sběru geneticky hodnotného materiálu ve formě semen. Stromy v těchto semenných sadech byly naroubovány z vybraných stromů v západních Čechách, které byly vybrány na základě lesnických parametrů (jsou to výška kmene, tloušťka kmene a kvalitní tvárnost kmene). Každý strom s určitým genotypem (klon) je v semenném sadu zastoupen několika roubovanci (rametami). Charakteristika sadů je v Tabulce 1 a fotografie ze semenného sadu Silov na Obrázku 8.

Tabulka 1: Charakteristika a lokalizace semenných sadů Doubrava a Silov (převzato Kaňák, 2011, upraveno Palovská, 2015). LČR jsou Lesy České republiky.

Semenný sad	Doubrava	Silov u Nepomuka
Evidenční číslo	79	43
LČR, lesní správa	Plasy	Klatovy
GPS souřadnice	49°54'31.034"N, 13°26'33.605"E	49°28'52.587"N, 13°31'41.536"E
Přírodní lesní oblast	06 Západočeská pahorkatina	06 Západočeská pahorkatina
Soubor lesních typů	3I dubovobukový, půda kyselá uléhavá	4S bukový, půda živná středně bohatá svěží
Hospodářský soubor	8241	451
Počet klonů	87	45
Počet ramet	1165	410
Spon (rozestupy stromů) [m]	6 × 6	6 × 6
Celková plocha [ha]	6,48	2,24
Rok založení	1980	1975
LVS (lesní vegetační stupeň)	2	4
Nadmořská výška [m n.m.]	380	480–500
Testován na ploše	Skelná Hut'	Nepomuk

Obrázek 8.: Fotografie ze semenného sadu Silov (rok 2014)



3.1.2 *Studované Genotypy*

Genotypy stromů semenných sadů Doubrava a Silov byly vybrány s ohledem na předchozí výzkum. Vybraly se takové genotypy, které jsou rodičovské ke zpracovaným genotypům z testovacích výsadeb Skelná Huť a Nepomuk. 22 genotypů je shodných v sadu Doubrava i Silov, 49 genotypů se nachází pouze v sadu Doubrava a 15 pouze v sadu Silov. Odebíral se jeden strom (rameta) od každého genotypu. Za účelem porovnání variability mezi genotypy a variability v rámci jednoho genotypu bylo vždy u jednoho genotypu odebráno více ramet v jednom semenném sadu. Genotypu 2991 v semenném sadu Doubrava se odebralo 21 ramet a genotypu 2377 v semenném sadu Silov se odebralo 18 ramet. Rozložení genotypů v sadu jsou na Obrázku 9 a 10.

3.1.3 *Odběr půdy*

Poslední údaje o rozboru půdy ze semenných sadů Silov a Doubrava jsou z roku 1988 zhotovené Výzkumným ústavem lesního hospodářství a myslivosti. Tyto údaje mi poskytl Jan Kaňák Ph.D. Z Tabulky 2 je patrný rozdíl v půdních vlastnostech mezi dvěma semennými sady. Půda v semenném sadu Doubrava je kyslejší a chudší na živiny (dusík, fosfor, vápník a draslík), než půda v semenném sadu Silov.

Obrázek 9: Plánek rozložení ramet a místa odběrů půdy v semenném sadu Doubrava (upraveno podle dat poskytnutých prof. Ing. Milanem Lstibůrkem MSc. Ph.D.). Čísla jsou označení pro jednotlivé genotypy. Červeně jsou označeny odebrané genotypy nacházející se pouze v sadu Doubrava, modře jsou odebrané genotypy nacházející se v obou sadech a zeleně je genotyp, u kterého se odebíraly vzorky z více ramet. Hvězdou jsou označena místa odběru půdy.

A	2984	2366	2657	2659	2992	20005	20007	2656	2998	2986	2988	2975	20001	2363	2656	2989	2379	2659	2987	20007	A	
B	2979	20066	2370	20002	20011	2975	2983	2975	2369	2989	20008	20011	2355	2983	2010	2988	2374	20008	20112	2983	B	
C	2375	2373	2988	2989	#2991#	20001	2992	2657	2979		2987	2097	2101	#2991#	20002	2990	20011	20001	2975	C		
D	2658	20107	2101	2103	20108	2976	20112	20107	2371	20002	20108	20005	2975	2981	2657	20107	2997	2352	20005	2976	D	
E	20012	2379	2995	20006	20009	2981	2985	2099	2658	2103		20004	20112	2351	2979	2369	2998	2994	2993	E		
F	2998	2988	2990	2352	2097	2351	2364	2994	2353	20012	2997	2375	2654	2374	2099	20108	2369	20009	2103	20004	F	
G	2983	2654	2993	2997	2366	2374	2371	2995	2993	2990	2659	2379	2985	2992	2995	2986	2658	20006	2985	#2991#	G	
H	2365	20010	20008	20002	20007	2983	2975	20010	2998	2656	20011	2988	20001	2983	20010	2655	2659	2988	20008	2981	H	
I	2374	2659	2656	2989	20011	20004	20001	20008	2987	2979	2657		2975	20007	2997	2101	20002	2654	2987		I	
J	2365	2988	2101	2976	2657	2992	20005	2101	20002	2366	2369	2981	#2991#	2355	2989	2352	2658	2976	2379	20005	J	
K	2658	2987	2103	#2991#	20107	20009	20112	2103	2989	2997	2097	20004	20108	20112	2103		2657	2097		20004	K	
L	2994	2097	2986	2352	2351		20108	2995	2659	2099	2655	2992	20009		2984	2374	2994	2371	2979	2993	L	
M	2369	2995	2990	20006	2099		2985	2355	2374	2984	2654	2371	2658	20005	2993	2990	20107	2986	2656	#2991#	M	
N	2979	2654	20012	2375	2997	2993	2998	2990	20012	2379	2352	2986	2994	2351	2104	20012	2099	20006	20108	2985	N	
O	20002	20011	20010	2983	2371	20006		2979	20011	2983	20007	2975	20110	20008	20011	20002	2987	2654	2975	2101	O	
P		20007	2658	2984	2657	2975	2369		2992	2993	2987	2101	20006	2981	2355	2659	2658	20009	2988	2352	20001	P
R	2374	20112	2656		20107	2103	20005		2985	20112	2657	#2991#	20108	20004	2097	2374	2989	20010	20005	20112	R	
S	2986	2998	2989	2976	2352	2994	2981	2989	2371	2658	20010	2369	2103	2990	2656	20009	2983	#2991#	2379	2993	S	
T	2379	2097	#2991#	2993	2355	20004	2997	2656	2984	2099	2976		20005	2995	2998	2984	2985	2371	20012	2990	T	
U	2655	2987	2990		2985	2779	2995	2998	2654	2655	2659	2375	2377	20012	2992	2099	20110	2979	2657	20108	U	
V	2351	2654	2992	20008	2659	20012	20111	20002	2374	20009	20107	2994		2351	20008	20109	2993	2373	2981	2369	V	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		

A	2981	2656	20006	2987		20011	20004	2101	2366	20012	20006	2097	2371	2992	2658	2656	2986	20010	2992	20004	A
B	2097	2975	20012	20108	2993	#2991#	2654		20107	2987	20011	2355	2993	2101		2998	20003	2374	20012	2985	B
C	2101	2657	2379	20112	2352	2975	2377	2983	2374	2998	20005	2655	20002	2369	2654	20107	20011	2995	2103	20005	C
D	2355	2979	2374	2984	2659	2994	2997	2369	2986	2657	#2991#	20004	20010	2983	2999	20008	2352	2658	2355	2975	D
E	2654	2352	20107	20009	2658	2976	2097	2981	20008	2995	20009	2103	2994	2349	20108	2371	2978	2987	2349	2101	E
F	2992	2989	2995	20001	2998	20005	2355	2992	2099	2988	2976	2379	2984	20007	2981	2099	2375	2097		20108	F
G	2351	2659	20002	2985	2371	20006	2103		2352	2979	2985	2975	2997	2351	20112	2657	2993	2991	2990	2659	G
H	20001		20108	2987	20010	20004	20011	2351	20010	2987	2097	20011	2369	2101	20005			2654	2992	20003	H
I	2975	2352*	2988	2375*	2657	#2991#	2101	2986	2993	2989	2655	20004	#2991#	2355		2374	2352	20004	2355	2983	I
J	2983	2984	20107	2379	2997	2656	20008	20112	20107	20108	2998	2371	20008	2979	2656	2995	2998	20011	2982	2656	J
K	2355	2374	2654	2659	2998	2658	2776	2369	2995	2374	20009	2654	2658	2983	2360	2371	2987	2379	2102	2658	K
L	2369	20012	2995	2097	2349	2979	2983	2988	2659	20012	2103	2375	2099	2976	20002	2349	20007	2360	2351		L
M	2992*	2103	2379	2099	2371	2985	20007	2975	2981	2657	2352	20007	2997	20112	2975	2989	20107	20012	2659	2978	M
N	2351	20002	2655	2989	2981	20005	2355	2992	2379	20002	2984	2985	2349	2351	2992	2981	2097	2988	2990		N
O	2658	20011	2987	2993	#2991#	2352	2351	2101	20011	2656	2097	2355	2374	20010	2995	20011	2352	20004	2654	2992	O
P	2985	20107	20008	2986	20112	2658	2657	2995	2655	2989	2986		20012	2987	2989	2655	2103	2372	20112	20003	P
R	2355	2097	2979	2657	20012	2976	20004	2371	20006	2993	20107	2099	2984	2654	2101	2656	2360	2375	2975		R
S	2995	2998	20010	2374	2361	2654	2375	2369	2988	#2991#	2658	2983	2372	2659	20108	20008	2099	2657	2998	2361	S
T	2997	20007	2988	2656	2655	2365	2983	20108		2975	20112	20006	2918	2379	20005		2997	2986	2978	#2991#	T
U	2351	2378	2099	2975	2659	2994	20006	20005	2992	20002	2352	2657	20003	2990	2349	2002	20107	2985	20012	20005	U
V	20004	20002	2989	2981	2997	2103	2355	2984	2351	2997	2103	2985	2981	20004	2360	2995	2993	2097	2989	2351	V
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	

A		2983	2371	2379	2377	2982	2349	2363	2366	2656	#2991#	2351	20004		2984	20011	2983	2656	2998		A
B	2997	2654	20107	2984	2099	2975	20004	2096	2369	20003	2982	2102		2976	2993			2982	20110		B
C	2988	20112	20003	2659	2990	2363	2980	2989	2986	2356	2987	2353	20010	2363	2659	2366	2655	2989			C
D	2982	20009	2998	20012	2987	2657	20010	2995	2659	20007			2985	2975	2992	2993			2348	2999	D
E		2351	2378	2353	2655	2102	2985	20011	2983						2980	2353	20005			20011	E
F	2360	2989	2658	2978	#2991#	2374	20005	2103	2351	2379	20006	2989	2657		2656	2995	20003		2653		F
G	2369	2981	20008	2656	2353	2997	20112	2998	2983	2366	2998	2371	2374	2986		2658	2981		2350		G
H	20005	2993	20010	2351	2363	2996	2986	2982	2992	20010		2353	20004	2996	2983	2375	20010	2987			H
I		2655	2998	2659	2995	2374	2657		2993	2097	2999	2352	2975	#2991#	2993	2102	2999		20005		I
J	2369	20112	2371	2360	2987	2098	2658	20008	20004	2981	20110	2653	2988		2659	2358*	2981		2098		J
K	2975	20008	2989	20012	20002	20003	2369		2983	2356	2371	2103	20008	2374	2369	2982	2992	2982	2655		K
L	2099	2657	2981	2349	2356	2656	2990	2997	20011	2989	20003	2992	2995	2978		20005	2356		2653		L
M	2991	2986	2103	20005	20107	2655	2978	20007	2997	2986	2987	2655	20002	2985	2349	2656	2995				M
N	2985	2371	20110	2988	2353	2975	2985	2375	2102	2980	2998	2657	20007	2363	2375	2098	2985	2657			N
O	2983	2983	20011	2998		2374	20004	2996	2349	20011	2999	2358	2996	20111	2983	2097	20011		2360*		O
P	20010	2658	2995	2360	2657	2372	2983	2658	2369	2356	2366	2348	2653	20110	2372	2372*	2986	2655			P
R	2374	2981	20012	2363	2985	#2991#	20010	2990	2659	2989	2360	2993	20004	2984	#2991#	2659	2361	2989			R
S	20006	2102	2103	2356	2655	20110	2098	20003	20007	2379	2980	2361	20001	2369	2998	20008	2353				S
T	20007	2659	2353	2379	2992	2656	2982	2989	2997	2353	2103	2374	2975	2363	2657	2992	2101	20002			T
U	2369	2990	2988	2986	2351																

Obrázek 10: Plánek rozložení ramet a místa odběrů půdy v semenném sadu Silov (upraveno podle dat poskytnutých prof. Ing. Milanem Lstibůrkem MSc. Ph.D.). Čísla jsou označení pro jednotlivé genotypy. Červeně jsou označeny odebrané genotypy nacházející se pouze v sadu Silov, modře jsou odebrané genotypy nacházející se v obou sadech a zeleně je genotyp, u kterého se odebíraly vzorky z více ramet. Hvězdou jsou označena místa odběru půdy..

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
A								S-4	2348	2363	2359		S-4	2348	2359						A
B							2374	#2377#	2657	2373	2367	2366	2353	S-5	#2377#	2373	S-4	2353	S-15	2358	B
C						2379	2366	S-2	S-5	S-15		2372	2352	S-3	2374	S-1	2361	2376	2366	2351	C
D						2350	2372	2375	2370		2361	2349	2358	2364	2363	2379		2350		2370	D
E					2380	2364	2349	2371	2351	2380	2379	2365	S-6	2369	2351	2380	2372	2365	2371		E
F			S-4	2365	2355	2348	2357	2353	S-3	2359	S-4	2375	2371	2360	2356	2349	2355	2364	2367		F
G		S-5	S-3	2359	2356	2352	2378	2360	2363	2356	2350		2355		2357	2358		2352	2369	2360	G
H	S-1	2348	2363	2366	2373	#2377#	2361		2353	2366	#2377#		S-3	S-5	S-15	2366	2361	2376	S-3	S-1	H
CH	S-15	#2377#	2353	2374	S-1	S-4	2372	S-3		2375	2376	S-1	2352	2358	2363	S-4	2374	2353	2348	S-5	CH
I		2371	S-5	2351	2367	2371	2349	2380	2370	2365	2351	2372	2364	2369	S-2	2365	2379	2373	2370	2351	I
J	S-4	S-3		2355		2350	2348	2369	2358	2379	S-4	2373	2350	2380	2356	2367	2371	2364	2355	2380	J
K	2348		2366	2365	2364	2354	2363	S-6	2356	2367	2378	2350	2348	2370	2359		2363	2360	2372	2369	K
L	2363	2353		2376	2375	2352		2357	2359	2361	2371	2349	2353	2355	2357	S-15	2349	2350	2358	2352	L
M	chybné zna	#2377#			20111		S-3			S-15	S-15	S-3	2363	S-4	#2377#		S-3		2659	2366	M
N	S-5	S-3	2371	2348		2366	#2377#	S-4	2363	#2377#	2366	2358	2359	S-5		2348				#2377#	N

	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
A																					A
B																					B
C	S-3	2348	2353																		C
D	#2377#	2372	2349	2371	S-3	S-15															D
E	2363	S-4		2365		2350	#2377#	S-4													E
F	2375	2380	2352	2349	2360	2374	S-3		2359	2348											F
G	2357	2361	2358	2379	2370	2363	2375	2352	2358	S-4	S-15	S-5	S-3	S-4							G
H	2356	2366	2376	2364	2348	2357	S-1	2366	2367	2365		2373	2359	2366	2348	S-2	2351				H
CH	#2377#	2349	S-15	2355	2351	2379			2379	2355	2371	2376	S-1	2367	2380		2371	S-3	2358		CH
I	2363	2365	2373	2372	S-5	S-2	2350	2353	2364	2349	#2377#	S-4	S-3	S-15	2378		2352	S-5	S-1	2348	I
J		2374	2353		2360	#2377#	2369	2374	S-3		2352	2350	2370	2353		2355	2350	2364		2363	J
K		2375	2378		S-4	2352		2375			2372	2356		2361	2349	2360				2363	K
L	20111	2361	2379		2380	2363	2358	2357	2371		2360	S-6	2358	2359	2373	2365	2379		S-3	S-15	L
M			2371				2366	2655	2659		2366	S-15				2364					M
N	2363	2369			2667	S-15	#2377#	2348	2353	2658	2359	#2377#	2363	2353	2657	2659					N

	41	42	43	
A				A
B				B
C				C
D				D
E				E
F				F
G				G
H				H
CH				CH
I				I
J		S-3		J
K	2354	#2377#	S-4	K
L	2366	S-5		L
M				M
N				N

Tabulka 2.: Výsledky odběru půdy ze semenných sadů Doubrava a Silov z roku 1988 (sestrojeno podle dat zhotovených Výzkumným ústavem lesního hospodářství a myslivosti)

Vlastnost půdy	Doubrava	Silov
Výměnná kyselost pH	3,3	3,6
Obsah vápníku (mg Ca/kg)	263	293
Obsah hořčíku (mg Mg/kg)	50	41
Obsah fosforu (mg P/kg)	11	36
Obsah draslíku (mg K/kg)	20	43
Obsah dusíku (% N)	0,05	0,08
Obsah humusu (%)	1,7	1,61

V listopadu 2015 jsem odebírala půdu v obou semenných sadech. Odebírala jsem na 6 místech v semenném sadu Doubrava a na 6 místech v semenném sadu Silov. Místa byla vybrána podle umístění ramet, které se nachází v obou semenných sadech (na Obrázcích 9 a 10 jsou označeny modře). Na Obrázcích 9 a 10 jsou místa, kde se odebírala půda, označena hvězdičkou. Půda byla odebrána pomocí půdní sondy. Sonda byla zavedena do hloubky 50 cm a pro analýzu živin byl odebrán svrchní organický horizont (Obrázek 11).

Obrázek 11. Odebírání organického horizontu půdy půdní sondou v semenném sadu Doubrava



Vzorky půdy byly odeslány na zpracování do laboratoří Výzkumného ústavu meliorací a ochrany půdy. S ohledem na odběr půdy z roku 1988 jsem zažádala o analýzu výměnné kyselosti, obsahu vápníku, hořčíku, fosforu, draslíku, dusíku a humusu. Navíc jsem zažádala o určení zrnitosti půdy z důvodu zjištění, jakou mírou zadržuje půda vodu. Půda na určení výměnné kyselosti, obsahu prvků a obsahu humusu byla předsušena po dobu 5 dní na 60 °C a přeseta skrz jemné síto s otvory ve velikosti 0,02 mm. Půda na určení zrnitosti byla předsušena 5 dní na 60 °C a přeseta skrz hrubé síto s otvory ve velikosti 2 mm. Výsledky rozboru půdy a jejich statistické vyhodnocení se nachází v části Výsledky.

3.2 Terénní odběry

Terénní odběry výhonů borovice proběhly od 27. do 30. července 2015. Odebíraly se 2 větve ze slunné části z každého stromu (ramety) z jihovýchodní strany. 24 hodin po odběrech byla na jehlicích změřena fluorescence a reflektance. Na jejich měření se odebíraly vždy 2 části z každé větve stromu (dohromady 4 části), pouze loňské výhony (ročník 2014). Zbytek větví byl použit na přípravu materiálu pro biochemické analýzy (podrobnosti naleznete u jednotlivých kapitol metod).

Z důvodu ověření, jestli se 24 hodinová pauza mezi oddělením větve od stromu a zmražením jehlic neprojeví na výsledcích měření fotosyntetických pigmentů, jsem odebrala a zpracovala 21 vzorků genotypu 2991 již na místě semenného sadu Doubrava (na obrázku 1 označeny zeleně). Změřené výsledky jsem posléze porovnalas výsledky vzorků odebraných ze stejných částí větví po 24 hodinách.

3.3 Metody výzkumu – stanovení fyziologických parametrů jehlic

3.3.1 Rychlá kinetika fluorescence PSII

Měření rychlé kinetiky fluorescence se provádělo přístrojem FluorPen FP 100 (Photon System Instruments, Brno, Česká republika). Měřily se vždy dvě větve z každého stromu. Z každé větve byly odebrány 2 vzorky (2 menší větve). Dohromady tedy náležely každému stromu 4 vzorky na měření fluorescence. Tyto vzorky byly před měřením půl hodiny

zatemňovány (umístěny v temné místnosti v pokojové teplotě), aby proběhla temnotní aklimace PSII. Poté byl na vzorky vyslán po dobu 1s saturační puls modrého záření ($\lambda=455$ nm) s intenzitou $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Výsledné hodnoty fluorescence byly snímány od 10 μs až 2 s po saturačním pulzu, a to každých 10 μs do času 600 μs , každých 100 μs do času 14 ms, každou 1 ms do času 90 ms a každých 10 ms do času 2 s. Naměřená hodnota pro F_0 je v čase 40 μs , F_K v čase 300 μs , F_J v čase 2 ms a F_I v čase 30 ms. Tyto parametry spolu s parametrem F_M (F_P) dále sloužily pro výpočet fluorescenčních parametrů použitých v této práci (Tabulka 3). Výsledek měření každého stromu je vždy průměr z hodnot uvedených čtyř vzorků. Data z měření a vypočítané fluorescenční parametry jsem obdržela od RNDr. Dany Holé Ph.D. z Katedry genetiky a mikrobiologie PřF UK v Praze.

K této práci byly vybrány pro další analýzu stejné fluorescenční parametry, které byly použity i ve studii prováděné na testovacích výsadbách (potomcích stromů ze semenných sadů Doubrava a Silov) a u kterých byla (až na parametry DI_0/RC , ϕ_{D0} and ϕ_{P0}) prokázána statisticky významná dědivost (Palovská 2015, Čepl et al., 2016).

Tabulka 3.: Fluorescenční parametry (Převzato a upraveno z Čepl et al., 2016). F_0 je minimální fluorescence (v čase 40 μs), F_K je intenzita fluorescence v bodě K (v čase 300 μs), F_J je intenzita fluorescence v bodě J (v čase 2 ms) F_I je intenzita fluorescence v bodě I (v čase 30 ms), F_m (F_P) je maximální fluorescence, PSI je fotosystém I, PSII je fotosystém II a RC je reakční centrum.

Parametr	Definice	Vzorec
V_J	Relativní variabilní fluorescence v bodě J	$(F_J - F_0)/(F_m - F_0)$
V_I	Relativní variabilní fluorescence v bodě I	$(F_I - F_0)/(F_m - F_0)$
M_0	Odhad směrnice relativní variabilní fluorescence V_t v okolí bodu O	$4(F_K - F_0)/(F_m - F_0)$
ϕ_{P0}	Maximální kvantový výtěžek PS II	$(F_m - F_0)/F_m$
ϕ_{E0}	Kvantový výtěžek transportu elektronů z Q_A na Q_B	$1 - (F_J/F_m)$
ϕ_{RE01}	Kvantový výtěžek transportu elektronů až k PS I	$1 - (F_I/F_m)$
ϕ_{D0}	Kvantový výtěžek disipace zachycené energie	F_0/F_m
ψ_{E0}	Efektivita/pravděpodobnost, s jakou bude elektron přenesen z Q_A na Q_B	$1 - V_J$
ψ_{RE01}	Efektivita/pravděpodobnost, s jakou bude elektron přenesen až k PS I	$1 - V_I$
δ_{RE01}	Efektivita/pravděpodobnost, s jakou bude elektron přenesen z Q_B až k PS I	$(1 - V_J)/(1 - V_I)$
γ_{RC}	Pravděpodobnost, že chlorofyl v PS II funguje jako RC	$1/(ABS/RC + 1)$
ABS/RC	Průměrný tok absorpce na RC, neboli zdánlivá velikost antény PS II	$(M_0/V_J) (1/\phi_{P0})$
TR_0/RC	Maximální tok energie zachycený PS II	M_0/V_J
ET_0/RC	Tok elektronů z Q_A na Q_B	$(M_0/V_J) \psi_{E0}$
RE_{01}/RC	Tok elektronů z Q_A až k PS I	$(M_0/V_J) \psi_{RE01}$
DI_0/RC	Tok disipované energie vyjádřený na jedno RC PS II	$(ABS/RC) - (TR_0/RC)$
PI_{ABS}	Performační index konzervace energie od fotonů ke Q_B	$[1/(ABS/RC)][\phi_{P0}/(1 - \phi_{P0})][\psi_{E0}/(1 - \psi_{E0})]$
PI_{TOTAL}	Performační index konzervace energie od fotonů až k PS I	$PI_{ABS}[\delta_{RE01}/(1 - \delta_{RE01})]$

3.3.2 Reflektance a stanovení vegetačních indexů

Měření se provádělo na stejných vzorcích jako měření fluorescence. Reflektance byla měřena v intervalu 350 – 2500 nm spektrometrem ASD Fieldspec 4 Wide-Res s kontaktní

sondou ASD Plant Probe. Tato sonda detekuje záření vycházející ze sondy a odražené od jehlic. Hodnoty odrazivosti jsou udávány v procentech vztažených k lambertiánskému kalibračnímu spektralonu, jehož odrazivost se blíží k 100 % a který se používá jako reference.

Prováděla jsem vždy pět měření čtyř vzorků jednoho stromu najednou, vždy z jiného místa. Čtyři vzorky jsem vždy naskládala na černý podklad tak, aby bylo místo sondy, odkud vychází paprsek, zcela zaplněno jehlicemi.

Spektrální data jsem zpracovala v programu View Spec, který je dodáváný k tomuto typu spektrometru, a převedla do programu Excel. Výsledná data jsou vždy mediánem z pěti naměřených reflektančních křivek z každého stromu.

Tabulka 4.: Vybrané reflektanční indexy (Převzato a upraveno z Palovská, 2015). R je zkratkou pro reflektanci naměřenou v určité vlnové délce.

Zkratka	Celý název	Korelace	Vzorec	Zdroj
WI	Water Index	relativní obsah vody	R_{900}/R_{970}	Penueles et al., 1997
NDWI	Normalized Difference Water Index	vodní potenciál	$(R_{860}-R_{1240})/(R_{860}+R_{1240})$	Gao, 1996
TCARI/OSAVI	Transformed Cab Absorption in Reflectance Index / Optimized Soil Adjusted Vegetation Index	obsah chlorofylu	$\frac{3 \left((R_{700}-R_{670}) - 0,2 \frac{(R_{700}-R_{550})}{(R_{700}/R_{670})} \right)}{1,16 (R_{800}-R_{670})/(R_{800}+R_{670}+0,16)}$	Haboudane et al., 2002; Meggio et al., 2010
PSSRa	Pigment Specific Simple Ratio	obsah chlorofylu	R_{800}/R_{680}	Blackburn, 1998
Datt99	Datt 99	obsah chlorofylu	$(R_{850}-R_{710})/(R_{850}-R_{680})$	Datt, 1999
Macc01	Maccioni 2001	obsah chlorofylu	$(R_{780}-R_{710})/(R_{780}-R_{680})$	Maccioni et al., 2001
NDVire	Normalized Difference VI - Red Edge	obsah chlorofylu	$(R_{750}-R_{705})/(R_{750}+R_{705})$	Gitelson a Merzlyak, 1994
REIP	Red Edge Inflection Point	obsah chlorofylu	$700+40 \frac{(R_{670}+R_{780})/2-R_{700}}{R_{740}-R_{700}}$	Guyot a Baret, 1988
ROSAVI	Revised OSAVI	obsah chlorofylu	$1,16(R_{750}-R_{705})/(R_{750}+R_{705}+0,16)$	Wu et al., 2008
ZM	Zarco and Miller	obsah chlorofylu	R_{750}/R_{710}	Zarco-Tejada et al., 2001
CRI700	Carotenoid Concentration Index	obsah karotenoidů	$1/R_{515}-1/R_{700}$	Gitelson et al., 2003, 2006
PRIm1	Modified Photochemical Reflectance Index	obsah karotenoidů	$(R_{515}-R_{530})/(R_{515}+R_{530})$	Hernández-Clement et al., 2011
PRI	Photochemical Reflectance Index	poměr Kar/Chl	$(R_{570}-R_{530})/(R_{570}+R_{530})$	Gamon et al., 1992

Z naměřených vlnových délek jsem dále vypočítala indexy. Vybrala jsem ty, které vypovídají o stavu vody v rostlině a ty, které vypovídají o stavu fotosyntetických pigmentů

v rostlině. Zároveň byly tyto indexy vyzkoušeny na borovicích lesních v testovacích výsadbách, tedy na potomcích stromů v semenných sadech Doubrava a Silov (Palovská, 2015). Vybrané indexy naleznete v Tabulce 4.

3.3.3 Analýza obsahu fotosyntetických pigmentů

Jehlice na analýzu fotosyntetických pigmentů byly nadrobno nastříhány bez koncových částí a zmrazeny na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro pozdější zpracování. Čerstvá hmotnost jehlic se pohybovala přibližně od 0,1 do 0,5 g.

Na pozdější výpočet suché hmotnosti vzorku bylo potřeba odebrat nahrubo nastříhané jehlice, u kterých se zvažila nejprve čerstvá hmotnost (pohybující se přibližně od 0,2 g do 0,7 g) a po vysušení po dobu 5 dní na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ i suchá hmotnost (pohybující se přibližně od 0,09 g po 0,3 g).

Pro extrakci fotosyntetických pigmentů jsem každý vzorek jehlic ponořila do 10 ml dimethylformamidu a nechala týden ve tmě v teplotě 4°C . Pro pozdější měření absorbance na spektrofotometru jsem vzorky naředila dimethylformamidem v poměru 1 : 4. Absorbance byla měřena ve vlnové délce 750 nm, která kontrolovala čistotu vzorku, a vlnových délkách 480 nm, 647 nm a 664 nm, které určovaly množství fotosyntetických pigmentů ve vzorku. Rovnice pro výpočet obsahu fotosyntetických pigmentů v $\mu\text{g/ml}$ pomocí absorbance jsou zobrazeny v Tabulce 5 (Wellburn, 1994). Výsledný obsah pigmentu je vyjádřen jako mg pigmentů ve vzorku na mg suché hmotnosti jehlic.

Tabulka 5.: Rovnice výpočtu množství fotosyntetických pigmentů v $\mu\text{g/ml}$ z absorbance (Wellburn, 1994) A je zkratkou pro absorbanci v určité vlnové délce.

Fotosyntetické pigmenty	Použité vlnové délky	Rovnice výpočtu pigmentů ($\mu\text{g/ml}$)
Chlorofyl A	664 nm, 647 nm	$Ch_a = 11,65 * A(664) - 2,69 * A(647)$
Chlorofyl B	664 nm, 647 nm	$Ch_b = 20,81 * A(647) - 4,53 * A(664)$
Karotenoidy a xantofyly	480 nm	$c = (1000 * A(480) - 0,89 Ch_a - 52,02 * Ch_b) / 245$

3.3.4 Analýza obsahu fenolických látek

Jehlice na analýzu fenolických látek byly nejprve předsušeny po dobu 5 dní na 60 °C a poté rozemlety na prášek. Pro extrakci fenolických látek jsem navázila vždy 0,1 g rozemletých jehlic od každého vzorku a dosušila po dobu 3 dní na 65 °C.

Stanovení celkového obsahu rozpustných fenolických látek jsem provedla pomocí Folin-Ciocalteu činidla podle Singleton a Rossi (1965). Samotnou extrakci jsem prováděla 80% metanolem. Proces probíhal ve třech cyklech a každý cyklus se skládal z několika fází. V první fázi jsem k namletým jehlicím přidala 4 ml metanolu. Poté jsem nechala vzorky po dobu 30 minut při 55 °C ve vodní lázni. Poté jsem vzorky dala odstředit při 5000 otáčkách za minutu na 5 minut a nakonec odsála supernatant, do kterého se extrahovaly fenolické látky. Tento postup jsem opakovala dohromady 3 krát. Poprvé jsem na začátku přidávala 4 ml metanolu a v dalších dvou případech pouze 3 ml. Dohromady byl tedy vzorek jehlic extrahován v 10 ml metanolu.

Za 3 dny po extrakci jsem stanovila množství fenolických látek ve vzorku pomocí spektrofotometru (Evolution 201, Thermo Scientific,). Před měřením jsem vzorky odstředila při 5000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut, abych se vyvarovala případných nečistot v průběhu měření. Dále jsem 0,5 ml vzorku naředila 10 ml roztoku C (přípravu roztoku C naleznete v Tabulce 6) a nechala za občasného míchání 10 minut působit. Poté jsem přidala 0,2 ml Folin-Ciocalteanova činidla, který barví fenolické látky do modra a nechala 30 minut působit. Vzorek jsem do kyvety před měřením naředila roztokem C v poměru 1 : 8. Absorbance roztoku byla měřena při vlnové délce 750 nm.

Tabulka 6.: Příprava roztoku C

označení roztoku	složení
A	Na 100 ml H ₂ O 20 g Na ₂ CO ₃ a 4 g NaOH
B	Na 200 ml H ₂ O 2 g vinanu sodnodraselného a 1 g CuSO ₄ x 5 H ₂ O
C	1 ml roztoku B v 50 ml roztoku A

Výsledky jsou vyjádřeny v mg fenolických látek na g suché hmotnosti jehlic. Hmotnost fenolických látek z hodnot absorbance jsem vypočítala pomocí rovnice kalibrační křivky kyseliny gallové.

3.3.5 *Analýza obsahu ligninu*

Pro stanovení obsahu ligninu ve vzorcích byla použita metoda extrakce v kyselině thioglykolové (Lange et al. 1995).

Jehlice na analýzu fenolických látek byly nejprve předsušeny po dobu 5 dní na 60 °C a poté rozemlety na prášek. Vzorky byly ještě před extrakcí vysušeny po dobu dvou dní v teplotě 80 °C. Suchá hmotnost vzorku se pohybovala okolo 0,03 g.

V první fázi se ze vzorku vyextrahují buněčné stěny. Nejprve se ke každému vzorku přidal 1 ml 1M NaCl, poté se vzorek vložil na 20 minut do sonikátoru, následně dal odstředit na 5 minut do centrifugy na 8000 otáček za minutu a nakonec se odsál supernatant. Poté se vzorek propláchl v několika sloučeninách. Jednotlivé kroky byly vždy odděleny dvacetiminutovým třepáním, centrifugací a odsátím supernatantu. Tyto sloučeniny po sobě následovaly takto: 1 ml 1% dodecylsírany sodného, 2 x 1 ml vody, 1 ml 100% metanolu, 1 ml roztoku chloroformu a metanolu (1:1) a 1 ml 100% metanolu. Vzniklý pelet (buněčné stěny) se dal na den do sušárny na 50 °C.

V druhé fázi se extrahuje lignin pomocí kyseliny thioglykolové. Do předsušených buněčných stěn se přidal 1 ml 2M HCl a 0,2 ml thioglykolové kyseliny, tato směs se nechala 4 hodiny inkubovat při 95 °C, po zchlazení se dala odstředit po dobu 10 minut na 10 000 otáček za minutu (dále jen 10 000/10) a nakonec se ze směsi odsál supernatant. Poté se vzorek třikrát propláchl vodou, po každém propláchnutí se dal vždy odstředit a odsál se supernatant. Poté se ke vzorkům přidal 1 ml 0,5M NaOH a dal se třepat na 12 hodin. Poté se vzorek cetrifugoval (10 000/10), odsál se supernatant, pelet se propláchnul 0,5 ml 0,5M NaOH, nechal se 5 minut protřepat a 5 minut sonikovat a odsál se supernatant. Vzniklý extrakt (odsátý supernatant) se okyselil 0,3 ml 36% HCl a nechal se po dobu 4 h v 4 °C. Pelet byl dále použit pro stanovení celulózy (viz níže). Extrakt se poté odstředil (10 000/10), odstranil se supernatant, a pelet se dal vysušit po dobu 12 hodin na 50 °C.

Pro spektrofotometrické stanovení se pelet rozpustil v 1 ml 0,5 M NaOH (ten byl použit jako standard). Měřila se absorbance při $\lambda=280$ nm.

Výsledná hodnota je vždy průměrem ze dvou extrakcí a je vyjádřena buď v procentech (hmotnost ligninu k suché hmotnosti jehlic) nebo v miligramu ligninu na gram sušiny. Na statistickou analýzu jsem použila data od Mgr. Drahomíry Bartákové.

3.3.6 Analýza obsahu celulózy

Obsah celulózy jsem stanovovala podle Loadera (1997) z peletu zbylým po stanovení ligninu. Nejprve jsem ke každému vzorku přidala 1,5 ml 10% NaOH a dala na 45 minut při teplotě 80 °C do sonikátoru. Poté jsem vzorek dala odstředit po dobu 5 minut na 7000 otáček za minutu a nakonec odsála supernatant. Ke zbylému peletu jsem přidala 1,5 ml 17% NaOH a dala na 45 minut do sonikátoru při pokojové teplotě. Poté jsem vzorek odstředila a odsála supernatant. Nakonec jsem pelet dvakrát promyla vodou a před odsátím supernatantu vždy dala odstředit. Zbylou usazeninu (celulózu) jsem dala na tři dny sušit do teploty 60 °C a nakonec zvažila. Výsledná hodnota je vždy průměrem ze dvou extrakcí a je vyjádřena procentuálně hmotností celulózy ku suché hmotností jehlic.

3.3.7 Analýza obsahu prolinu

Stanovení obsahu prolinu jsem provedla pomocí upravené metodiky vycházející z práce Batese (1973). Jehlice pro stanovení množství prolinu byly nahrubo nastříhány a zmrazeny na – 20 °C pro účely pozdějšího užívání obdobně jako jehlice na stanovení fenolických látek.

Před extrakcí prolinu, byly jehlice homogenizovány pomocí tekutého dusíku na prášek a uskladněny v teplotě – 20 °C maximálně po dobu jednoho týdnu. Čerstvá hmotnost jehlic se pohybovala zhruba od 0,3 g po 1g.

Pro extrakci prolinu jsem ke každému vzorku jehlic přidala do 8 ml destilované vody a 2ml 15% roztoku kyseliny sulfosalicylové. Za stálého míchání jsem nechala 30 minut kyselinu se vzorkem působit a poté jsem vzorek odstředila po dobu 5 minut při 5000 otáčkách za minutu. Dále jsem vždy 1 ml vzorku smíchala s 1 ml kyseliny octové a 1 ml roztoku ninhydrinu s kyselinou octovou a kyselinou fosforečnou (postup přípravy je v Tabulce 7). Výsledný roztok jsem dala vařit ve vodní lázni po dobu jedné hodiny. Nakonec jsem každý vzorek převrstvila 3 ml toluenu a zamíchala.

Tabulka 7.: Složení roztoku ninhydrinu s kyselinou octovou a kyselinou fosforečnou

látko	množství (pro 80 ml roztoku)
kyselina octová	48 ml
kyselina fosforečná	12,192 ml
ninhydrin	2 g
destilovaná voda	19,808 ml

Hned další den jsem měřila absorpenci toluenové složky vzorku, do které přes noc vyvzlínal prolin. Vzorky jsem nechala vždy 10 minut před měřením přizpůsobit se laboratorní teplotě a měřila absorpenci při vlnové délce 520 nm.

Výsledek je vyjádřen v jednotkách μ molech prolinu na 1g čerstvé hmotnosti jehlic. Množství prolinu v μ g bylo zjištěno z absorpance na základě kalibrační křivky. Postup při sestrojování kalibrační křivky byl stejný jako při postupu zpracování vzorků. Posléze jsem množství prolinu přepočítala na μ molech prolinu na 1g čerstvé hmotnosti jehlic.

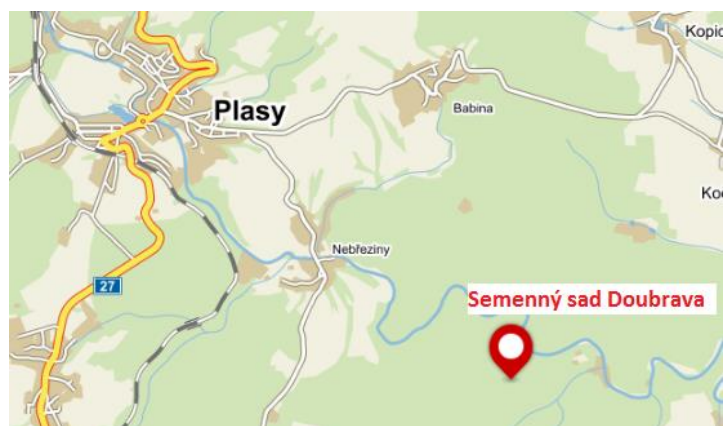
3.4 Meteorologická data

Denní úhrny srážek byly poskytnuty Českým hydrometeorologickým úřadem (ČHMÚ) z automatizované klimatologické stanice I typu v Nepomuku (ID stanice je L1NEPO01), vzdálené od semenného sadu Silov vzdušnou čarou přibližně 4 km, a z manuální srážkoměrné stanice v Plasech (ID stanice je L2PLAS01), vzdálené od semenného sadu Doubrava vzdušnou čarou přibližně 4,5 km. Přesné stanoviště sadů Doubrava a Silov jsou na Obrázku 12.

3.5 Statistické metody

Statistickou analýzu jsem prováděla v programu NCSS 9. Sloupcové grafy jsem vytvořila v programu Excel 2016. Krabicové grafy jsem vytvořila v programu NCSS 9. Testování fyziologických parametrů mezi sady jsem prováděla dvouvýběrovým t-testem na hladině pravděpodobnosti 0,05. Pokud neměly data normální rozdělení a shodnost rozptylu, použila jsem neparametrický dvouvýběrový t-test. Pro porovnání rozdílu variancí mezi stejným a rozdílným genotypem jsem použila variance ratio equal variance test a modified Levene equal variance test, které testují shodu rozptylu studovaných dat na hladině pravděpodobnosti 0,05.

Obrázek 12.: Lokalita semenných sadů Doubrava a Silov (převzato z mapy.cz)



4 Výsledky

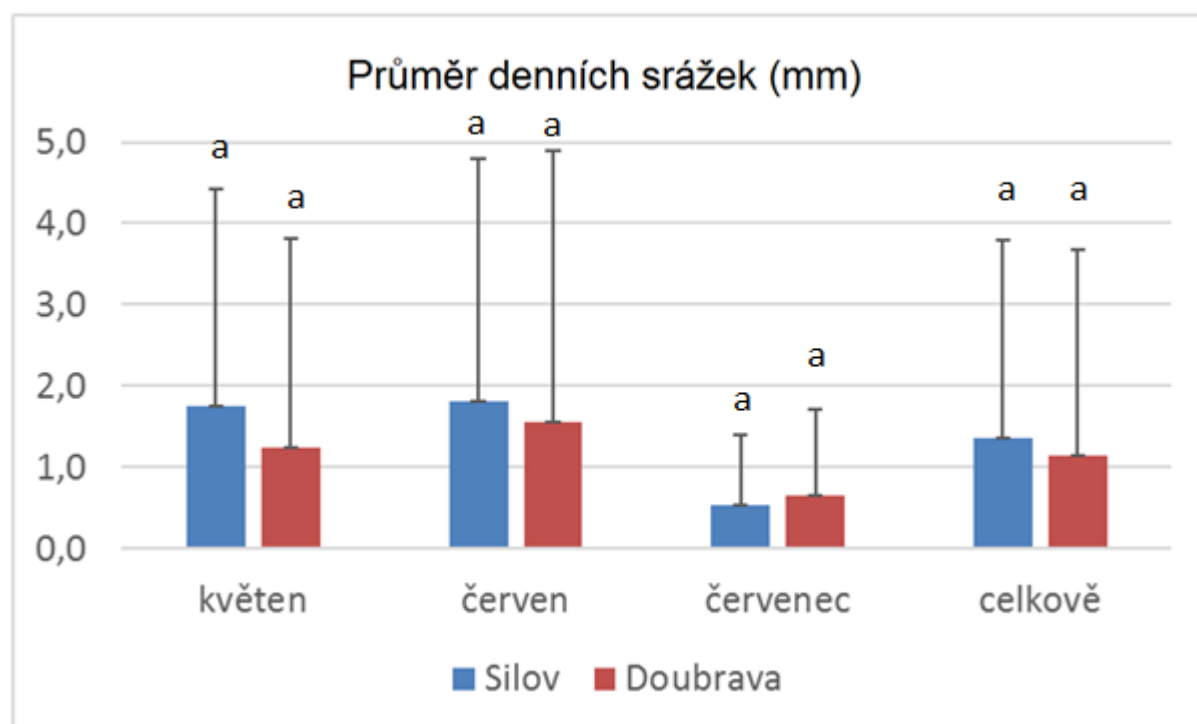
4.1 Meteorologická data

Z porovnání součtů srážek z měsíců květen, červen a červenec z let 1985, 1995, 2005 a 2015 z Plzeňského kraje a součtů srážek z měsíců květen, červen, červenec z roku 2015 z meteorologických stanic Nepomuk a Plasy (Tabulka 8) je vidět, že v roce 2015 bylo v těchto měsících celkově velmi sucho. Kromě měsíce června bylo více srážek v meteorologické stanici Nepomuk než meteorologické stanici Plasy (Obrázek 13). Přesto se hodnoty naměřených denních srážek mezi sady statisticky významně neliší. Na Obrázcích 14 a 15 jsou denní úhrny srážek z meteorologických stanic Nepomuk a Plasy.

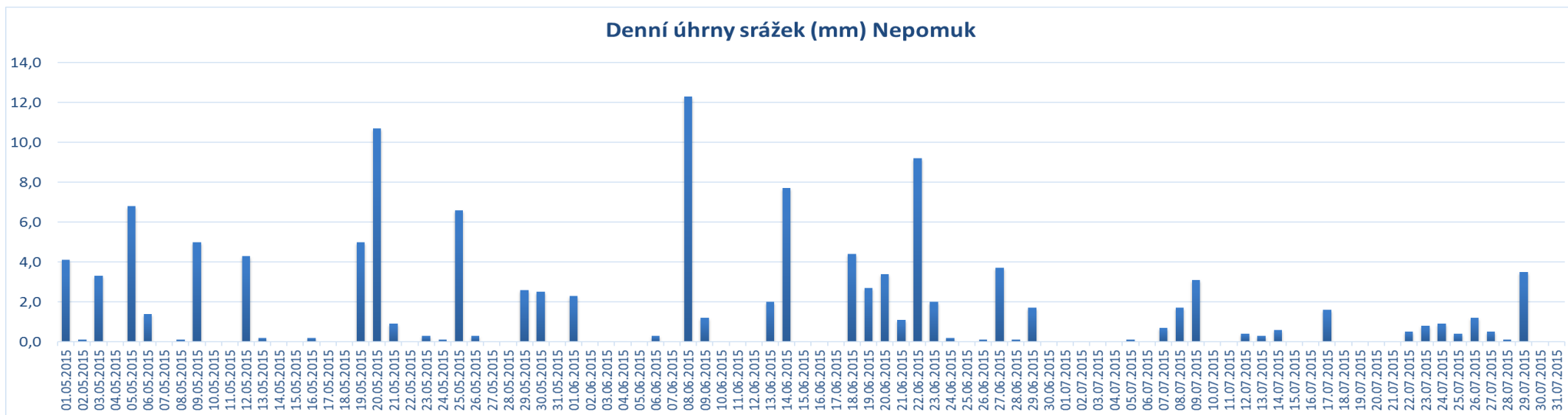
Tabulka 8: Měsíční součet úhrnů srážek Plzeňského kraje a meteorologických stanic Nepomuk a Plasy (data jsou poskytnuta ČHMÚ)

Měsíc	Měsíční úhrny srážek (součet v mm)					
	Plzeňský kraj (1985)	Plzeňský kraj (1995)	Plzeňský kraj (2005)	Plzeňský kraj (2015)	Nepomuk (2015)	Plasy (2015)
květen	49	73	79	52	54,5	38,6
červen	74	76	66	62	54,4	46,8
červenec	71	121	114	28	16,4	20,1

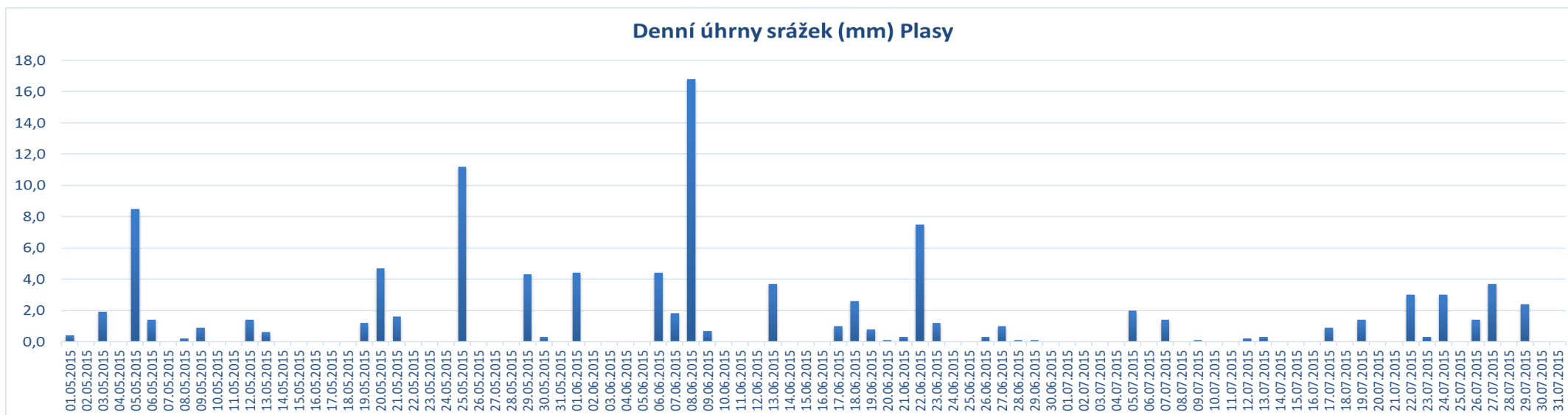
Obrázek 13.: Měsíční a celkový průměr srážek v meteorologických stanicích Nepomuk a Plasy (data byla poskytnuta ČHMÚ) Sloupce vyjadřují průměrnou hodnotu. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. Rozdílná písmena nad sloupci určují statisticky významný rozdíl, který byl prokázán na hladině $p=0,05$ dvouvýběrovým t-testem, $n=31$ za květen a červenec u sadů Doubrava a Silov, $n=30$ za červen u obou sadů a $n=92$ u obou sadů.



Obrázek 14.: Denní úhrny srážek (v mm) za měsíce květen, červen a červenec 2015 z meteorologické stanice Nepomuk (data poskytnuta od ČHMÚ)



Obrázek 15.: Denní úhrny srážek (v mm) za měsíce květen, červen a červenec 2015 z meteorologické stanice Plasy (data poskytnuta od ČHMÚ)



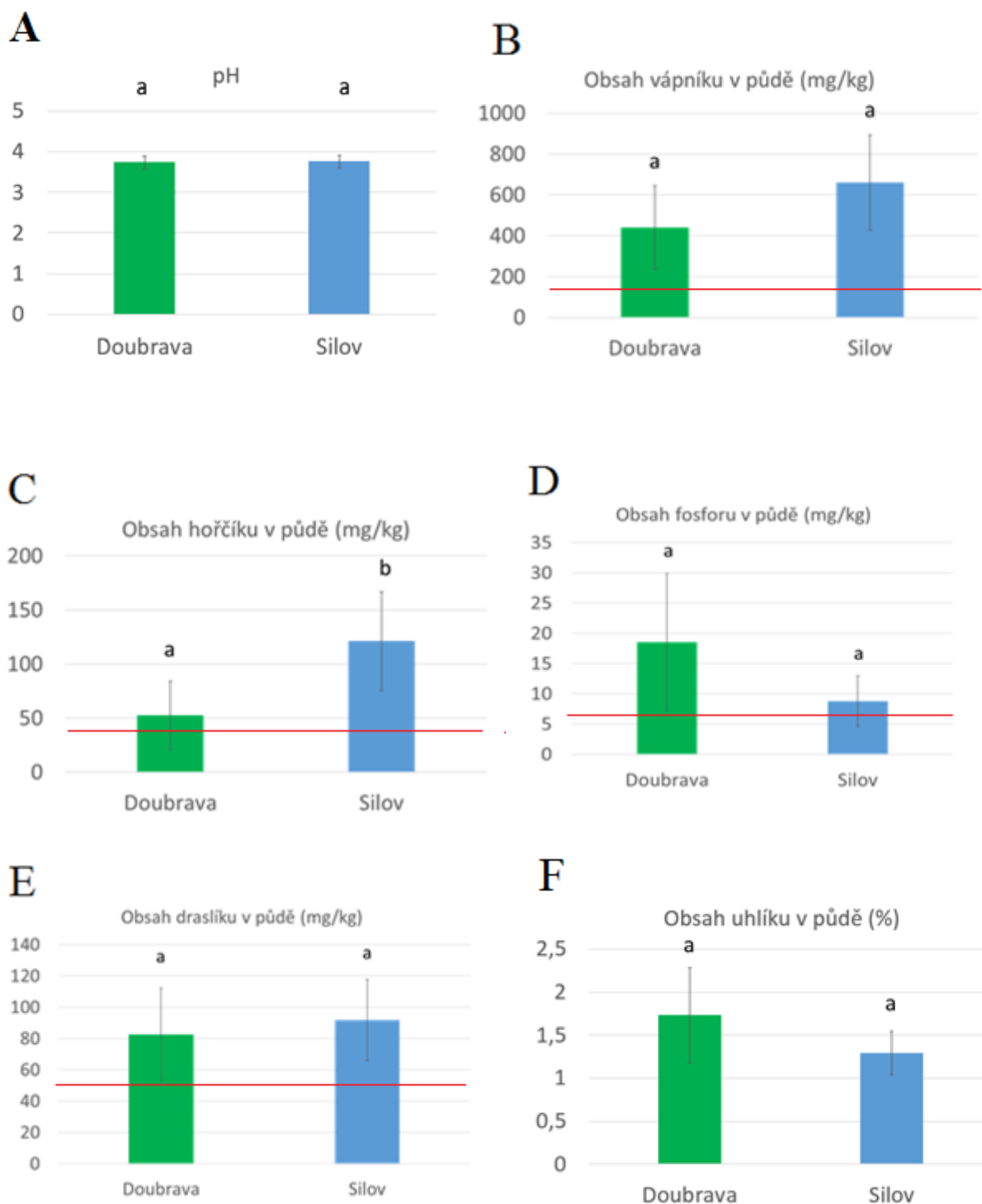
4.2 Rozbor půdy

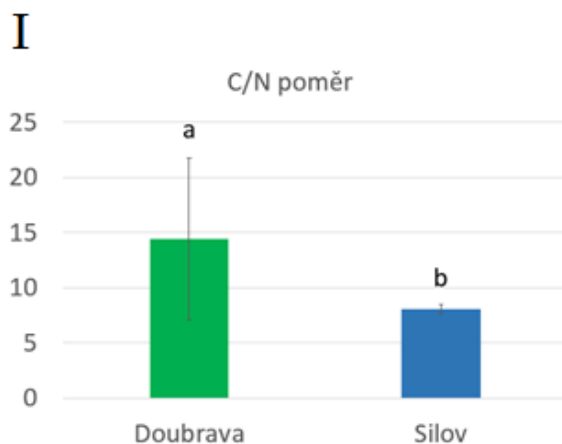
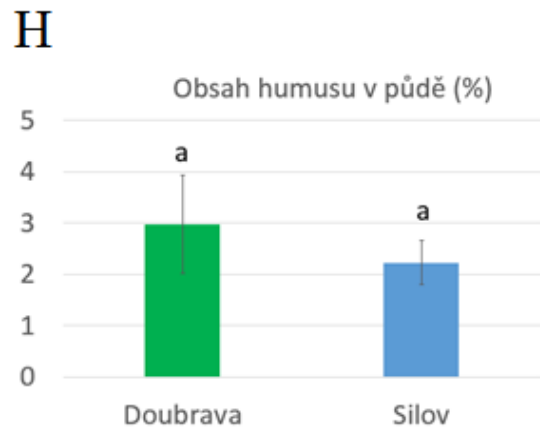
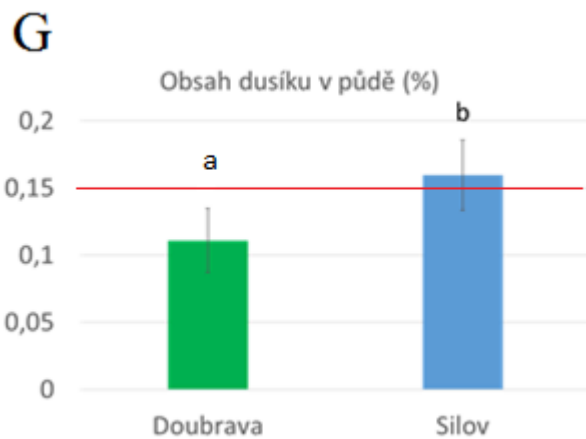
Výsledek rozboru půdy (výměnná kyselost pH a obsah přístupných živin) z roku 1988 semenných sadů Doubrava a Silov a výsledek rozboru půdy (výměnná kyselost pH a obsah přístupných živin) z listopadu 2015 jsou v tabulce 9. Hodnoty rozboru půdy z roku 2015 jsou vždy průměrem z 6 vzorků půd ze semenného sadu Silov a 7 vzorků půd ze semenného sadu Doubrava. Z Tabulky 9 je zřejmé, že se obsah dostupných živin v půdě od roku 1988 zvýšilo, až na množství fosforu v půdě v Silově, které se naopak snížilo. pH v půdách se v obou sadech nepatrně zvýšilo. Statistickou analýzu porovnání půdních rozborů mezi sady v roce 2015 jsem prováděla dvouvýběrovým t-testem (Obrázek 16). Pomocí grafů můžete vidět, že se půdy v semenných sadech mezi sebou liší obsahem hořčíku, dusíku a poměrem uhlíku a dusíku. Obsah hořčíku a dusíku je vyšší v půdě semenného sadu Silov. Poměr uhlíku a dusíku je naopak vyšší u semenného sadu Doubrava. Podle Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ) spadají hodnoty rozboru půdy z roku 2015, podle tabulek pro organominerální horizont půdy pod jehličnatým porostem, do takovýchto kategorií: půda je v obou sadech velmi silně kyselá, množství vápníku je u obou sadů vyhovující, množství hořčíku je v sadu Doubrava nízké a v sadu Silov vysoké, množství fosforu je v sadu Doubrava vyhovující a v sadu Silov nízké, množství draslíku je v obou sadech vyhovující a množství dusíku je v semenném sadu Doubrava nedostačující a v semenném sadu Silov nízké (eagri.cz, 2011). Na základě výsledků rozboru zrnitosti je půda podle Novákovy klasifikační stupnice v sadu Doubrava střední písčitohlinitá a půda v sadu Silov je lehká hlinitopísčítá.

Tabulka 9: Výsledky rozboru půdy ze semenných sadů Doubrava a Silov z roku 1988 a 2015. Data z roku 1988 jsou zhotovené Výzkumným ústavem lesního hospodářství a myslivosti. Pro údaje z roku 2015 platí n=6 (Silov), n=7 (Doubrava). Písmeno x značí, že daný rozbor nebyl vyhotoven.

Vlastnost půdy	Rok 1988		Rok 2015	
	Doubrava	Silov	Doubrava	Silov
Výměnná kyselost pH	3,3	3,6	3,7	3,8
Obsah vápníku (mg Ca/kg)	263	293	441	660
Obsah hořčíku (mg Mg/kg)	50	41	53	121
Obsah fosforu (mg P/kg)	11	36	19	9
Obsah draslíku (mg K/kg)	20	43	83	92
Obsah uhlíku (% C)	x	x	1,7	1,3
Obsah dusíku (% N)	0,05	0,08	0,11	0,16
Obsah humusu (%)	1,7	1,61	3	2,2
Poměr C:N	20	8	14	8

Obrázek 16: Statistické výsledky porovnání půdních rozborů z roku 2015 mezi semennými sady Doubrava a Silov. Sloupce vyjadřují průměrnou hodnotu pH (A), průměrnou hodnotu přístupných živin (B-H) a poměr uhlíku a dusíku (I). Hodnoty pod červenou čarou značí nedostatečné množství živiny v půdě. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. Rozdílná písmena nad sloupci určují statisticky významný rozdíl, který byl prokázán na hladině $p=0,05$ dvouvýběrovým t-testem, $n=6$ (Silov), $n=7$ (Doubrava).





4.3 Výsledky prvního cíle

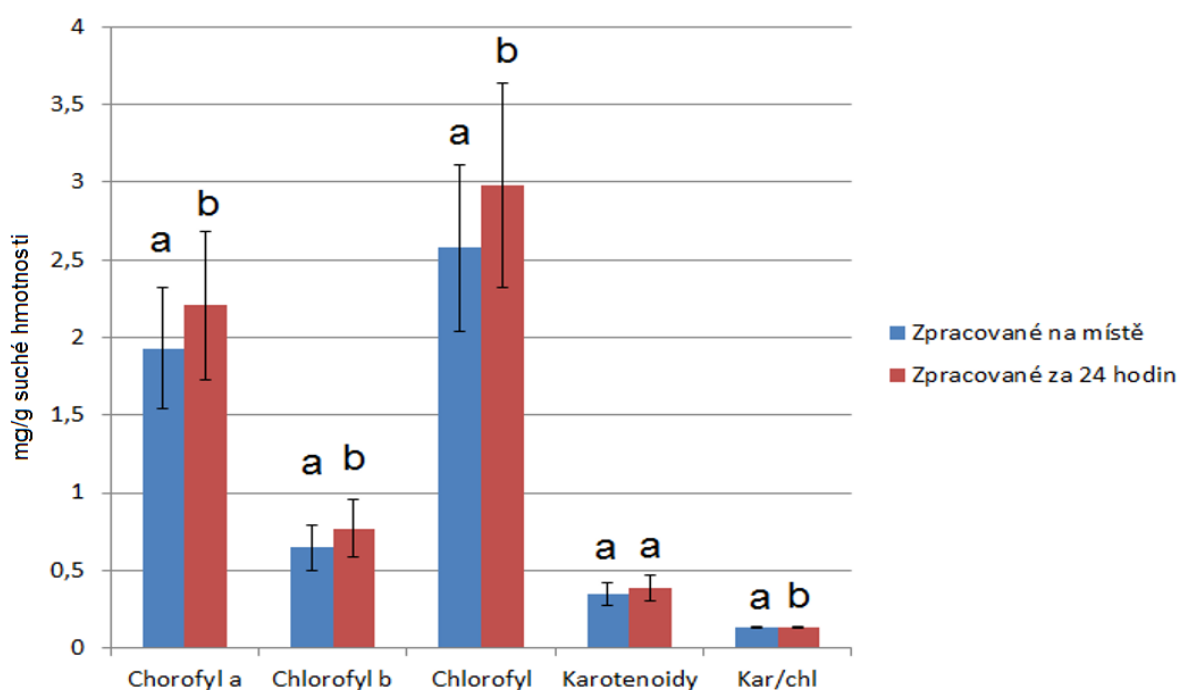
Cíl: Porovnat fyziologické parametry u jedinců se stejným genotypem ve dvou prostředích s různými půdními podmínkami v semenných sadech Doubrava a Silov.

Porovnávala jsem 22 stromů (22 genotypů) v semenném sadu Doubrava s 22 stromy (22 genotypy) v semenném sadu Silov. Stromy se v rámci jednoho semenného sadu mezi sebou liší svými genotypy, ale genotypy v jednom semenném sadu se shodují s genotypy v druhém semenném sadu.

V důsledku toho, že jsem zpracovávala jehlice na biochemickou analýzu pigmentů až za 24 hodin po oddělení větve od stromu, porovnávala jsem množství fotosyntetických pigmentů pro 21 vzorků od 21 stromů stejného genotypu ze semenného sadu Doubrava zpracovaných hned po oddělení větve od stromu s množstvím fotosyntetických pigmentů 21 vzorků ze stejných stromů zpracovaných až po 24 hodinách. Na Obrázku 17 můžeme vidět, že vzorky zpracované po uplynutí 24 hodin po oddělení větve od stromu vykazují větší množství chlorofylu a i b,

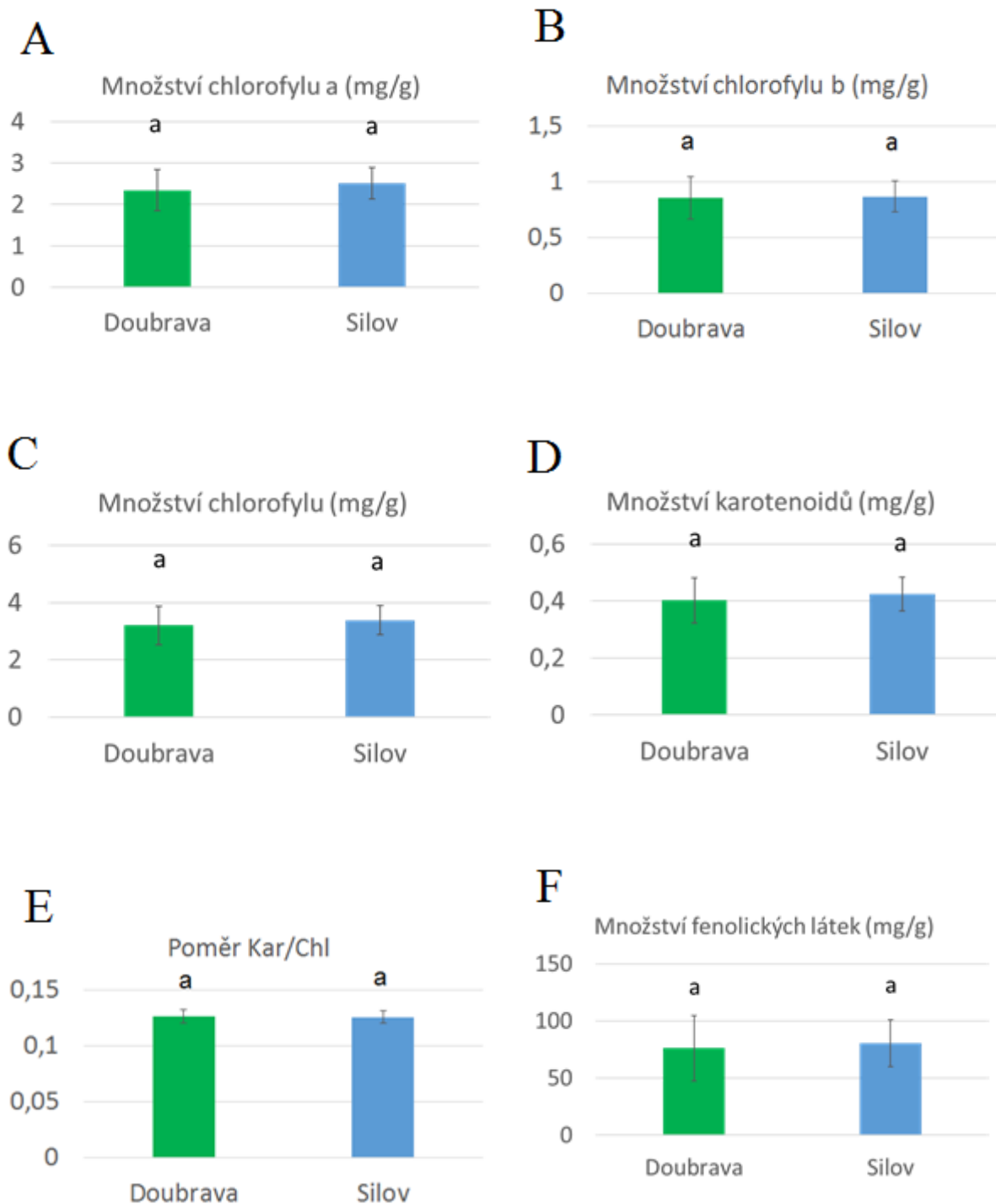
ale množství karotenoidů se nemění. Z těchto výsledků je patrné, že při 24 hodinové prodlevě mezi oddělením větve a zpracováním jehlic nedocházelo k rozkladu chlorofylu. To, že bylo ve vzorcích zpracovaných na místě méně chlorofylu, mohlo být způsobeno metodickou chybou vzniklou při odběru. Podrobnosti budou dále probrány v diskuzi.

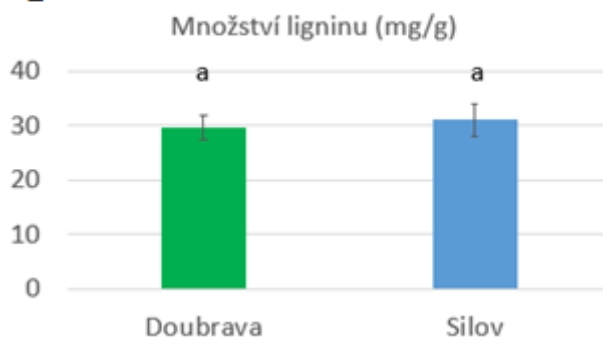
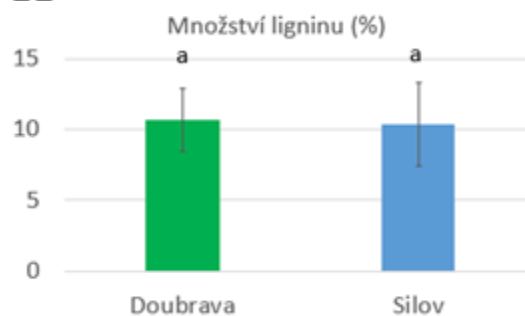
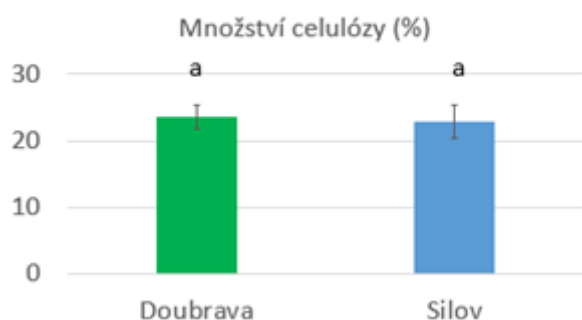
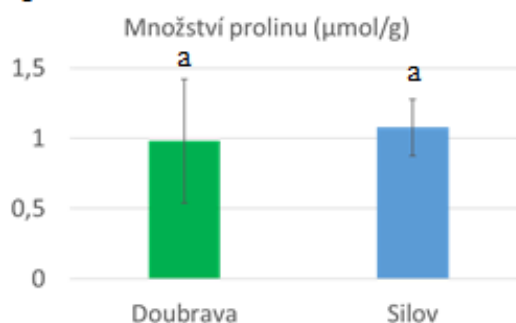
Obrázek 17: Výsledky biochemické analýzy pigmentů vzorků zpracovaných na místě a po 24 hodinách. Sloupce vyjadřují průměrnou hodnotu. Hodnoty jsou vyjádřeny v miligramech na gram suché hmotnosti. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. Rozdílná písmena nad sloupci určují statisticky významný rozdíl, který byl prokázán na hladině $p=0,05$ dvouvýběrovým t-testem, počet n je 21. Kar/chl je zkratkou pro poměr množství karotenoidů a chlorofylu.



Z výsledků biochemické analýzy jehlic (Obrázek 18) můžeme vidět, že se množství fotosyntetických pigmentů, sekundárních metabolitů (tedy ligninu a fenolických látek), prolinu a celulózy mezi sady neliší.

Obrázek 18: Výsledky biochemické analýzy jehlic. Sloupce vyjadřují průměrnou hodnotu. Pigmenty, fenolické látky a lignin jsou vyjádřeny v miligramech na gram suché hmotnosti (A-G), prolin je vyjádřen v mikromolech na gram čerstvé hmotnosti (J) a celulóza a lignin jsou vyjádřeny v procentech suché hmotnosti (H,I). Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. Rozdílná písmena nad sloupci určují statisticky významný rozdíl, který byl prokázán na hladině $p=0,05$ dvouvýběrovým t-testem, $n = 22$ (Doubrava), $n = 22$ (Silov). Kar/chl je zkratkou pro poměr karotenoidů a chlorofylu.



G**H****I****J**

I přesto, že se podle biochemické analýzy množství fotosyntetických pigmentů v jehlicích mezi semennými sady neliší, analýza reflektančních vegetačních indexů ukázala něco jiného (Tabulka 10). Indexy korelující s obsahem chlorofylu v jehlicích prokázaly až najeden případ (index PSSRa) statisticky významný rozdíl mezi sady. Hodnota indexu TCARI/OSAVI klesá s množstvím chlorofylu v jehlicích (Haboudane et al. 2002). Hodnoty ostatních indexů (Datt99, Macc01, NDVIre, REIP, ROSAVI a ZM) stoupají s množstvím chlorofylu v jehlicích (Datt, 1999; Maccioni et al., 2001; Gitelson a Merzlyak, 1994; Guyot a Baret, 1988; Wu et al., 2008; Zarco-Tejada, 2001). Indexy korelující s obsahem karotenoidů a poměrem karotenoidů ke chlorofylu se mezi sady neliší. Indexy korelující s vodním potenciálem a relativním obsahem vody se mezi semennými sady neliší. Z toho, že se výsledky biochemické analýzy a hodnoty vegetačních indexů rozcházejí, můžeme usuzovat, že je ve vegetačních indexech integrována ještě jiná přídatná informace, která se při biochemické analýze neuplatňuje. Podrobnosti budou dále probrány v diskusi.

Tabulka 10: Výsledky hodnot vegetačních indexů mezi semennými sady. Statisticky významný rozdíl byl prokázán dvouvýběrovým t-testem na hladině $p=0,05$, $n=22$ (Silov), $n=22$ (Doubrava). WI je zkratka pro Water Index, NDWI je zkratkou pro Normalized Difference Water Index, TCARI/OSAVI zkratkou pro Transformed Cab Absorption in Reflectance Index/Optimized Soil Adjusted Vegetation Index, PSSRa je zkratkou pro Pigment Specific Simple Ratio, Macc01 je zkratkou Maccioni 01, NDVIre je zkratkou pro Normalized Difference VI – Red Edge, REIP je zkratkou pro Red Edge Inflection Point, ROSAVI je zkratkou pro Revised OSAVI, ZM je zkratkou pro Zarco a Miller, CRI700 je zkratkou pro Carotenoid Concentration Index, PRI_{m1} je zkratkou pro Modified Photochemical Reflectance Index a PRI zkratkou pro Photochemical Reflectance Index.

Index	Korelace	Silov		Doubrava		Statisticky významný rozdíl ($p=0,05$)
		Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka	Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka	
WI	relativní obsah vody	1,063	0,007	1,063	0,006	ne
NDWI	vodní potenciál	0,080	0,011	0,079	0,008	ne
TCARI/OSAVI	obsah chlorofylu	0,225	0,026	0,262	0,042	ano
PSSRa	obsah chlorofylu	8,932	0,642	8,609	0,631	ne
Datt99	obsah chlorofylu	0,733	0,020	0,702	0,030	ano
Macc01	obsah chlorofylu	0,724	0,021	0,693	0,031	ano
NDVIre	obsah chlorofylu	0,542	0,021	0,514	0,032	ano
REIP	obsah chlorofylu	0,211	0,006	0,203	0,010	ano
ROSAVI	obsah chlorofylu	0,503	0,018	0,480	0,031	ano
ZM	obsah chlorofylu	2,642	0,136	2,462	0,172	ano
CRI700	obsah karotenoidů	3,165	0,637	2,884	0,573	ne
PRI _{m1}	obsah karotenoidů	0,122	0,012	0,127	0,012	ne
PRI	poměr Kar/Chl	0,037	0,006	0,036	0,010	ne

Stejně jako některé vegetační indexy i hodnoty některých fluorescenčních parametrů se liší mezi semennými sady (Tabulka 11). Parametry ϕ_{P0} , γ_{RC} , PI_{ABS} a PI_{TOTAL} jsou nižší u stromů v semenném sadu Doubrava. PI_{ABS} popisuje celkovou účinnost PSII od absorpce fotonu světlosběrnou anténou po redukci Q_B , zatímco PI_{TOTAL} popisuje totéž pro celý elektrontransportní řetězec (až k PSI akceptorům elektronů). Parametr γ_{RC} ukazuje pravděpodobnost, že chlorofyl v PSII funguje jako reakční centrum. V sadu Silov byly nižší fluorescenční parametry M_0 , ϕ_{D0} , ABS/RC , TR_0/RC , ET_0/RC , DI_0/RC než v sadu Doubrava.

Tyto parametry souvisejí především se schopností PSII a jeho světlosběrných antén zachytit excitony a iniciovat počáteční přenos elektronů v reakčním centru PSII, případně (ϕ_{D0} , DI_0/RC) schopnost zbavit se přebytečné excitační energie disipací ve formě tepla.

4.4 Výsledky druhého cíle:

Cíl: Porovnat, jak se liší míra variability fyziologických parametrů u různých stromů se stromy stejného genotypu v semenných sadech Doubrava a Silov.

Při řešení tohoto cíle jsem porovnávala u semenného sadu Doubrava 71 stromů různého genotypu (jeden genotyp odpovídá jednomu stromu) s 21 stromy stejného genotypu. U semenného sadu Silov jsem porovnávala 37 stromů různého genotypu (jeden genotyp odpovídá jednomu stromu) s 18 stromy stejného genotypu. Pro výsledek mezi sebou porovnávám rozptyl (varianci) fyziologických parametrů u různých genotypů s rozptylem fyziologických parametrů u stejného genotypu. Výsledky variancí u různých fyziologických parametrů jsou v Tabulce 12. Parametry, které se signifikantně liší ve variabilitě vyjádřené rozptylem mezi stejným a různým genotypem jsou graficky znázorněny na Obrázku 19, 20 a 21.

Na první pohled se rozptyly mezi různými a stejnými genotypy liší více v semenném sadu Doubrava než v semenném sadu Silov. V semenném sadu Doubrava není patrný rozdíl v rozptylu množství chlorofylu a karotenoidů, různé genotypy mají ovšem větší rozptyl v poměru karotenoidů a chlorofylu. Co se týče sekundárních metabolitů, různé genotypy v semenném sadu Doubrava mají větší rozptyl v množství fenolických látek, v rozptylu množství ligninu se už ovšem neliší. Různé genotypy mají dále větší rozptyl v množství prolinu a celulózy. I když se rozptyly množství fotosyntetických pigmentů mezi různými a stejnými genotypy podle biochemické analýzy neliší, vegetační indexy ukazují opět něco jiného. U pěti indexů, které korelují s obsahem chlorofylu a jednoho indexu, který koreluje s obsahem karotenoidů je větší rozptyl hodnot u stejných genotypů než u genotypů různých. Rozptyly hodnot indexů korelujících s relativním obsahem vody a vodním potenciálem se neliší. Dvě třetiny studovaných fluorescenčních parametrů mají větší rozptyl hodnot u různých genotypů než u stejných genotypů, jsou to parametry F_0 , V_J , M_0 , ϕ_{P0} , ϕ_{E0} , ϕ_{D0} , ψ_{E0} , γ_{RC} , ABS/RC , TP_0/RC , ET_0/RC , DI_0/RC , PI_{ABS} a PI_{TOTAL} .

Tabulka 11.: Výsledky hodnot fluorescenčních parametrů mezi semennými sady. Statisticky významný rozdíl byl prokázán dvouvýběrovým t-testem na hladině $p=0,05$, $n=22$ (Silov), $n=22$ (Doubrava). U parametrů, které se mezi sady statisticky významně liší, je červeně vyznačena vyšší hodnota. F_0 minimální fluorescence, F_M je maximální fluorescence, F_V je variabilní fluorescence, V_J je relativní variabilní fluorescence v bodě J, V_I je relativní variabilní fluorescencí v bodě I, M_0 je odhad směrnice relativní variabilní fluorescence V_t v okolí bodu O na OJIP křivce, δ_{RE01} je efektivita/ pravděpodobnost, s jakou bude elektron přenesen z Q_B až k PSI, γ_{RC} je pravděpodobnost, že chlorofyl v PSII funguje jako RC, ϕ_{D0} je kvantový výtěžek disipace zachycené energie, ϕ_{E0} je kvantový výtěžek transportu elektronů z Q_A do Q_B , ϕ_{P0} je maximální kvantový výtěžek PSII, ϕ_{RE01} je kvantový výtěžek transportu elektronů až k PSI, ψ_{E0} je efektivita/ pravděpodobnost, s jakou bude elektron přenesen z Q_A do Q_B , ψ_{RE01} je efektivita/ pravděpodobnost, s jakou bude elektron přenesen až k PSI, ABS/RC je průměrný tok absorpce na RC, neboli zdánlivá velikost antény PSII, TR₀/RC je maximální tok energie zachycený PSII, ET₀/RC je tok elektronů z Q_A na Q_B , DI₀/RC je tok disipované energie vyjádřený na jedno RC PSII, RE₀₁/RC je tok elektronů z Q_A až na PSI, PI_{ABS} je performační index konzervace energie od fotonů ke Q_B , PI_{TOTAL} je performační index konzervace energie od fotonů až k PSI.

Parametr	Silov		Doubrava		Statisticky významný rozdíl ($p=0,05$)
	Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka	Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka	
F_0	6297,167	711,5555	6490,813	745,6477	ne
F_M	35892,19	3277,339	35636,62	3598,47	ne
F_V	29614,62	2713,764	29145,8	3018,62	ne
V_J	0,464414	0,02474167	0,466282	0,02198048	ne
V_I	0,7778584	0,01970577	0,7800707	0,02116596	ne
M_0	0,8686688	0,09706918	0,9160836	0,07602537	ano
ϕ_{P0}	0,8246421	0,01107157	0,81773	0,01187008	ano
ϕ_{E0}	0,4418021	0,02448039	0,4366146	0,02259023	ne
ϕ_{RE01}	0,1830966	0,01655184	0,1798205	0,01726329	ne
ϕ_{D0}	0,1753438	0,01104587	0,18227	0,01187008	ano
ψ_{E0}	0,5355669	0,024748	0,533718	0,02198048	ne
ψ_{RE01}	0,2220194	0,0195936	0,2199293	0,02116596	ne
δ_{RE01}	0,4141663	0,02948661	0,4122576	0,03808759	ne
γ_{RC}	0,3072136	0,01786511	0,2944953	0,01221892	ano
ABS/RC	2,265137	0,1916799	2,401568	0,1449666	ano
TR ₀ /RC	1,866222	0,1398668	1,962686	0,1002906	ano
ET ₀ /RC	0,9975631	0,01386891	1,046602	0,05323154	ano
RE ₀₁ /RC	0,413647	0,03931832	0,4308077	0,03798915	ne
DI ₀ /RC	0,3988418	0,05581919	0,4388827	0,05217532	ano
PI _{ABS}	2,462865	0,5313994	2,185349	0,3999783	ano
PI _{TOTAL}	1,750234	0,4429743	1,540599	0,3454504	ano

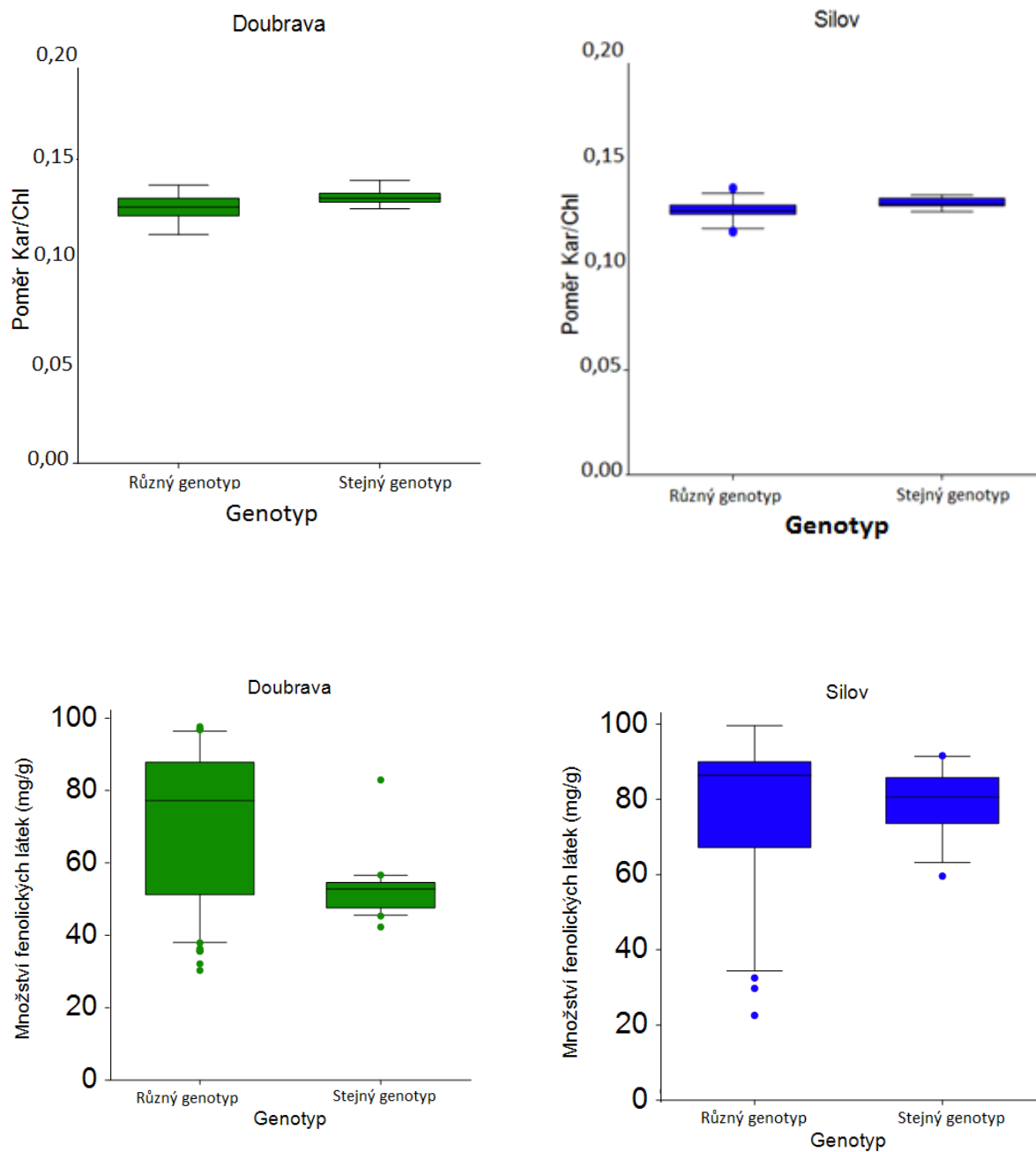
Jak už bylo řečeno v semenném sadu Silov je méně rozdílů v rozptylech než v semenném sadu Doubrava. Stejně jako v sadu Doubrava se u semenného sadu Silov rozptyly u stejných a různých genotypů neliší v hodnotách množství fotosyntetických pigmentů, až na poměr karotenoidů a chlorofylu, který má ovšem na rozdíl od sadu Doubrava větší rozptyl u stejných genotypů. Když se podíváme na rozptyl hodnot množství sekundárních metabolitů, stejně jako u sadu Doubrava v sadu Silov je rozptyl hodnot množství fenolických látek větší u různých genotypů a rozptyly u množství ligninu se neliší. V semenném sadu Silov se neliší rozptyly množství prolinu a celulózy v jehlicích. Stejně tak jako u sadu Doubrava, indexy odpovídající o stavu vody v rostlině mají stejné rozptyly u různých a stejných genotypů. Rozptyly hodnot indexů korelujících s množstvím chlorofylu se liší pouze u dvou indexů, kdy má, na rozdíl od sadu Doubrava, větší rozptyl různý genotyp. Rozptyly u indexů, které korelují s množstvím karotenoidů, se neliší. Rozptyly hodnot se v semenném sadu Silov liší pouze u čtyř fluorescenčních parametrů. U parametrů V_J , ϕ_{E0} , ψ_{E0} a PI_{ABS} je větší rozptyl u různých genotypů než u stejných genotypů.

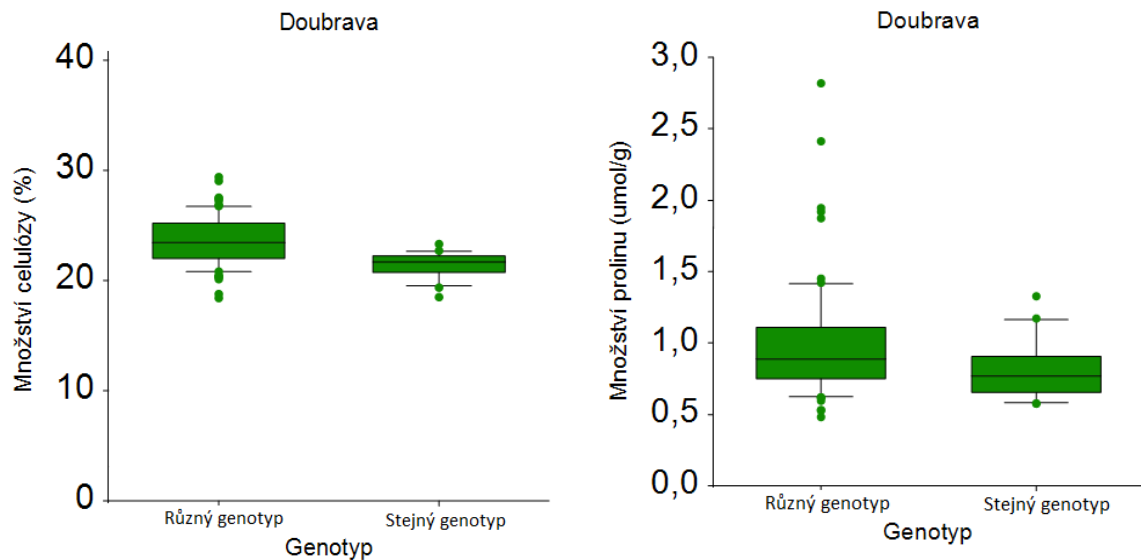
Tabulka 12: Variance fyziologických parametrů. V tabulce jsou hodnoty variance biochemické analýzy, vegetačních indexů a fluorescenčních parametrů různých genotypů a stejných genotypů v semenných sadech Doubrava a Silov. Statisticky významný rozdíl mezi variancemi je otestován Variance Ratio Equal Variance testem a Modified Levene Equal Variance testem na hladině $p = 0,05$. V tabulce jsou zobrazeny p hodnoty. Modře je označen rozptyl, který je ze dvojice rozptylů vyšší. Červeně je vyznačena p hodnota, která je nižší než $0,05$. V tom případě se shodnost rozptylu zamítá. Car/chl je zkratkou pro poměr karotenoidů a chlorofylu. WI je zkratka pro Water Index, NDWI je zkratkou pro Normalized Difference Water Index, TCARI/OSAVI zkratkou pro Transformed Cab Absorption in Reflectance Index/Optimized Soil Adjusted Vegetation Index, PSSRa je zkratkou pro Pigment Specific Simple Ratio, Macc01 je zkratkou Maccioni 01, NDVIre je zkratkou pro Normalized Difference VI – Red Edge, REIP je zkratkou pro Red Edge Inflection Point, ROSAVI je zkratkou pro Revised OSAVI, ZM je zkratkou pro Zarco a Miller, CRI700 je zkratkou pro Carotenoid Concentration Index, PRI_{m1} je zkratkou pro Modified Photochemical Reflectance Index a PRI zkratkou pro Photochemical Reflectance Index. F_0 minimální fluorescence, F_M je maximální fluorescence, F_V je variabilní fluorescence, V_J je relativní variabilní fluorescence v bodě J, V_I je relativní variabilní fluorescencí v bodě I, M_0 je odhad směrnice relativní variabilní fluorescence V_I v okolí bodu O na OJIP křivce, δ_{RE01} je efektivita/ pravděpodobnost, s jakou bude elektron přenesen z Q_B až k PSI, γ_{RC} je pravděpodobnost, že chlorofyl v PSII funguje jako RC, ϕ_{D0} je kvantový výtěžek disipace zachycené energie, ϕ_{E0} je kvantový výtěžek transportu elektronů z Q_A do Q_B , ϕ_{P0} je maximální kvantový výtěžek PSII, ϕ_{RE01} je kvantový výtěžek transportu elektronů až k PSI, ψ_{E0} je efektivita/ pravděpodobnost, s jakou bude elektron přenesen z Q_A do Q_B , ψ_{RE01} je efektivita/ pravděpodobnost, s jakou bude elektron přenesen až k PSI, ABS/RC je průměrný tok absorpce na RC, neboli zdánlivá velikost antény PSII, TR_0/RC je maximální tok energie zachycený PSII, ET_0/RC je tok elektronů z Q_A na Q_B , DI_0/RC je tok disipované energie vyjádřený na jedno RC

PSII, RE₀₁/RC je tok elektronů z Q_A až na PSI, PI_{ABS} je performační index konzervace energie od fotonů ke Q_B, PI_{TOTAL} je performační index konzervace energie od fotonů až k PSI.

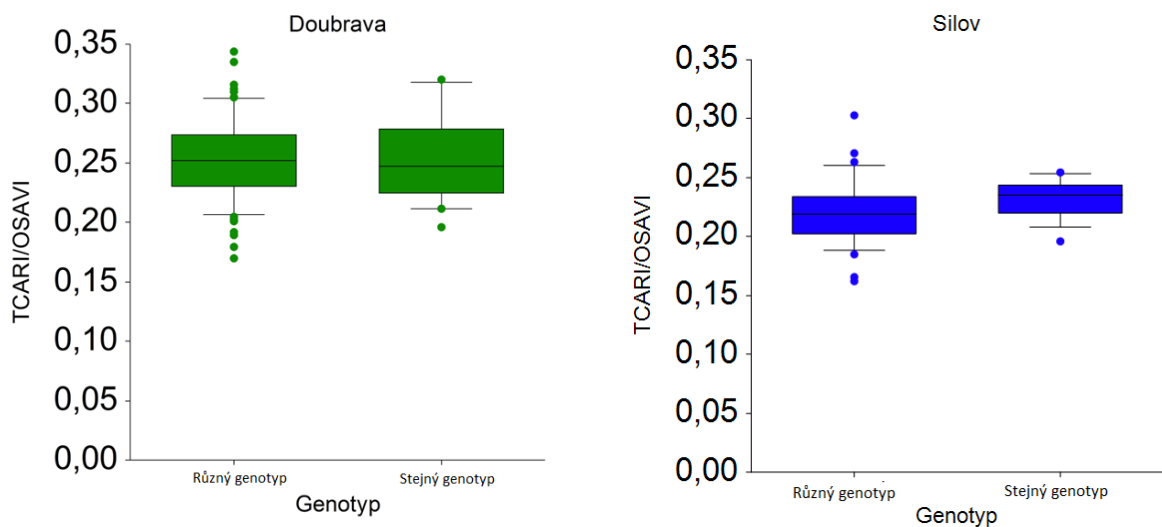
Biochemická analýza								
Fyziologický parametr	Doubrava				Sílov			
	Variance		Variance Ratio	Modified	Variance		Variance Ratio	Modified
	Různý genotyp	Stejný genotyp	Equal Variance Test	Levene Equal Variance Test	Různý genotyp	Stejný genotyp	Equal Variance Test	Levene Equal Variance Test
Chlorofyl a (mg/g)	0,13918260	0,23967700	0,10010600	0,27014000	0,10482270	0,11504440	0,78518700	0,68438100
Chlorofyl b (mg/g)	0,02010615	0,03537507	0,08737200	0,26920500	0,01452816	0,02131168	0,32700000	0,48402000
Chlorofyl (mg/g)	0,26049310	0,45811070	0,08762300	0,24960400	0,19324930	0,23269210	0,61953500	0,59592300
Karotenoidy (mg/g)	0,00386855	0,00696282	0,07532100	0,23893800	0,00276599	0,00326232	0,65536300	0,68286100
Poměr Car/Chl	0,00002969	0,00001015	0,00916900	0,00304200	0,00002425	0,00000539	0,00170200	0,07649900
Fenolické látky (mg/g)	594,19350000	63,68221000	0,00000100	0,00009100	527,75810000	88,73997000	0,00027300	0,07663800
Ligniny (mg/g)	6,28258400	7,02479600	0,70454100	0,67927300	7,48909200	8,27821600	0,77203100	0,94826000
Ligniny (%)	0,46647180	0,42075700	0,82872700	0,82192300	1,18258300	0,70476780	0,25459500	0,36438700
Celulóza (%)	5,51429100	1,32580700	0,00078700	0,00250600	6,62449500	4,89874400	0,51301700	0,92766000
Prolin (μmol/g)	0,16963400	0,04696075	0,00218700	0,17914300	0,05795896	0,04376455	0,54428100	0,86026200
Vegetační indexy								
Fyziologický parametr	Doubrava				Sílov			
	Variance		Variance Ratio	Modified	Variance		Variance Ratio	Modified
	Různý genotyp	Stejný genotyp	Equal Variance Test	Levene Equal Variance Test	Různý genotyp	Stejný genotyp	Equal Variance Test	Levene Equal Variance Test
WI	0,00005093	0,00007769	0,20041500	0,39043700	0,00003957	0,00004693	0,64551100	0,91667600
NDWI	0,00013526	0,00018682	0,32347300	0,43178400	0,00011782	0,00016353	0,39879200	0,55256400
TCARI/OSAVI	0,00119419	0,00399751	0,00019000	0,14567900	0,00080908	0,00026049	0,01509600	0,09374600
PSSRa	0,48638000	0,98399210	0,03258800	0,05609100	0,53510390	0,68894260	0,50951300	0,94230900
Datt99	0,00078172	0,00167286	0,02082200	0,37531500	0,00040896	0,00016494	0,04835900	0,16495900
Macc01	0,00081244	0,00172574	0,02213000	0,36359800	0,00042273	0,00017982	0,06236800	0,19163900
NDVire	0,00082256	0,00175257	0,02158400	0,55218300	0,00044255	0,00028905	0,34965400	0,70355500
REIP	0,00007590	0,00012845	0,11146500	0,78802700	0,00004021	0,00001678	0,05702100	0,22393200
ROSAVI	0,00077616	0,49585030	0,10494300	0,89591400	0,00032198	0,00023199	0,47558200	0,41830600
ZM	0,02793757	0,05029571	0,07520000	0,48612800	0,01876290	0,01171715	0,30042500	0,64165900
CRI700	0,36156160	0,34345430	0,94022400	0,91019000	0,57079150	0,42952900	0,53908500	0,65326500
PRIm1	0,00013933	0,00030258	0,01842400	0,02590300	0,00019583	0,00012068	0,28682800	0,14860500
PRI	0,00008225	0,00009411	0,65678300	0,66967400	0,00004349	0,00008221	0,10701100	0,60013700
Fluorescenční parametry								
Fyziologický parametr	Doubrava				Sílov			
	Variance		Variance Ratio	Modified	Variance		Variance Ratio	Modified
	Různý genotyp	Stejný genotyp	Equal Variance Test	Levene Equal Variance Test	Různý genotyp	Stejný genotyp	Equal Variance Test	Levene Equal Variance Test
F ₀	614892,50	237895,20	0,02	0,05	503910,90	552044,40	0,79	0,49
F _M	13104170,00	11866110,00	0,84	0,57	13821900,00	8833459,00	0,33	0,39
F _V	9106824,00	8962535,00	1,00	0,75	9849214,00	5518888,00	0,20	0,21
V _J	0,00058837	0,00009619	0,00003800	0,00108900	0,00048202	0,00016190	0,01898300	0,03507000
V _I	0,00046585	0,00032075	0,35187400	0,18912400	0,00049827	0,00055958	0,74298700	0,69161000
M ₀	0,00656328	0,00158942	0,00083000	0,00821400	0,00830025	0,00612156	0,50908900	0,48709200
φ _{PD}	0,00015940	0,00004875	0,00436600	0,14054500	0,00011383	0,00010337	0,85879800	0,40814600
φ _{EO}	0,00061824	0,00009496	0,00002300	0,00207300	0,00047859	0,00019649	0,05270400	0,03330000
φ _{RE01}	0,00031272	0,00018615	0,19353900	0,07332000	0,00032980	0,00038188	0,68788200	0,72690200
φ _{DO}	0,00015940	0,00004875	0,00436600	0,14054500	0,00011351	0,00010337	0,86409400	0,40998000
ψ _{EO}	0,00058837	0,00009619	0,00003800	0,00108900	0,00048225	0,00016190	0,01893500	0,03481800
ψ _{RE01}	0,00046585	0,00032075	0,35187400	0,18912400	0,00049596	0,00055958	0,73451000	0,67809600
δ _{RE01}	0,00153715	0,00101292	0,29670000	0,22850400	0,00128695	0,00163330	0,53228300	0,50584400
Y _{RC}	0,00016127	0,00004589	0,00265500	0,07365600	0,00028455	0,00022214	0,59624900	0,63718600
ABS/RC	0,02295697	0,00553796	0,00080600	0,05468000	0,03250014	0,03448475	0,84812400	0,78674400
TR ₀ /RC	0,01080957	0,00354056	0,00691300	0,06578600	0,01838839	0,01659778	0,84760900	0,92980800
ET ₀ /RC	0,00324655	0,00079462	0,00089800	0,01122400	0,00394094	0,00339682	0,76403200	0,66903200
RE ₀₁ /RC	0,00158535	0,00094096	0,19104500	0,21685600	0,00143777	0,00174617	0,60488900	0,40994100
DI ₀ /RC	0,00308018	0,00054330	0,00007100	0,02272900	0,00253297	0,00349824	0,40564700	0,69086300
PI _{ABS}	0,18532220	0,04274948	0,00057700	0,01181100	0,22917350	0,10320940	0,08114900	0,03370700
PI _{TOTAL}	0,12730410	0,05273328	0,02985900	0,02583800	0,19653440	0,17758190	0,84953200	0,80308500

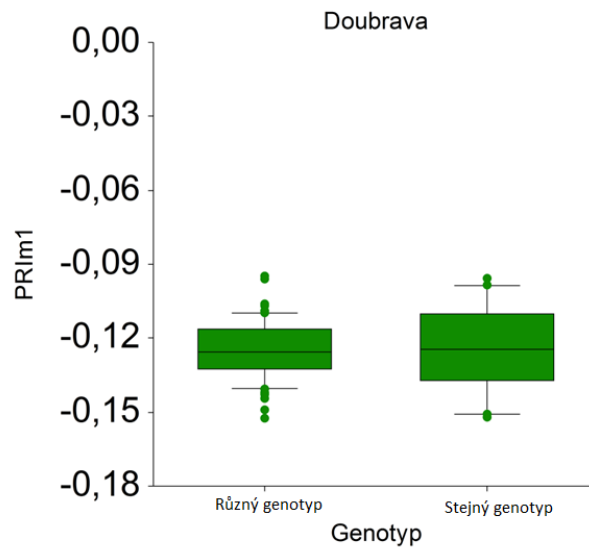
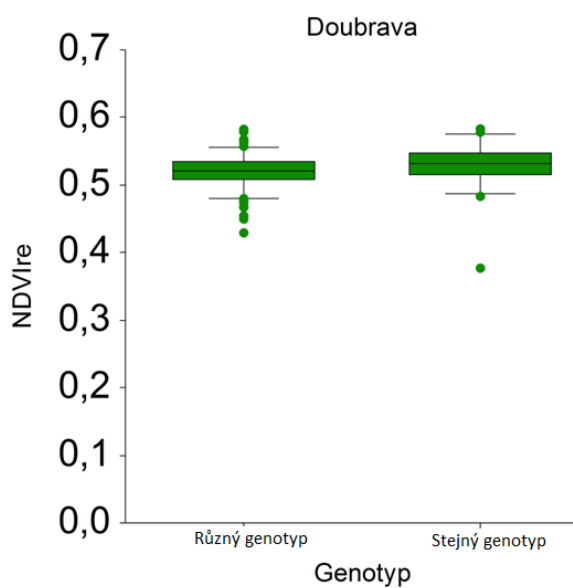
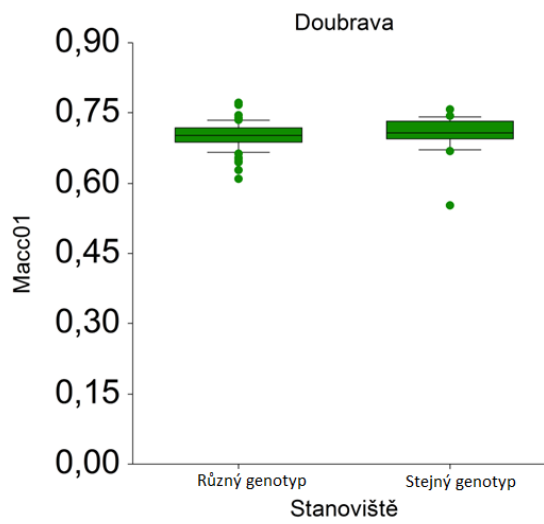
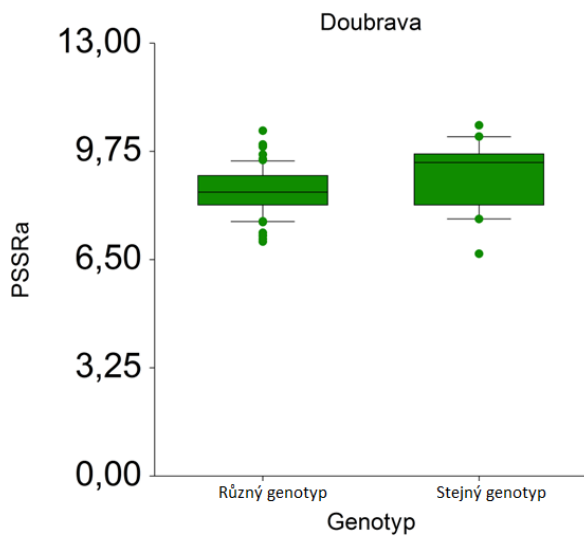
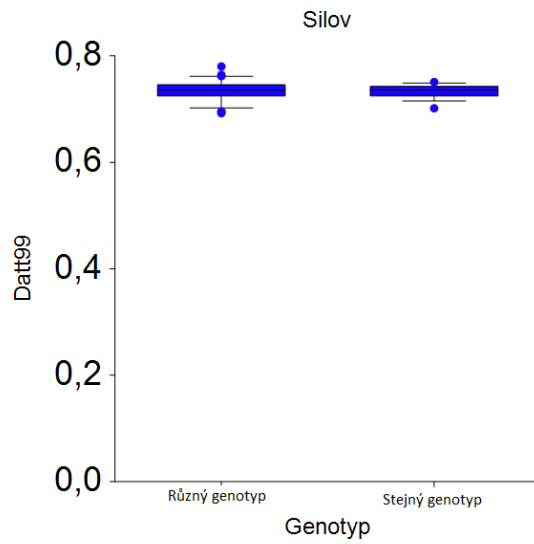
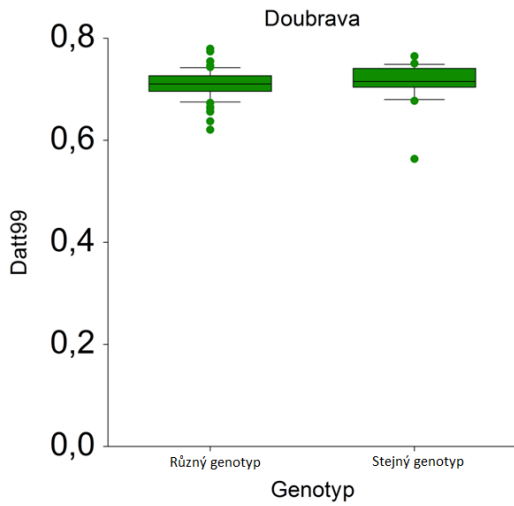
Obrázek 19.: Variance hodnot biochemické analýzy u různých a stejných genotypů semenných sadů Doubrava a Silov (pouze ty, u kterých byl prokázán signifikantní rozdíl). Uprostřed boxu se nachází medián, do okraje boxu náleží hodnoty spadající do oblasti ± 25 percentil, vousy jsou značeny hodnoty spadající do oblasti ± 15 percentil a odléhlé hodnoty spadají do oblasti ± 5 percentil. Kar/chl je zkratkou pro poměr karotenoidů a chlorofylu.



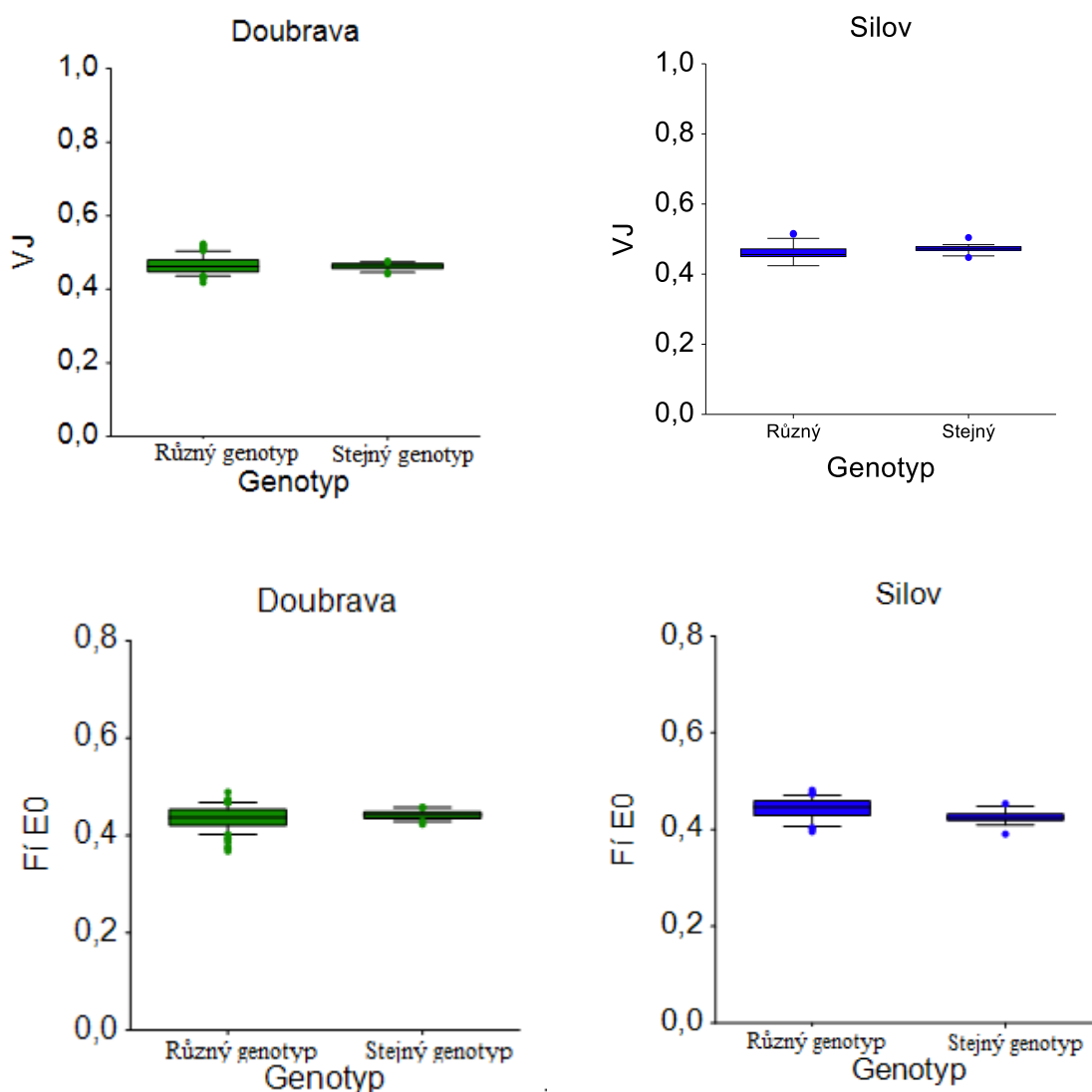


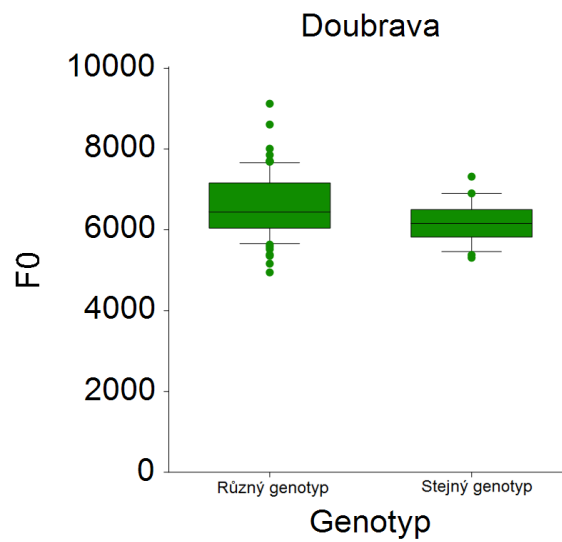
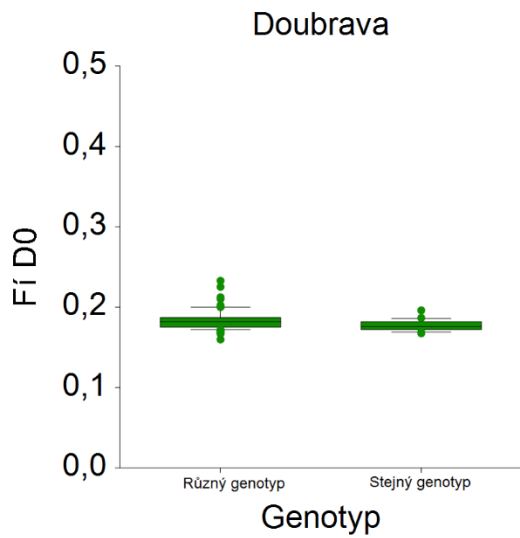
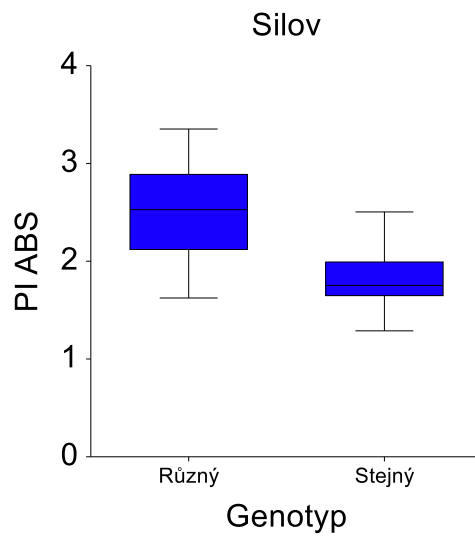
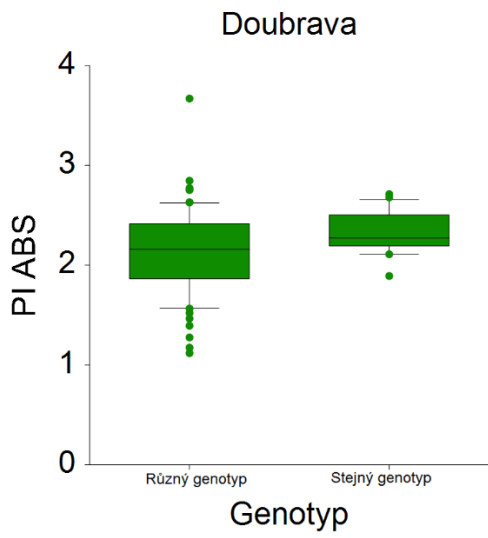
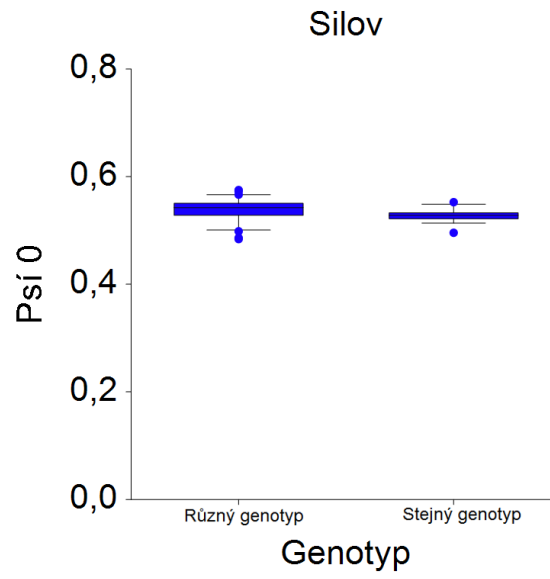
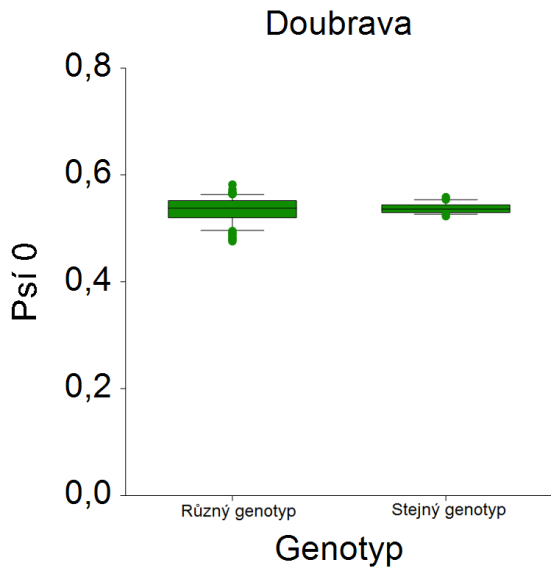
Obrázek 20.: Variance hodnot reflektančních indexů u různých a stejných genotypů semenných sadů Doubrava a Silov (pouze ty, u kterých byl prokázán signifikantní rozdíl). Uprostřed boxu se nachází medián, do okraje boxu náleží hodnoty spadající do oblasti ± 25 percentil, vousy jsou značeny hodnoty spadající do oblasti ± 15 percentil a odléhlé hodnoty spadají do oblasti ± 5 percentil. TCARI/OSAVI zkratkou pro Transformed Cab Absorption in Reflectance Index/Optimized Soil Adjusted Vegetation Index, PSSRa je zkratkou pro Pigment Specific Simple Ratio, Macc01 je zkratkou Maccioni 01, NDVIre je zkratkou pro Normalized Difference VI – Red Edge a PRIm1 je zkratkou pro Modified Photochemical Reflectance Index.

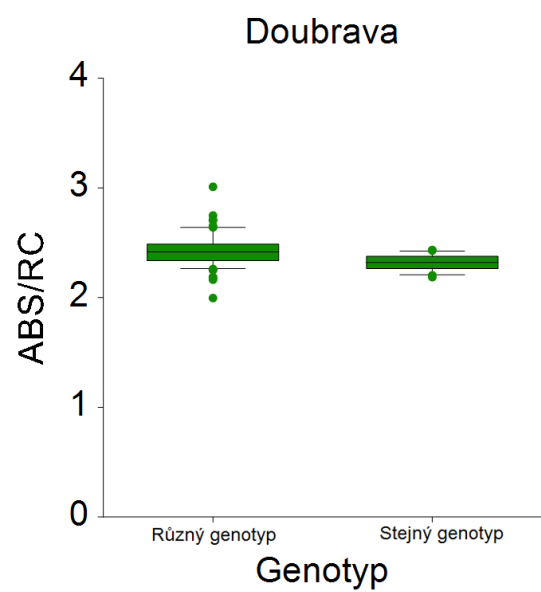
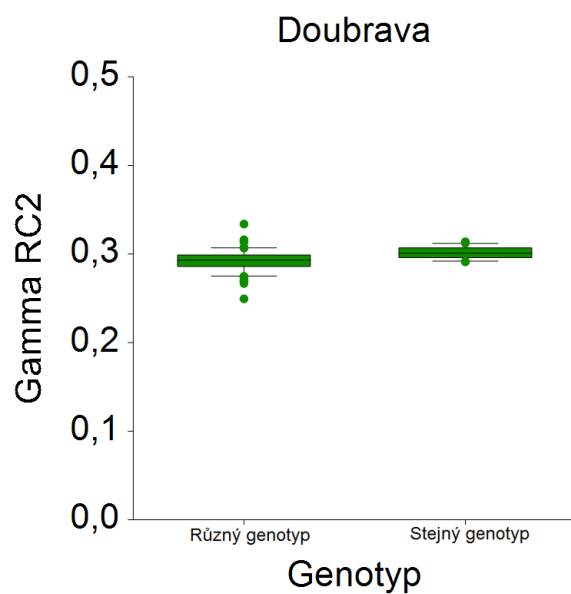
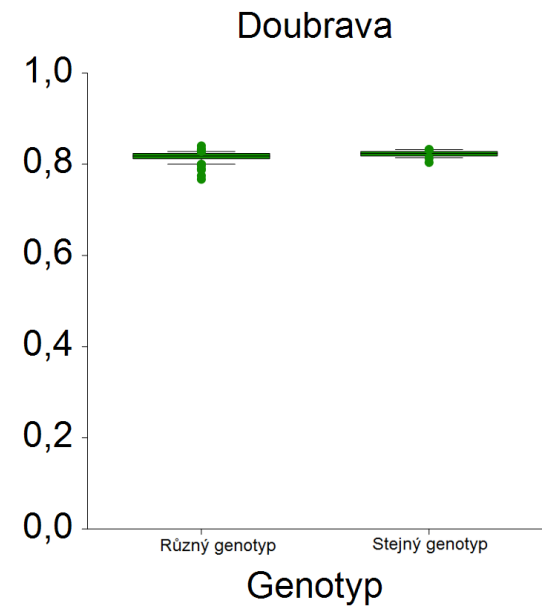
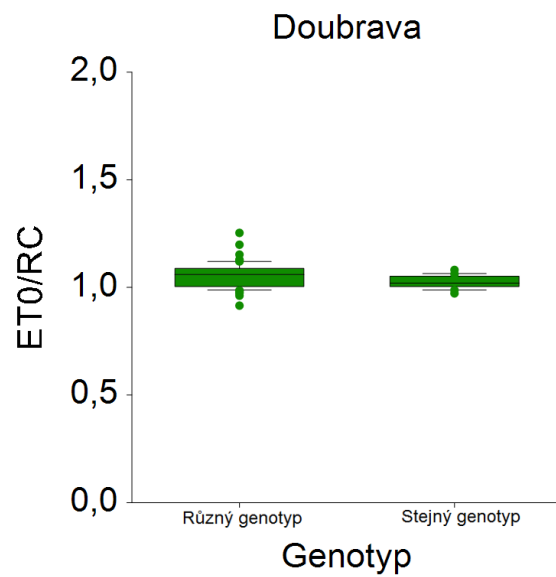
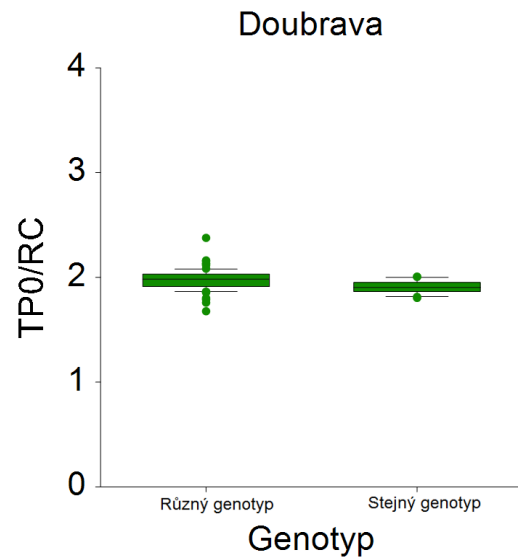
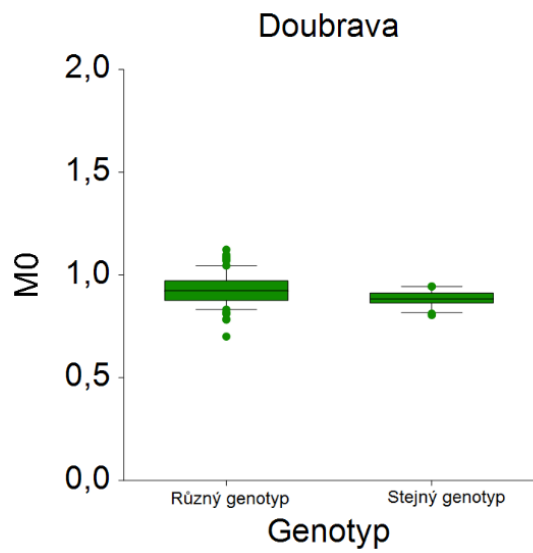


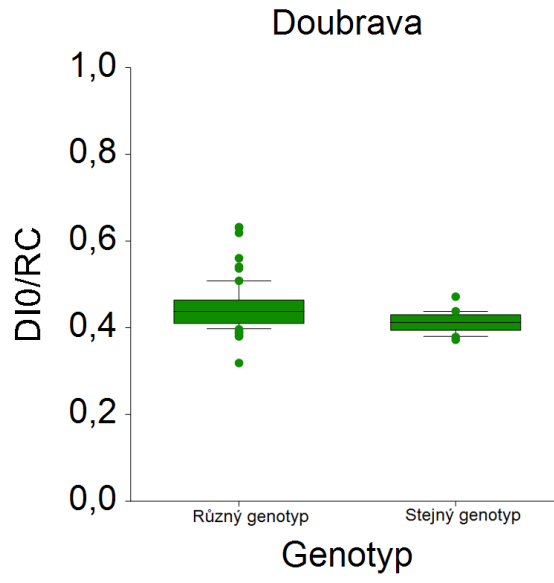
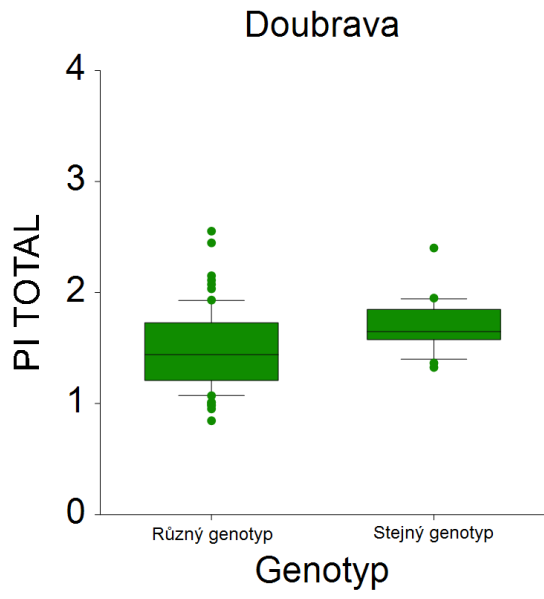


Obrázek 21.: Variance hodnot fluorescenčních parametrů u různých a stejných genotypů semenných sadů Doubrava a Silov (pouze ty, u kterých byl prokázán signifikantní rozdíl). Uprostřed boxu se nachází medián, do okraje boxu náleží hodnoty spadající do oblasti ± 25 percentil, vousy jsou značeny hodnoty spadající do oblasti ± 15 percentil a odlehlé hodnoty spadají do oblasti ± 5 percentil. V_J je relativní variabilní fluorescence v bodě J, ϕ_{D0} (Fí D0) je kvantový výtěžek disipace zachycené energie, ϕ_{E0} (Fí E0) je kvantový výtěžek transportu elektronů z Q_A do Q_B , ϕ_{P0} (Fí P0) je maximální kvantový výtěžek PSII, ψ_{E0} (Psi 0) je efektivita/ pravděpodobnost, s jakou bude elektron přenesen z Q_A do Q_B , F_0 minimální fluorescence, M_0 je odhad směrnice relativní variabilní fluorescence, π_{ABS} je performační index konzervace energie od fotonů ke Q_B , π_{TOTAL} je performační index konzervace energie od fotonů až k PSI, TR_0/RC (TP0/RC) je maximální tok energie zachycený PSII, ET_0/RC je tok elektronů z Q_A na Q_B , DI_0/RC je tok disipované energie vyjádřený na jedno RC PSII, ABS/RC je průměrný tok absorpce na RC, γ_{RC} (Gamma RC2) je pravděpodobnost, že chlorofyl v PSII funguje jako RC.









5 Diskuse

Na následujících stránkách nejprve diskutuji použité metodické postupy a návrh experimentu. V další části se zaměřím na diskusi experimentálních výsledků své práce. Diskuse výsledků práce bude rozdělena na podkapitulu popis stanovišť (protože znalost stanovišť je nezbytná pro další pochopení výsledků práce) a diskusi samotných výsledků, která je rozdělena podle cílů mé práce.

5.1 Diskuse použití metodických postupů

Nespecifické indikátory stresu, které jsou použity v této práci, byly už nespočetněkrát využity pro zjištění, jestli není daná rostlina v určitém stresu (abiotickém i biotickém). Nutné je mít na paměti, že jednotlivé indikátory mohou reagovat na více druhů stresu. Proto, když výzkum neprobíhá v pečlivě kontrolovaných laboratorních nebo skleníkových podmínkách, je těžké s jistotou určit, na jaký stres rostlina pomocí nespecifických indikátorů stresu reaguje. Z použitých metod bych položila důraz na metody měření odrazivosti a fluorescence. Výhoda metod měření odrazivosti a fluorescence oproti metodám biochemické analýzy je, že jsou mnohem šetrnější. Tím, že odrazivost a fluorescence mohou být měřeny přímo na místě, na jehlicích větve neoddělené od stromu, se minimalizují případné metodické chyby a předchází se nešetrným zacházením se vzorkem, při kterém by mohlo dojít ke ztrátě některých informací. Současné jsou metody měření odrazivosti a fluorescence oproti biochemickým metodám méně časově náročné a obsáhnou mnohem více informací (metoda měření fluorescence dokonce určí konkrétní děj v elektron-transportním řetězci). Při měření fluorescence v terénu ovšem dochází ke komplikaci se zatemňováním vzorku, se kterou se potýkala například Palovská (2015). Z důvodu komplikace se zatemňováním vzorků jsem nakonec zvolila práci s větvemi oddělenými od stromu v laboratorních podmínkách. U hodnot fluorescenčních parametrů naměřených na větvích neoddělených od stromu a naměřených na větvích oddělených od stromu nebyl prokázán rozdíl například ve studii Čepl et al. (2016) nebo ve studii Richardson a Berlyn (2002).

Překvapivý je výsledek biochemického stanovení pigmentů mezi jehlicemi odebranými hned po oddělení větve od stromu a jehlicemi odebranými za 24 hodin oddělení větve od stromu. Tento pokus byl proveden pro kontrolu, jestli se chlorofyl v jehlicích, při 24 hodinové pauze mezi oddělením větve od stromu a zpracováním jehlic, nerozkládá. Překvapivé bylo

zjištění, že obsah chlorofylu naměřený v jehlicích zpracovávaných po 24 hodinách od oddělení větve od stromu byl signifikantně vyšší, než u větvi zpracovávaných na místě. Jehlice odebírané na místě a po 24 hodinách byly vždy ze stejné části větve, proto se dá předpokládat minimální vliv pozice jehlice na větvi na výsledné množství chlorofylu. Možnou odpovědí na snížené množství pigmentů při odběru na místě je to, že při odběru jehlic v sadu mírně přšelo a voda, která se mezi jehlice dostala, mohla zkreslit hmotnosti navážek použitých pro výsledné výpočty pigmentů. O této možnosti můžeme ovšem pouze spekulovat. Důležitým faktem zůstává, že se pigmenty po 24 hodinách oddělení větve od stromu nerozkládaly a výsledky biochemické analýzy pigmentů tedy můžeme považovat za správné.

5.2 Diskuse návrhu experimentu

Porovnávání vlivu dvou odlišných prostředí na rostliny je složité z toho důvodu, že není přesně znám genetický podklad těchto stromů. Genotypy rostlin mohou být značně variabilní a variabilní může být také jejich reakce na dané prostředí. Toto platí zejména u borovice lesní, protože je její areál přirozeného výskytu široký, a tím se i reakce na určitý stres odvíjí například od toho, z jaké oblasti pochází a jak jsou na daný stres stromy adaptované (Salmela et al., 2011). Porovnávání množství látek sloužících jako nespecifické indikátory stresu v jehlicích borovic mezi dvěma semennými sady je výhodou právě díky zmapovanému genetickému podkladu stromů, kdy můžeme vyloučit specifické chování genotypů a soustředit se pouze na reakci stromů na dané prostředí.

Porovnáním variability fyziologických parametrů u stejného genotypu s různými genotypy můžeme zjistit za prvé, jestli jsou fyziologické parametry geneticky podmíněné, a za druhé, jestli a jakým způsobem genotypy pomocí těchto parametrů reagují na dané prostředí. Ve studii v testovacích výsadbách (na potomcích stromů semenných sadů Silov a Doubrava) byly genotypy ve studovaných fluorescenčních parametrech značně variabilní, ale neprokázala se interakce genotypu s prostředím (Čepl et al., 2016).

Výzkum nespecifických indikátorů stresu na různých genotypech má budoucnost především ve šlechtitelství borovice, protože množství nespecifických indikátorů stresu v jehlicích prozradí o fyziologické zdatnosti stromu víc, než prozradí klasické lesnické parametry, změřené především na kvalitu a kvantitu dřeva. Fyziologické parametry použité v této práci, byly již několikrát použity při výběru genotypu rezistentního proti určitému stresu např. sucho (De Diego et al., 2015; Xue et al., 2013; Bala et al., 2015) nebo stres z nedostatku

živin (Su et al., 2015; Xue et al., 2013). Nicméně výzkumů probíhajících přímo v semenných sadech nebo v testovacích výsadbách a které by kromě molekulárních markerů do programu šlechtění zařadily i markery fyziologické, jsem našla pouze málo. Například Hawkins a Stoeher (2009) zmapovali rychlost růstu, fenologii a rezistenci proti mrazu u genotypů plnosesterského potomstva testovacích výsadeb douglasky tisolisté (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco var. *menziesii*) s úmyslem založení semenného sadu čtvrté generace. Rezistence proti mrazu byla měřena v zimních měsících a byla vyjádřena fluorescenčním parametrem F_M/F_V . Některé genotypy se chovaly na obou zkoumaných stanovištích jako nejvíce aklimatizované na zimu a některé genotypy jako nejméně aklimatizované na zimu. Přesto autoři nenašli souvislost mezi rychlostí růstu, fenologií a rezistencí proti mrazu a výškou stromu, která sloužila v tomto šlechtitelském programu jako selekční znak pro výběr elitních jedinců. Korelaci našli mezi rezistencí proti mrazu a nadmořskou výškou místa, odkud pocházely „prarodiče“ zkoumaných stromů. Parametr F_M/F_V v zimních měsících klesal s rostoucí nadmořskou výškou místa původu „prababiček“ zkoumaných stromů.

Pro potvrzení, jestli se dají zkoumané fyziologické parametry použít pro šlechtění borovic v semenných sadech Silov a Doubrava, by bylo zajímavé mezi sebou porovnat hodnoty fyziologických parametrů jednotlivých genotypů a vybrat jedince, kteří jsou nejvíce odolní proti stresům. S ohledem na vybrané genotypy, které byly vybrány po konzultaci s kolektivem z České zemědělské univerzity vedeným prof. Milanem Lstibůrkem na základě kompromisu mezi počtem genotypů a ramet jednotlivých genotypů, jsem od tohoto cíle ustoupila, protože by nebyl na daném datovém souboru statisticky zpracovatelný (každý genotyp je zastoupen pouze jednou rametou). Porovnání hodnot fyziologických parametrů mezi genotypy tedy zůstává jako zajímavý cíl výzkumu do budoucna.

Protože jsou stromy v semenném sadu roubovanci, genetický podklad je zmapovaný u roubů, ale u podnoží zůstává neznámý. Proto můžeme jen odhadovat, jak velký vliv měl genotyp podnože na konečné výsledky. Protože prvním cílem bylo porovnat reakci stejných genotypů na rozdílné půdní podmínky, mohl by genotyp podnože zvyšovat efektivitu využívání živin z půdy u některých jedinců například rozvětvenějším kořenovým systémem, a tím by stejné genotypy mezi semennými sady nemusely reagovat stejně. Dále by mohly genotypy podnoží zvětšovat rozptyl hodnot fyziologických parametrů stejných genotypů a tím ovlivňovat výsledky druhého cíle. Také díky tomu by mohlo být zajímavé porovnat hodnoty fyziologických parametrů genotypů v semenných sadech s hodnotami fyziologických parametrů jejich potomků v testovacích výsadbách. Protože potomci stromů ze semenných sadů pocházejí z jejich semen, podobné fyziologické reakce potomků a rodičů by mohly být

znakem, že daná reakce stromu v semenném sadu je dána genotypem roubu a ne podnože. Protože u 15 z 18 fluorescenčních parametrů byla zjištěna signifikantní dědivost (Čepl et al., 2016), zdá se, že u fluorescenčních parametrů jsou aspoň z určité míry individuální reakce genotypu dány roubem.

5.3 Diskuse experimentálních výsledků

5.3.1 Popis stanovišť

Oba semenné sady se nachází v jedné oblasti, v Plzeňském kraji v oblasti Západočeské pahorkatiny, a jsou od sebe vzdáleny cca 50 km vzdušnou čarou. Jejich nadmořská výška se zásadně neliší (semenný sad Silov je položen o 100 – 120 m. n. m. výše než semenný sad Doubrava). Nejvyšší odlišnost prostředí v sadech je tady dána vlastností půdy a konkrétními meteorologickými podmínkami, které bohužel nebyly měřeny přímo v sadech, ale na cca 4 km vzdálených meteorologických stanicích.

Půda v semenném sadu Doubrava se prokázala být chudší na živiny než půda v semenném sadu Silov, a to v množství dusíku a hořčíku. Množství dusíku je dokonce podle ÚKZÚZ v sadu Doubrava nedostačující. Půda v sadu Silov je na základě rozboru zrnitosti lehká (hlinitopísčítá), tedy půda, která snadněji vysychá, oproti půdě v sadu Doubrava, která byla určena jako střední (písčitohlinitá). Půda v sadu Doubrava byla ovšem mnohem kamenitější, což do rozboru zrnitosti nebylo zahrnuto (zařazení do půdních druhů se provádí pro zrna nižší než 0,01 mm), a proto i přes půdní druh může mít půda v semenném sadu Doubrava nižší schopnost zadržování vody. V době odběru jehlic byly celkově velmi suché podmínky, v porovnání s dlouhodobým srážkovým normálem zjištěným za období 1961 – 1990 pro plzeňský kraj byl měsíc červenec pouze 36 % normálu, celý rok byl potom 76 % normálu (ČHMÚ, 2016). Tyto podmínky by mohly fakt, že je půda v sadu Doubrava sušší, ještě umocňovat. Zároveň bylo v měsíci květnu a červnu a celkově v sadu Doubrava naměřeno méně průměrných srážek než v sadu Silov.

5.3.2 *Výsledky prvního cíle*

Cílem této části práce bylo porovnat reakci na okolní prostředí, které se mezi sady liší půdními podmínkami u 22 genotypů stromů zastoupených v obou sadech. Pokud předpokládáme, že stejné genotypy reagují na okolní prostředí stejným (nebo aspoň velmi podobným) způsobem, můžeme také předpokládat, že stromy v obou sadech reagovaly stejným způsobem, a změny ve fyziologických parametrech jsou dány odlišností prostředí.

Výsledky biochemické analýzy (množství fotosyntetických pigmentů, fenolických látek, ligninu, celulózy a prolinu) se mezi semennými sady nelišily. Tento fakt je zcela logický, když si uvědomíme, že pro účely semenných sadů není žádoucí, aby stromy rostly ve stresovém prostředí. To, že zkoumané stromy pravděpodobně nebyly stresované, mohou ukazovat i naměřené hodnoty zkoumaných parametrů, které jsou často srovnatelné s údaji, které jsem našla v literatuře u kontrolních stromů borovice lesní či dalších druhů borovice. Avšak při tomto srovnání jsem si vědoma, že absolutní hodnoty obsahů látek využitých jako nespecifické indikátory stresu nejsou přímo vypovídající o fyziologickém stavu rostliny např. tak, jako přesná rozmezí fyziologických hodnot pro různé parametry u člověka (např. glykémie, obsah cholesterolu v krvi, krevní obraz, koncentrace Na a K iontů v krvi a obsah hormonů).

Množství fotosyntetických pigmentů u borovice lesní (mg/g suché hmotnosti) mezi 14. červencem až 5. srpnem, tedy i v období kdy se odebíraly jehlice ze semenných sadů Doubrava a Silov, bylo ve studii Sofronove et al. (2016) následující: množství chlorofylu *a* $1,76 \pm 0,14$; množství chlorofylu *b* $0,58 \pm 0,08$; celkové množství chlorofylu $2,34 \pm 0,22$ a množství karotenoidů $0,46 \pm 0,05$. Naměřené hodnoty v semenných sadech Doubrava a Silov (mg/g suché hmotnosti) jsou dokonce vyšší, pro Doubravu: množství chlorofylu *a* je $2,34 \pm 0,49$; množství chlorofylu *b* je $0,86 \pm 0,19$; celkové množství chlorofylu je $3,20 \pm 0,68$ a množství karotenoidů je $0,40 \pm 0,08$ a pro Silov: množství chlorofylu *a* je $2,51 \pm 0,37$; množství chlorofylu *b* je $0,87 \pm 0,14$; celkové množství chlorofylu je $3,38 \pm 0,51$ a množství karotenoidů je $0,42 \pm 0,06$. Sice byly stromy ve studii Sofronove et al. (2006) stejně staré jako stromy ze semenných sadů, ale nacházely se ve vyšší zeměpisné šířce a byly u nich odebrány první ročníky jehlic, proto se nedá z hodnot fotosyntetických pigmentů s přesností určit, jestli byly stromy v semenných sadech ve stresu. Nižší hodnoty fotosyntetických pigmentů u stromů ve studii Sofronove et al. (2006) by mohly ukazovat na vyšší severní šířku, a tedy i nižší průměrné roční teploty.

Pasqualini et al. (2003) naměřil u borovice halepské na několika místech s různým znečištěním ovzduší hodnoty mezi 20 až 40 mg/g suché hmotnosti celkových fenolických látek. Průměr hodnot naměřených na stromech v Silově byl $80,48 \pm 20,39$ a naměřených na stromech v Doubravě byl $76,04 \pm 28,51$, tedy dvakrát více než naměřil Pasqualini et al. (2003). Protože použitá metoda u této studie byla stejná jako u té moje a použity byly loňské jehlice (jako u stromů v mojí práci) předpokládám, že nižší hodnoty u této studie jsou dány jinou pozicí studovaných jehlic v koruně stromu nebo jiným druhem stromu (Lhotáková a Albrechtová, 2016).

Množství ligninu u slunných jehlic nestresovaných borovic těžkých se pohybovalo okolo 30 - 31 mg/g suché hmotnosti ve studii Vance a Zaerra (1991). Tato hodnota se shoduje u naměřených hodnot v mojí práci (u sadu Silov je to $31,05 \pm 2,97$ mg/g suché hmotnosti a sadu Doubrava $29,76 \pm 2,23$ mg/g suché hmotnosti).

Ve studii Deligoze a Gura (2015) hodnoty mezi 1 – 2 $\mu\text{mol/g}$ prolinu v jehlicích borovice pinie vystoupají po 21 dnech stresování suchem až na hodnoty mezi 6 – 7 $\mu\text{mol/g}$ prolinu. Hodnoty v semenných sadech (0,98 $\mu\text{mol/g}$ prolinu v sadu Doubrava a 1,07 $\mu\text{mol/g}$ prolinu v sadu Silov) ukazují, že stromy v sadech nemusely být výrazně stresované i když jsem vzorky odebírala v průběhu sušší sezony oproti dlouhodobému normálu.

I přesto že u biochemické analýzy fyziologických parametrů nebyl prokázán rozdíl mezi sady, analýza vegetačních indexů odvozených z reflektance ukázala u většiny indexů korelujících s obsahem chlorofylu statisticky významný rozdíl mezi sady. Stejně tak i některé fluorescenční parametry prokázaly statisticky významný rozdíl mezi sady. To znamená, že je ve vegetačních indexech a fluorescenčních parametrech zakomponováno více informací o fyziologickém stavu jehlic než jen informace o samotném obsahu pigmentů či stavu fotosystému II. Podobný jev zaznamenal i Cavender-Bares et al. (2016), který se snažil charakterizovat blízké příbuzné druhy dubu a jednotlivé populace v rámci druhu dubu *Quercus oleoides* pomocí odrazivosti listu. V této studii zjistili, že pro charakteristiku stejného druhu stromu i stejné populace stromu je přesnější použít celé spektrum odraženého záření, než pouze jeho části a vegetační indexy, právě proto, že celé spektrum odraženého záření má díky vyšší dimenzionalitě dat lepší výpovědní hodnotu o fyziologických i chemických parametrech listů.

Hodnota indexu TCARI/OSAVI se se zvyšujícím množstvím chlorofylu snižuje (Haboudane et al. 2002). Hodnota indexu REIP se se zvyšujícím množstvím chlorofylu v jehlicích zvyšuje (Guyot a Baret, 1988), stejně tak hodnota indexu Datt99 (Datt, 1999), Macc01 (Maccioni et al. 2001), NDVIre (Gitelson a Merzlyak, 1994), ROSAVI (Wu et al., 2008) a ZM (Zarco-Tejada et al., 2001). Výsledky všech vegetačních indexů, u kterých byl

prokázán statisticky významný rozdíl mezi sady (TCARI/OSAVI, Datt99, Macc01, NDVI_{Ire}, REIP, ROSAVI a ZM) ukazují na vyšší množství chlorofylu v semenném sadu Silov. Tyto výsledky podporují teorii, že i když stromy nebyly ani v jednom sadu stresované, reagují na menší dostupnost živin a vody v semenném sadu Doubrava změnou hodnoty vegetačních indexů vázaných na obsah chlorofylu. Protože vegetační indexy popisující stav vody v listu (WI a NDWI) se mezi sady nemění, můžeme předpokládat, že rozdíly mezi sady, na které stromy pomocí vegetačních indexů popisujících množství chlorofylu reagují, se týkají spíše rozdílného množství živin v půdách semenných sadů než v různé schopnosti zadržovat vodu půdou.

Fluorescenční parametr PI_{ABS} popisuje celkovou účinnost PSII od absorpce fotonu světlosběrnou anténou po redukci Q_B , a fluorescenční parametr PI_{TOTAL} popisuje celkovou účinnost pro celý elektrontransportní řetězec (až k PSI akceptorům elektronů) (Stirbet a Govindjee, 2011). To, že byly tyto parametry nižší v semenném sadu Doubrava, než v semenném sadu Silov, pravděpodobně ukazuje na nižší efektivitu primární fotosyntézy stromů v semenném sadu Doubrava než v semenném sadu Silov. Fluorescenční parametry M_0 , ABS/RC , TR_0/RC , ET_0/RC souvisí především se schopností PSII a jeho světlosběrných antén zachytit excitony a iniciovat počáteční přenos elektronů v reakčním centru PSII a parametry ϕ_{D0} , DI_0/RC souvisí se schopností zbavit se přebytečné excitační energie disipací ve formě tepla (Stirbet a Govindjee, 2011). Tyto dva parametry jsou v sadu Doubrava vyšší. Parametr γ_{RC} ukazuje pravděpodobnost, že molekula chlorofylu v PSII funguje jako reakční centrum (Stirbet a Govindjee, 2011). Tento parametr byl v sadu Doubrava nižší. Při spojení těchto informací dohromady můžeme říci, že stromy v sadu Doubrava mají pravděpodobně větší světlosběrné antény než stromy v semenném sadu Silov, ale mají méně funkčních reakčních center, a proto musí také více přijaté světelné energie disipovat ve formě tepla. Tyto informace opět nahrávají tvrzení, že mají stromy v semenném sadu Doubrava pravděpodobně méně efektivní fotosyntetický aparát.

V reakci na nedostatek živin v půdě (Cheng et al., 2000; Xue et al., 2013) a stresu suchem (Manes et al., 2001) se v předešlých pracích snižoval fluorescenční parametr F_V/F_M . Tento parametr (v experimentální části práce označen jako ϕ_{PO}) je nižší u semenného sadu Doubrava. Dalo by se tedy říci, že to je v reakci na nižší množství živin v půdě a na vyšší stres z nedostatku vody v sadu Doubrava. Přesto absolutní hodnoty parametru F_V/F_M (vyšší než 0,8) ukazují, že studované stromy nebyly stresované. Ve studii Manes et al. (2001) zaměřené na reakci borovice halepské (*Pinus halepensis*) na nedostatek vody, měly nestresované kontrolní rostliny hodnotu parametru F_V/F_M shodnou s hodnotami borovic u obou mnou studovaných sadů (okolo 0,8). U borovic stresovaných suchem v této studii klesla hodnota F_V/F_M téměř až

k 0,4. Stejně tak u jabloně (*Malus sylvestris* L.) se hodnota F_v/F_M pohybovala okolo 0,85 a až při velmi nízkých koncentracích dusíku v listech hodnota klesla pod 0,75 (Cheng et al., 2000). Přestože většina prací zabývajících se vlivem stresu na fluorescenci chlorofylu *a* využívá právě parametr F_v/F_M , při šlechtění borovic lesních bohužel vhodný není, protože se u něho neprokázala statisticky významná dědivost (Čepl et al., 2016).

Dalšími studovanými fluorescenčními parametry se ve spojení se stresem už tolik prací nezabývá. Parametr ET_0/RC a ABS/RC byl vyšší v semenném sadu Doubrava. U borovice halepské se při stresování suchem zvyšovala hodnota parametru ABS/RC a ET_0/RC (Manes et al., 2001). Díky tomu můžeme předpokládat, že i tyto fluorescenční parametry reagovaly na sníženou dostupnost živin a vody v půdě semenného sadu Doubrava. Parametr ET_0/RC se při stresování suchem se při výše zmíněné studii zvýšil z hodnoty 1,6 až na hodnotu 2,0 a parametr ABS/RC se při stresování suchem zvýšil z hodnoty 2,5 na hodnotu 5. Hodnota parametru ABS/RC byla naměřena v sadu Doubrava 2,4 a v sadu Silov 2,2, hodnota ET_0/RC byla naměřena v sadu Doubrava 1,04 a v sadu Silov 0,997. Tyto hodnoty naznačují, že i přes rozdíl hodnot parametrů mezi sady, stromy v semenných sadech Doubrava a Silov nebyly ve stresu (Manes et al., 2001).

U parametru TR_0/RC jsem bohužel nenalezla práci zabývající se stresem z nedostatku vody nebo minerálních živin. Při zimních teplotách se ovšem parametr TR_0/RC lehce sníží u borovice limba (*Pinus cembra*) a borovice kleč (*Pinus mugo*) (Lehner a Lutz, 2002). Parametr TR_0/RC se ukázal nižší v semenném sadu Silov. I přesto jsou hodnoty parametru TR_0/RC v obou sadech (1,8 pro sad Silov a 1,9 pro sad Doubrava) srovnatelné s kontrolami v jiných studiích a poukazují na nestresové podmínky. Například průměr hodnot pro parametr TR_0/RC pro borovici lesní ve studii Čepla et al. (2016) je 2,22.

Hodnoty fluorescenčních parametrů opět ukazují, že borovice nebyly ve stresu. Je to jednak v souladu s logikou zakládání semenných sadů (které by neměly být založeny na výrazně stresovaném místě) a zároveň to může být dané tím, že je borovice lesní odolný druh, který se dokáže přizpůsobit široké škále prostředí. V práci Pollastriny et al. (2013) studovali kompetici různých druhů stromů, břízy bělokoré (*Betula pendula*), olše lepkavé (*Alnus glutinosa*), smrku ztepilého (*Picea abies*), modřínu sibiřského (*Larix sibirica*) a borovice lesní (*Pinus sylvestris*), pomocí fluorescenčních parametrů (mezi nimi i F_v/F_M a PI_{TOTAL}). Borovice lesní měla mezi druhy stromů takové hodnoty fluorescenčních parametrů, které ukazovaly na nejvyšší schopnost kompetice.

5.3.3 *Výsledky druhého cíle*

Cílem této části práce bylo, porovnat variabilitu u stejného a různých genotypů v semenných sadech Doubrava a Silov.

To, že jsou genotypy borovice variabilní v reakci na určité stresové prostředí, bylo již prokázáno v několika studiích a využívá se pro výběr odolných jedinců proti danému stresu (například Xue et al., 2013; De Diego et al., 2015). Variabilitou fyziologických parametrů různých genotypů za podmínek, které nejsou pro rostliny stresové, se zatím moc prací nezabývalo (Čepl et al., 2016).

To, že byl u některých fyziologických parametrů prokázán nižší rozptyl u stejných genotypů, než u různých genotypů dokazuje, že v těchto parametrech existuje skutečně geneticky podmíněná variabilita mezi genotypy, která se projevuje i v podmínkách, které nejsou pro stromy stresové.

Zajímavý je fakt, že v semenném sadu Doubrava se statisticky významně lišil rozptyl mezi rozdílnými a stejnými genotypy u 24 sledovaných fyziologických parametrů, zatímco u semenného sadu Silov se statisticky významně lišil rozptyl mezi rozdílnými a stejnými genotypy pouze u 8 sledovaných fyziologických parametrů. Citlivější na tento jev se zdají být metody reflektance a fluorescence, u kterých byl větší rozdíl v prokázaných rozdílech rozptylů mezi Doubravou a Silovem, než u použitých biochemických metod. U fluorescenčních parametrů se dokonce v semenném sadu Doubrava statisticky významně lišil rozptyl mezi rozdílnými a stejnými genotypy u dvou třetin sledovaných fluorescenčních parametrů, na rozdíl od sadu Silov, kde se významně lišily rozptyly pouze u čtyř parametrů. Větší citlivost těchto metod může být dána důvodem probraným v diskusi prvního cíle práce.

To, že bylo v semenném sadu Doubrava zjištěno více rozdílů v rozptylu fyziologických parametrů mezi stejnými a různými genotypy, může mít několik vysvětlení. První možností je, že genotypy reagují odlišněji na prostředí v semenném sadu Doubrava, u kterého předpokládám nižší dostupnost vody a je chudší na živiny, a tím se více projevuje jejich individualita, než v prostředí semenného sadu Silov. Protože byl jako „stejný genotyp“ zastoupený více rametami zvolen jiný genotyp pro každý semenný sad, druhou možností může být individuální projev „stejného genotypu“. Tedy že „stejný genotyp“ vybraný pro sad Doubrava se chová více individualisticky než „stejný genotyp“ vybraný pro sad Silov. Tato druhá možnost je neméně zajímavá, neboť ukazuje, že se genotypy neliší pouze v hodnotách parametrů ale i mírou své individuality (kolik sledovaných parametrů má svůj specifický projev). Protože jsou obecně

rozptyly hodnot u stejných a různých genotypů vyšší v semenném sadu Silov, než v semenném sadu Doubrava, nejpravděpodobnější je poslední možnost, tedy že je tato situace dána v sadu Silov větší variabilitou podmínek, než v sadu Doubrava.

Větší variabilita podmínek v semenném sadu Silov může mít dvě příčiny. První je dána tím, že je semenný sad položen ve svahu, v jehož spodní části se nachází mrazová kotlina. Tato mrazová kotlina vytváří v sadu Silov gradient teploty (s nejnižší teplotou ve spodní části svahu), který například ovlivňuje fenologii kvetení (Kaňák, 2011). Při porovnání mezi všemi osmnácti stromy stejného genotypu nacházejícími se v rozsahu celého sadu Silov a šesti stromy stejného genotypu nacházejícího se pouze ve spodní části sadu, ovšem nebyl prokázán rozdíl mezi rozptyly fyziologických parametrů. Další možností může být větší variabilita v množství živin v půdě v rámci sadu Silov (tím, že je sad ve svahu, mohou být živiny splavovány do dolní části sadu). Rozptyly u naměřených hodnot množství živin se ovšem zdají být stejně velké nebo nižší v sadu Silov než v sadu Doubrava. Ani jedna z možností tedy nejde s jistotou prokázat.

V důsledku kompromisu v počtech vybraných genotypů (byly vybrány takové genotypy, aby byly mateřské stromům v testovacích výsadbách, na kterých se testovala dědivost fluorescenčních parametrů (Čepl et al., 2016)) se nevybral dostatečný počet ramet, aby se mezi sebou mohly porovnávat jednotlivé genotypy. Kdybych mohla porovnat hodnoty fyziologických parametrů u jednotlivých genotypů, mohla bych lépe určit, proč bylo v semenném sadu Doubrava zjištěno více rozdílů v rozptylu mezi stejnými a různými genotypy. Kdyby to bylo dáno předpokládanou nižší dostupností vody a živin v sadu Doubrava, měla by mít větší rozdíly v rozptylu mezi stejnými a různými genotypy v sadu Doubrava většina genotypů. Kdyby to bylo dáno individuální reakcí genotypu, při otestování stejných genotypů v obou sadech, by se tento jev neměl objevit. A pokud by to bylo dáno větší variabilitou podmínek v semenném sadu Silov měla by mít většina genotypů větší rozdíly v rozptylu mezi stejnými a různými genotypy v sadu Doubrava a zároveň větší rozptyly u stejných a různých genotypů v sadu Silov, než v sadu Doubrava.

5.4 Přínos práce

Velký význam má jednak šlechtění lesních dřevin pro lesnické parametry, které postihují a zvyšují kvalitu a výnosnost dřeva, ale i šlechtění pro parametry fyziologické, které monitorují rezistenci stromů proti biotickému a abiotickému stresu a které mají význam především v probíhajících klimatických změnách.

U šlechtění stromů došlo v poslední době k výraznému posunu, především díky novým metodám využívajícím molekulární genetiku a pokročilé statistické metody (Lstibůrek et al., 2015). Spojení těchto metod s metodami, které odhadují fyziologický stav stromu, je logický krok, který vede k lepšímu zmapování fenotypů stromů v semenných sadech a k přesnějšímu výběru elitních jedinců (Fioranni a Schur, 2013).

Tím, že byl prokázán u některých fyziologických parametrů rozdíl mezi stejnými a různými genotypy, se ukázalo, že mají stromy v těchto parametrech geneticky vázanou variabilitu. Variabilita v určitém fenotypovém znaku je základem pro to, aby mohly být stromy na daný znak selektovány, a je tedy základem šlechtění (Kaňák, 2011). Důležité je, že borovice ukázaly geneticky vázanou variabilitu u některých fyziologických parametrů za nestresových podmínek. Je známo, že genotypy rostlin projeví variabilitu v množství nespecifických indikátorů stresu za podmínek, které jsou pro ně stresové např. při výběru rezistentních odrůd pomocí navození suchých podmínek (De Diego et al., 2015) nebo vysokých teplot (Bala et al. 2015). Semenné sady se ovšem obvykle nacházejí v nestresových podmínkách, jak bylo dokázáno i zde u semenného sadu Doubrava a Silov. Proto je potřeba vybrat parametry, které jsou citlivé i na malé změny fyziologického stavu borovic a dokáží odhalit variabilitu ve znaku i za podmínek, které nejsou pro stromy stresové. Jako ideální se k těmto účelům jeví metody měření odrazivosti listu a fluorescence, které zachytily rozdíly ve složení půdy mezi semennými sady, na které metody biochemické analýzy nebyly citlivé. Téměř polovina vegetačních indexů a dvě třetiny fluorescenčních parametrů měly nižší rozptyl u stejných genotypů než u rozdílných, tím poukázaly na možnou variabilitu borovic v těchto parametrech, a tedy možnost šlechtění na tyto fenotypové znaky. Výhoda metod měření reflektance a fluorescence není pouze v jejich citlivosti, ale také v tom, že to jsou metody neinvazivní, časově nenáročné, obsáhnou mnoho informací o dané rostlině, ale také jdou použít ve větším měřítku v dálkovém průzkumu Země, jak měření odrazivosti (Ustin et al, 2009) tak i měření fluorescence (Zarco-Tejada et al., 2016). I když nebyly prokázány statisticky významné rozdíly mezi sady, velký rozdíl mezi rozptyly u stejných a různých genotypů mělo i množství fenolických látek v jehlicích a dále také množství prolinu, celulózy a poměr karotenoidů a chlorofylu. Tyto fyziologické parametry tedy považují za nejvhodnější z parametrů zjištěných biochemickou analýzou, použitelných při šlechtění.

Další důležitou vlastností fenotypového znaku, aby byl použitelný pro šlechtění, je kromě variability také dědivost. Aby byl daný fyziologický parametr použitelný při šlechtění, je tedy potřeba prokázat, jestli se daný parametr přenáší z rodiče na potomka. Pro většinu zde zkoumaných fluorescenčních parametrů byla zjištěna statisticky významná dědivost (Čepl et

al., 2016). Dalším cílem by mohlo být otestování dědivosti u vegetačních indexů a některých fyziologických parametrů zjištěných biochemicky, které ukázaly možnou variabilitu mezi genotypy (například množství fenolických látek). Zajímavé by také mohlo být porovnání fyziologických parametrů mezi genotypy a vybrání jedinců, kteří by mohli být více odolní proti určitému stresu.

6 Závěry

6.1 Cíl 1 a hypotéza 1:

Cíl 1: Porovnat fyziologické parametry u souboru jedinců se stejným genotypem ve dvou prostředích s různými půdními podmínkami v semenných sadech Doubrava a Silov.

U 7 z 13 zkoumaných vegetačních indexů a 10 z 21 zkoumaných fluorescenčních parametrů se projevila reakce na rozdílnou dostupnost živin mezi semennými sady Doubrava a Silov. Fyziologické parametry reagovaly na nižší dostupnost živin v semenném sadu Doubrava, což bylo v souladu s uskutečněným rozbořem půdy. Protože se semenné sady nenachází ve stresovém prostředí, fyziologické parametry měřené biochemickou analýzou nereagovaly na rozdíly mezi prostředími. Některé vegetační indexy a fluorescenční parametry na odlišné prostředí reagovaly, ukázaly se být tedy citlivějším indikátorem pro různé prostředí. Tento fakt je důležitý z toho hlediska, že šlechtění borovic lesních neprobíhá ve stresovém prostředí, a je tedy potřeba vybrat indikátor, který dokáže rozdělit jednotlivé stromy podle jejich zdatnosti a odolnosti proti stresu, aniž by byly výraznému stresu vystaveny. Protože metoda měření odrazivosti a fluorescence reaguje i na citlivé změny, které v jehlicích stromů probíhají, jsou na to tyto metody vhodnější než metody biochemické.

Hypotéza 1: U stromů v semenném sadu Doubrava se projeví změna sledovaných fyziologických parametrů reagující na nižší dostupnost živin (zejména dusíku a hořčíku) oproti stromům ze semenného sadu Silov.

Hypotézu 1 jsem potvrdila.

6.2 Cíl 2 a hypotéza 2:

Cíl 2: Porovnat, jak se liší míra variability fyziologických parametrů u různých genotypů stromů se stromy stejného genotypu v semenných sadech Doubrava a Silov.

U poměru karotenoidů a chlorofylu (Kar/Chl), množství fenolických látek, celulózy a prolinu v jehlicích, u 6 z 13 zkoumaných vegetačních indexů a 14 z 21 zkoumaných fluorescenčních parametrů jsem potvrdila, že mají nižší rozptyl hodnot u stromů stejných genotypů než u skupiny stromů různých genotypů. Tento fakt dokázal, že v těchto parametrech existuje geneticky podmíněná variabilita, která je základem pro šlechtění rostlin. Citlivější na rozdíl mezi rozptyly se opět ukázaly metody měření fluorescence a odrazivosti a opět tím ukazují, že jsou vhodnější pro šlechtění borovic v semenných sadech než metody biochemické analýzy. Zajímavé bylo zjištění, že genotypy v semenném sadu Silov mají větší rozptyl hodnot fyziologických parametrů než genotypy v semenném sadu Doubrava. Pravděpodobně je to tím, že genotypy v sadu Silov reagují prostředí, které je více variabilní než v sadu Doubrava. Tento jev dokazuje, jak důležité je do šlechtění zahrnout i interakce genotypů s prostředím.

Hypotéza 2: Stromy stejného genotypu budou mít na daném stanovišti nižší variabilitu ve sledovaných fyziologických parametrech než skupina stromů s různými genotypy.

Tuto hypotézu jsem také potvrdila.

7 Seznam literatury

- Ashraf, M., and Foolad, M.R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59, 206–216.
- Atwell, B.J., Henery, M.L., and Whitehead, D. (2003). Sapwood development in *Pinus radiata* trees grown for three years at ambient and elevated carbon dioxide partial pressures. *Tree Physiol.* 23, 13–21.
- Bala, S., Asthir, B., and Bains, N.S. (2016). Activities of cell wall peroxidases in relation to lignification in six wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under heat and drought stress. *Journal of Environmental Biology* 37, 437–442.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., and Teare, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39, 205–207.
- Bennett, R.N., and Wallsgrave, R.M. (1994). Tansley Review No. 72. Secondary Metabolites in Plant Defence Mechanisms. *The New Phytologist* 127, 617–633.
- Blackburn, G.A. (1998). Quantifying Chlorophylls and Carotenoids at Leaf and Canopy Scales: An Evaluation of Some Hyperspectral Approaches. *ResearchGate* 66, 273–285.
- Blodgett, J.T., and Stanosz, G.R. (1998). Monoterpene and Phenolic Compound Concentrations in Water-Stressed Red Pine Inoculated with *Sphaeropsis sapinea*. *Phytopathology* 88, 245–251.
- Blodgett, J.T., Herms, D.A., and Bonello, P. (2005). Effects of fertilization on red pine defense chemistry and resistance to *Sphaeropsis sapinea*. *Forest Ecology and Management* 208, 373–382.
- Boerjan, W., Ralph, J., and Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 54, 519–546.
- Cavender-Bares, J., Meireles, J.E., Couture, J.J., Kaproth, M.A., Kingdon, C.C., Singh, A., Serbin, S.P., Center, A., Zuniga, E., Pilz, G., et al. (2016a). Associations of Leaf Spectra with Genetic and Phylogenetic Variation in Oaks: Prospects for Remote Detection of Biodiversity. *Remote Sensing* 8, 221.
- Čepl, J., Holá, D., Stejskal, J., Korecký, J., Kočová, M., Lhotáková, Z., Tomášková, I., Palovská, M., Rothová, O., Whetten, R.W., et al. (2016). Genetic variability and heritability of chlorophyll a fluorescence parameters in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Tree Physiol.* 36, 883–895.
- Cheng, L., Fuchigami, L.H., and Breen, P.J. (2000). Light Absorption and Partitioning in Relation to Nitrogen Content in 'Fuji' Apple Leaves. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125, 581–587.
- Costanza, R., d'Arge, R., Groot, R. de, Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O'Neill, R.V., Paruelo, J., et al. (1997). The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387, 253–260.
- Critchfield, W.B., and Little, E.L., Jr., (1966). Geographic distribution of the pines of the world: U.S. Department of Agriculture Miscellaneous Publication 991, 1-97.

Curtiss, B., and Ustin, S.L. (1989). Parameters Affecting Reflectance Of Coniferous Forests In The Region Of Chlorophyll Pigment Absorption. In Geoscience and Remote Sensing Symposium, 1989. IGARSS'89. 12th Canadian Symposium on Remote Sensing., 1989 International, pp. 2633–2636.

Datt, B. (1999). Visible/near infrared reflectance and chlorophyll content in Eucalyptus leaves. *International Journal of Remote Sensing* 20, 2741–2759.

De Diego, N., Saiz-Fernández, I., Rodríguez, J.L., Pérez-Alfocea, P., Sampedro, M.C., Barrio, R.J., Lacuesta, M., and Moncaleán, P. (2015). Metabolites and hormones are involved in the intraspecific variability of drought hardening in radiata pine. *J. Plant Physiol.* 188, 64–71.

Deligoz, A., and Gur, M. (2015). Morphological, physiological and biochemical responses to drought stress of Stone pine (*Pinus pinea* L.) seedlings. *ResearchGate* 37.

Demmig-Adams, B., and Adams, W.W. (1996a). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1, 21–26.

Demmig-Adams, B., and Adams, W.W. (1996b). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1, 21–26.

Ditmarová, L., Kurjak, D., Palmroth, S., Kmet', J., and Střelcová, K. (2010). Physiological responses of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings to drought stress. *Tree Physiol* 30, 205–213.

Entry, J.A., Runion, G.B., Prior, S.A., Mitchell, R.J., and Rogers, H.H. Influence of CO₂ enrichment and nitrogen fertilization on tissue chemistry and carbon allocation in longleaf pine seedlings. *Plant and Soil* 200, 3–11.

Ernst, W.H.O., and Peterson, P.J. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (4). Terrestrial plants. *Ecotoxicology* 3, 180–192.

Escandón, M., Cañal, M.J., Pascual, J., Pinto, G., Correia, B., Amaral, J., and Meijón, M. (2016). Integrated physiological and hormonal profile of heat-induced thermotolerance in *Pinus radiata*. *Tree Physiol* tpv127.

Feild, T.S., Lee, D.W., and Holbrook, N.M. (2001). Why Leaves Turn Red in Autumn. The Role of Anthocyanins in Senescing Leaves of Red-Osier Dogwood. *Plant Physiol.* 127, 566–574.

Fiorani, F., and Schurr, U. (2013). Future Scenarios for Plant Phenotyping. *Annual Review of Plant Biology* 64, 267–291.

Franklin, E.G. (1970). Survey of mutant forms and inbreeding depression in species of the family Pinaceae. *Forest Service Research Paper* 61.

Gamon, J.A., Peñuelas, J., and Field, C.B. (1992). A narrow-waveband spectral index that tracks diurnal changes in photosynthetic efficiency. *Remote Sensing of Environment* 41, 35–44

- Gamon, J.A., Serrano, L., and Surfus, J.S (1997). The photochemical reflectance index: an optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types, and nutrient levels. *Oecologia* 112, 492–501.
- Gamon, J.A., and Surfus, J.S. (1999). Assessing leaf pigment content and activity with a reflectometer. *New Phytologist* 143, 105–117.
- Gao, B. (1996). NDWI—A normalized difference water index for remote sensing of vegetation liquid water from space. *Remote Sensing of Environment* 58, 257–266.
- Gao, D., Gao, Q., Xu, H.-Y., Ma, F., Zhao, C.-M., and Liu, J.-Q. (2009). Physiological responses to gradual drought stress in the diploid hybrid *Pinus densata* and its two parental species. *Trees* 23, 717.
- Gates, D.M., Keegan, H.J., Schleter, J.C., and Weidner, V.R. (1965). Spectral Properties of Plants. *Appl. Opt.*, AO 4, 11–20.
- Gitelson, A., and Merzlyak, M.N. (1994). Quantitative estimation of chlorophyll-a using reflectance spectra: Experiments with autumn chestnut and maple leaves. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 22, 247–252.
- Gitelson, A.A., Gritz †, Y., and Merzlyak, M.N. (2003). Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. *Journal of Plant Physiology* 160, 271–282.
- Gitelson, A.A., Keydan, G.P., and Merzlyak, M.N. (2006). Three-band model for noninvasive estimation of chlorophyll, carotenoids, and anthocyanin contents in higher plant leaves. *Geophys. Res. Lett.* 33, L11402.
- Glynn, C., Rönnerberg-Wästljung, A.-C., Julkunen-Tiitto, R., and Weih, M. (2004). Willow genotype, but not drought treatment, affects foliar phenolic concentrations and leaf-beetle resistance. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 113, 1–14.
- Guyot, G., Baret, F., (1988). Utilisation de la Haute Resolution Spectrale Pour Suivre l'état des Couverts Vegetaux. Proceedings, 4th international colloquium “spectral signatures of objects in remote sensing. ESA Publication, SP-287, Paris, 279–286.
- Häberle, K., Nunn, A.J., Reiter, I.M., Werner, H., Heller, W., Bahnweg, G., Gayler, S., Lütz, C., and Matyssek, R. (2009). Variation of defence-related metabolites in the foliage of adult beech and spruce: a conceptual approach to approximating traded-off carbon. *European Journal of Forest Research* 128, 99–108.
- Haboudane, D., Miller, J.R., Tremblay, N., Zarco-Tejada, P.J., and Dextraze, L. (2002). Integrated narrow-band vegetation indices for prediction of crop chlorophyll content for application to precision agriculture. *Remote Sensing of Environment* 81, 416–426.
- Havaux, M. (1995). Temperature Sensitivity of the Photochemical Function of Photosynthesis in Potato (*Solanum tuberosum*) and a Cultivated Andean Hybrid (*Solanum X juzepczukii*). *Journal of Plant Physiology* 146, 47–53.
- Hawkins, B.J., and Stoehr, M. (2009). Growth, phenology, and cold hardiness of 32 Douglas-fir full-sib families. *Can. J. For. Res.* 39, 1821–1834.

Hernández-Clemente, R., Navarro-Cerrillo, R.M., Suárez, L., Morales, F., and Zarco-Tejada, P.J. (2011). Assessing structural effects on PRI for stress detection in conifer forests. *ResearchGate* 115, 2360–2375.

Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., and Verma, D.P. (2000). Removal of feedback inhibition of delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol.* 122, 1129–1136.

Jain, N., Singh, G.P., Singh, P.K., Ramya, P., Krishna, H., Ramya, K.T., Todkar, L., Amasiddha, B., Kumar, K.C.P., Vijay, P., et al. (2014). Molecular approaches for wheat improvement under drought and heat stress. *ResearchGate* 74, 578.

Kaňák, K. (1982). Zhodnocení provenienčních ploch borovice lesní v ČSR. (Etapa 03 výzk. úkolu Šlechtění a introdukce lesních dřevin, dílčí úkol 01: Provenienční výzkum a šlechtění rodu *Pinus*.) - VÚLHM Jílovište - Strnady, 52 s.

Kaňák, J. (2008). Metodika zakládání semenných sadů: recenzovaná metodika. *Lesnický průvodce. Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti*, Strnady, 24 s.

Kaňák, J., Klapště, J., Lstibůrek, M. (2009). Úvodní genetické hodnocení semenných sadů borovice lesní v západních Čechách (Initial Evaluation of Seed Orchards of Scots Pine in the Western Czech Republic). *Zprávy lesnického výzkumu (Reports of Forestry Research)*, 189-204.

Kaňák, J. (2011). Návrh šlechtitelských postupů pro borovici lesní v západních a jižních Čechách. *Disertační práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta lesnická a dřevařská.* 148 s.

Kareolewki, P., and Giertych, M.J. (1995). Change in the level of phenols during needle development in Scots-pine populations in a control and polluted environment. *ResearchGate* 25, 297–306.

Kautsky, H. and Hirsch, A. (1931). Neue Versuche zur Kohlensäure assimilation, *Naturwissenschaften* 19, 964

Kilpeläinen, A., Peltola, H., Ryyppö, A., Sauvala, K., Laitinen, K., and Kellomäki, S. (2003). Wood properties of Scots pines (*Pinus sylvestris*) grown at elevated temperature and carbon dioxide concentration. *Tree Physiol.* 23, 889–897.

Kokaly, R.F., and Clark, R.N. (1999). Spectroscopic Determination of Leaf Biochemistry Using Band-Depth Analysis of Absorption Features and Stepwise Multiple Linear Regression. *Remote Sensing of Environment* 67, 267–287.

Korecký, J., (2012). Establishment of the second-generation seed orchards of Scots pine. Ph.D. Thesis. *Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta lesnická a dřevařská Katedra dendrologie a šlechtění lesních dřevin.* 128 s.

Kostiainen, K., Kaakinen, S., Saranpää, P., Sigurdsson, B.D., Linder, S., and Vapaavuori, E. (2004). Effect of elevated [CO₂] on stem wood properties of mature Norway spruce grown at different soil nutrient availability. *Global Change Biology* 10, 1526–1538.

- Lange, B.M., Lapierre, C., and Jr, H.S. (1995). Elicitor-Induced Spruce Stress Lignin (Structural Similarity to Early Developmental Lignins). *Plant Physiol.* 108, 1277–1287.
- Laracine-Pittet, C., and Lebreton, P. (1988). Flavonoid variability within *Pinus sylvestris*. *ResearchGate* 27, 2663–2666.
- LČR, (2016). Lesy České republiky. Oficiální webová stránka. Dostupné online: <<http://www.lesy-cr.cz>>.
- Lee, B.-R., Kim, K.-Y., Jung, W.-J., Avice, J.-C., Ourry, A., and Kim, T.-H. (2007). Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). *J. Exp. Bot.* 58, 1271–1279.
- Lehner, G., and Lütz, C. (2003). Photosynthetic functions of cembran pines and dwarf pines during winter at timberline as regulated by different temperatures, snowcover and light. *Journal of Plant Physiology* 160, 153–166.
- Lhotáková, Z. a Albrechtová, J. (2016). Nespecifické indikátory fyziologického stavu listoví: laboratorní biochemické analýzy. In: Albrechtová, J., Kupková, L. a Campbell, P. (eds.). Hodnocení stavu smrkových porostů. Případové studie sledování vývoje fyziologického stavu smrkových porostů v Krušných horách v letech 1998 – 2013. Nakladatelství České geografické společnosti, Praha, s. 146 – 164.
- Li, J., Ren, Z., and Zhou, Z. (2006). Ecosystem services and their values: a case study in the Qinba mountains of China. *Ecol Res* 21, 597–604.
- Li, Z.-H., Wang, Q., Ruan, X., Pan, C.-D., and Jiang, D.-A. (2010). Phenolics and plant allelopathy. *Molecules* 15, 8933–8952.
- Loader, N.J., Robertson, I., Barker, A.C., Switsur, V.R., and Waterhouse, J.S. (1997). An improved technique for the batch processing of small wholewood samples to α -cellulose. *Chemical Geology* 136, 313–317.
- Lstibůrek, M., Hodge, G.R., and Lachout, P. (2015). Uncovering genetic information from commercial forest plantations—making up for lost time using “Breeding without Breeding.” *Tree Genetics & Genomes* 11, 55.
- Maccioni, A., Agati, G., and Mazzinghi, P. (2001). New vegetation indices for remote measurement of chlorophylls based on leaf directional reflectance spectra. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 61, 52–61.
- Madritch, M.D., Kingdon, C.C., Singh, A., Mock, K.E., Lindroth, R.L., and Townsend, P.A. (2014). Imaging spectroscopy links aspen genotype with below-ground processes at landscape scales. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 369, 20130194.
- Manes, F., Donato, E., and Vitale, M. (2001). Physiological response of *Pinus halepensis* needles under ozone and water stress conditions. *Physiol Plant* 113, 249–257.
- Mapy.cz (2016) Mapová aplikace společnosti seznam.cz
- Marshall, J.D., Rehfeldt, G.E., and Monserud, R.A. (2001). Family differences in height growth and photosynthetic traits in three conifers. *Tree Physiol* 21, 727–734.

- Matero, J., and Saastamoinen, O. (2007). In search of marginal environmental valuations — ecosystem services in Finnish forest accounting. *Ecological Economics* 61, 101–114.
- Meggio, F., Zarco-Tejada, P.J., Núñez, L.C., Sepulcre-Cantó, G., González, M.R., and Martín, P. (2010). Grape quality assessment in vineyards affected by iron deficiency chlorosis using narrow-band physiological remote sensing indices. *Remote Sensing of Environment* 114, 1968–1986.
- Misra, A.N., and Singh, M.M. and R. (2012). Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology (InTech). In *Biophysics*. A. N. Misra, ed. (InTech), pp. 171 - 192
- Morin, X., Viner, D., and Chuine, I. (2008). Tree species range shifts at a continental scale: new predictive insights from a process-based model. *Journal of Ecology* 96, 784–794.
- Moura, J.C.M.S., Bonine, C.A.V., de Oliveira Fernandes Viana, J., Dornelas, M.C., and Mazzafera, P. (2010). Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *J Integr Plant Biol* 52, 360–376.
- Nemeskéri, E., Molnár, K., Vígh, R., Nagy, J., and Dobos, A. (2015). Relationships between stomatal behaviour, spectral traits and water use and productivity of green peas (*Pisum sativum* L.) in dry seasons. *Acta Physiol Plant* 37, 34.
- Ögren, E. (1990). Evaluation of Chlorophyll Fluorescence as a Probe for Drought Stress in Willow Leaves. *Plant Physiol.* 93, 1280–1285.
- Ollinger, S.V. (2011). Sources of variability in canopy reflectance and the convergent properties of plants. *New Phytologist* 189, 375–394.
- Pallardy, S.G. (2008). *Physiology of woody plants* (Burlington: Elsevier Academic Press).
- Palovská M., (2015). Analýza primárních fotosyntetických procesů u jehličnanů: srovnání vybraných metod a možné využití při studiu genetické variability. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Přírodovědecká fakulta. Katedra genetiky a mikrobiologie. 110 s.
- Pasqualini, V., Robles, C., Garzino, S., Greff, S., Bousquet-Melou, A., and Bonin, G. (2003). Phenolic compounds content in *Pinus halepensis* Mill. needles: a bioindicator of air pollution. *Chemosphere* 52, 239–248.
- Pavlová, L. (2005). *Fyziologie rostlin* (Praha: Karolinum).
- Penuelas, J., Pinol, J., Ogaya, R., and Filella, I. (1997). Estimation of plant water concentration by the reflectance Water Index WI (R900/R970). *International Journal of Remote Sensing* 18, 2869–2875.
- Pollastrini, M., Holland, V., Brüggemann, W., Koricheva, J., Jussila, I., Scherer-Lorenzen, M., Berger, S., and Bussotti, F. (2014). Interactions and competition processes among tree species in young experimental mixed forests, assessed with chlorophyll fluorescence and leaf morphology. *Plant Biol J* 16, 323–331.
- Pukacki, P.M., and Kamińska-Rożek, E. (2005). Effect of drought stress on chlorophyll a fluorescence and electrical admittance of shoots in Norway spruce seedlings. *Trees* 19, 539–544.

- Räisänen, T., Ryyppö, A., Julkunen-Tiitto, R., and Kellomäki, S. (2008). Effects of elevated CO₂ and temperature on secondary compounds in the needles of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Trees* 22, 121–135.
- Ranney, T.G., and Peet, M.M. (1994). Heat Tolerance of Five Taxa of Birch (*Betula*): Physiological Responses to Supraoptimal Leaf Temperatures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119, 243–248.
- van Rensburg, L., Krüger, G.H.J., Eggenberg, P., and Strasser, R.J. (1996). Can screening criteria for drought resistance in *Nicotiana tabacum* L. be derived from the polyphasic rise of the chlorophyll a fluorescence transient (OJIP)? *South African Journal of Botany* 62, 337–341.
- Richardson, A.D., and Berlyn, G.P. (2002). Changes in foliar spectral reflectance and chlorophyll fluorescence of four temperate species following branch cutting. *Tree Physiol* 22, 499–506.
- Richter, C.M., Kranig, S., and Wild, A. (1995). Contents of free amino acids in needles of Norway Spruce trees in relation to novel forest decline. Studies on trees from a site in the northern Black Forest. *Environ. Pollut.* 87, 303–312.
- Robinson, J. P. and Harris, S. A. (1999). Microsatellite markers as a tool for the detection of intra- and interpopulational genetic structure. in *Which DNA Marker for Which Purpose? Final Compendium of the Research Project Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union, Research Programme Molecular Tools for Biodiversity.*
- Rock, B.N., Hoshizaki, T., and Miller, J.R. (1988). Imaging Spectrometry Comparison of in situ and airborne spectral measurements of the blue shift associated with forest decline. *Remote Sensing of Environment* 24, 109–127.
- Salmela, M.J., Cavers, S., Cottrell, J.E., Iason, G.R., and Ennos, R.A. (2011). Seasonal patterns of photochemical capacity and spring phenology reveal genetic differentiation among native Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations in Scotland. *Forest Ecology and Management* 262, 1020–1029.
- Sanger, L.J., Cox, P., Splatt, P., Whelan, M.J., and Anderson, J.M. (1996). Variability in the quality of *Pinus sylvestris* needles and litter from sites with different soil characteristics: Lignin and phenylpropanoid signature. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 829–835.
- Schansker, G., Tóth, S.Z., and Strasser, R.J. (2005). Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1706, 250–261.
- Siefermann-Harms, D., Boxler-Baldoma, C., von Wilpert, K., and Heumann, H.-G. (2004). The rapid yellowing of spruce at a mountain site in the Central Black Forest (Germany). Combined effects of Mg deficiency and ozone on biochemical, physiological and structural properties of the chloroplasts. *Journal of Plant Physiology* 161, 423–437.
- Singleton, V.L., and Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic.* 16, 144–158.

- Slaton, M.R., Hunt, E.R., and Smith, W.K. (2001). Estimating near-infrared leaf reflectance from leaf structural characteristics. *Am. J. Bot.* 88, 278–284.
- Slavov, G. T., Howe, G. T. and Adams, W. T. (2005). Pollencontamination and mating patterns in a Douglas-fir seed orchard as measured by simple sequence repeat markers. *Canadian Journal of Forest Research - Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 35, 1592-1603.
- Sofronova, V.E., Dymova, O.V., Golovko, T.K., Chepalov, V.A., and Petrov, K.A. (2016). Adaptive changes in pigment complex of *Pinus sylvestris* needles upon cold acclimation. *Russ J Plant Physiol* 63, 433–442.
- Srivastava, A., Guissé, B., Greppin, H., and 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1320, 95–106.
- Stimson, H.C., Breshears, D.D., Ustin, S.L., and Kefauver, S.C. (2005). Spectral sensing of foliar water conditions in two co-occurring conifer species: *Pinus edulis* and *Juniperus monosperma*. *Remote Sensing of Environment* 96, 108–118.
- Stirbet, A., and Govindjee (2011). On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 104, 236–257.
- Strasser, R.J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M. (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In *Probing photosynthesis: Mechanism, regulation and adaptation*, Yunus, M., Pathre, U., Mohanty, P. eds., (London, Taylor and Francis), pp. 445–483.
- Su, Y., Zhang, Z., Su, G., Liu, J., Liu, C., and Shi, G. (2015). Genotypic Differences in Spectral and Photosynthetic Response of Peanut to Iron Deficiency. *Journal of Plant Nutrition* 38, 145–160.
- Svoboda, P., and Pokorný, J. (1953). *Lesní dřeviny a jejich porosty : skripta z dendrologie pro technický směr* (Praha Státní pedagogické nakladatelství, 1953).
- Trissl, H.-W., Gao, Y., and Wulf, K. (1993). Theoretical fluorescence induction curves derived from coupled differential equations describing the primary photochemistry of photosystem II by an exciton-radical pair equilibrium. *Biophys J* 64, 974–988.
- Turtola, S., Sallas, L., Holopainen, J.K., Julkunen-Tiitto, R., and Kainulainen, P. (2006). Long-term exposure to enhanced UV-B radiation has no significant effects on growth or secondary compounds of outdoor-grown Scots pine and Norway spruce seedlings. *Environmental Pollution* 144, 166–171.
- Ustin, S.L., Gitelson, A.A., Jacquemoud, S., Schaepman, M., Asner, G.P., Gamon, J.A., and Zarco-Tejada, P. (2009). Retrieval of foliar information about plant pigment systems from high resolution spectroscopy. *Remote Sensing of Environment* 113, Supplement 1, S67–S77.
- Vance, N.C., and Zaerr, J.B. (1991). Influence of drought stress and low irradiance on plant water relations and structural constituents in needles of *Pinus ponderosa* seedlings. *Tree Physiol.* 8, 175–184.

- Vincent, D., Lapiere, C., Pollet, B., Cornic, G., Negroni, L., and Zivy, M. (2005). Water deficits affect caffeate O-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation. *Plant Physiol.* 137, 949–960.
- Wainhouse, D., Ashburner, R., Ward, E., and Rose, J. (1998). The effect of variation in light and nitrogen on growth and defence in young Sitka Spruce. *Functional Ecology* 12, 561–572.
- Wellburn, A.R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology* 144, 307–313.
- White, T. L., Adams, W. T. and Neale, D. B. (2007). *ForestGenetics*, CAB International 681 p.
- Wild, A. a Schmitt, V. 1995. Diagnosis of damage to Norway spruce (*Picea abies*) through biochemical criteria. *Physiologia Plantarum*, 93, 375–382.
- Wu, C., Niu, Z., Tang, Q., and Huang, W. (2008). Estimating chlorophyll content from hyperspectral vegetation indices: Modeling and validation. *Agricultural and Forest Meteorology* 148, 1230–1241.
- Xia, S., Wang, X., Su, G., and Shi, G. (2015). Effects of drought on cadmium accumulation in peanuts grown in a contaminated calcareous soil. *Environ Sci Pollut Res* 22, 18707–18717.
- Xue, J., Clinton, P.W., Davis, M.R., Siddiqui, T., Beets, P.N., and Leckie, A.C. (2013). Genotypic variation in foliar nutrient concentrations, $\delta^{13}\text{C}$, and chlorophyll fluorescence in relation to tree growth of radiata pine clones in a serpentine soil. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 176, 724–733.
- Zane, L., Bargelloni, L. and Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation a review *Molecular Ecology* 11, 1-16.
- Zarco-Tejada, P.J., Miller, J.R., Noland, T.L., Mohammed, G.H., and Sampson, P.H. (2001). Scaling-up and model inversion methods with narrowband optical indices for chlorophyll content estimation in closed forest canopies with hyperspectral data. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing* 39, 1491–1507.
- Zarco-Tejada, P.J., González-Dugo, M.V., and Fereres, E. (2016). Seasonal stability of chlorophyll fluorescence quantified from airborne hyperspectral imagery as an indicator of net photosynthesis in the context of precision agriculture. *Remote Sensing of Environment* 179, 89–103.
- Zygielbaum, A., Gitelson, A., Arkebauer, T., and Rundquist, D. (2009). Non-Destructive Detection of Water Stress and Estimation of Relative Water Content in Maize. *Papers in Natural Resources*.