

UTJECAJ SUŠE NA KONCENTRACIJU FOTOSINTETSKIH PIGMENATA U LIŠĆU OBIČNE BUKVE I HRASTA KITNJAKA TE POVRATNU KALIBRACIJU KLOROFILMETRA MC-100

IMPACT OF DROUGHT ON PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS IN LEAVES OF COMMON BEECH AND SESSILE OAK, AS WELL AS ON RETURN CALIBRATION OF CHLOROPHYLL METER MC-100

Krunoslav SEVER^{1*}, Filip MILAKOVIĆ², Antonia VUKMIROVIĆ¹

SAŽETAK

Ciljevi ovoga rada bili su ispitati utjecaj vrste i suše na koncentraciju fotosintetskih pigmenata (klorofila i karotenoida) i njihove recipročne omjere u lišću obične bukve i hrasta kitnjaka te utjecaj suše na preciznost nedestruktivne procjene koncentracije ukupnih klorofila u lišću spomenutih vrsta pomoću prijenosnog optičkog klorofilmetra MC-100. Istraživanje je provedeno na prirodnom pomlatku obične bukve i hrasta kitnjaka koji je tijekom vegetacijskoga razdoblja 2022. godine bio uredno zalijevan, dok je tijekom vegetacijskoga razdoblja 2023. godine bio izložen suši. S tako tretiranog pomlatka tijekom obiju godina uzorkovano je lišće kojemu je izmjeren klorofilni indeks pomoću prethodno spomenutog klorofilmetra (*in situ*). Nakon toga, uzorkovano lišće bilo je podvrgnuto daljnjim laboratorijskim analizama s ciljem utvrđivanja njegovih morfoloških značajki i koncentracije fotosintetskih pigmenata (klorofila *a*, klorofila *b*, ukupnih klorofila *a+b* i karotenoida). Budući da se obična bukva odlikuje mezofilnijim, a hrast kitnjak kserofilnijim fiziološko-morfološkim svojstvima, može se hipotetski pretpostaviti da će suša imati negativniji utjecaj na koncentracije fotosintetskih pigmenata u lišću obične bukve nego u lišću hrasta kitnjaka. Prema rezultatima faktorske ANOVA-e u kombinaciji s rezultatima deskriptivne statistike suša je izazvala opadanje koncentracije klorofila i porast koncentracije karotenoida u lišću obiju vrsta. Međutim, tijekom sušne 2023. godine porast koncentracije karotenoida bio je značajno veći u lišću obične bukve nego u lišću hrasta kitnjaka, dok su koncentracije klorofila i recipročni omjeri koncentracije klorofila i karotenoida bili podjednaki u lišću obiju vrsta. Takav rezultat ukazuje da bi efikasnija produkcija karotenoida tijekom sušnoga razdoblja mogla pomoći običnoj bukvi u ublažavanju fotooksidacijskih oštećenja kloroplasta i/ili značajnijem opadanju koncentracije klorofila. U skladu s tim, može se pretpostaviti da obična bukva zahvaljujući efikasnijoj produkciji karotenoida tijekom sušnoga razdoblja održava svoju konkurentnost prema suši tolerantnijem hrastu kitnjaku. Rezultati ANCOVA-e u kombinaciji s rezultatima regresijske analize otkrivaju da godina odnosno suša nije imala značajan utjecaj na parametre kalibracijskih jednadžbi koje opisuju odnos između klorofilnog indeksa i koncentracije ukupnih klorofila u lišću obične bukve i hrasta kitnjaka. To znači da je klorofilmetar MC-100 uz primjenu odgovarajućih kalibracijskih jednadžbi pouzdan alat za procjenu koncentracije ukupnih klorofila u lišću obične bukve i hrasta kitnjaka, neovisno o utjecaju suše.

KLJUČNE RIJEČI: klorofilmetar, klorofilni indeks, klorofili, karotenoidi, *Fagus sylvatica*, *Quercus petraea*

¹ Prof. dr. sc. Krunoslav Sever, Antonia Vukmirović, mag. ing. silv., Sveučilište u Zagrebu Fakultet šumarstva i drvne tehnologije, Zagreb

² Filip Milaković, univ. bacc. ing. silv., Petrinja

* dopisni autor: Krunoslav Sever, e-mail: ksever@sumfak.unizg.hr

UVOD

INTRODUCTION

Dugotrajna sušna razdoblja kao sastavna komponenta sveprisutnih klimatskih promjena kod šumskoga drveća izazivaju sušni stres, što se na području Europe pa tako i Republike Hrvatske u posljednje vrijeme događa sve češće (Bréda i dr. 2006, Buras i dr. 2020, Senf i dr. 2020, IPCC 2023). Takvi događaji narušavaju vitalnost šumskoga drveća, što se prepoznaje po opadanju koncentracije fotosintetskih pigmenata u lišću i gubitku zelene boje lišća (Thomas i dr. 2024). Najvažniji fotosintetski pigmenti u biljnom svijetu su klorofili (*a* i *b*) i karotenoidi koji upijaju svjetlost i određuju efikasnost fotosinteze te na taj način snažno utječu na sveukupan rast i razvoj šumskoga drveća (Lichtenthaler 1987, Mafakheri i dr. 2010, Croft i dr. 2017, Hu i dr. 2023). Fotosintetski pigmenti koji su smješteni na tilakoidnim membranama kloroplasta zajednički grade fotosustave I i II. Unutar tih fotosustava klorofil *a* primarno je zadužen za predaju svojih pobuđenih elektrona primarnom akceptoru elektrona, dok je klorofil *b* pomoćni pigment koji primarno služi kao antena za hvatanje svjetlosti i prijenos vlastite energije na klorofil *a*. Primarna uloga karotenoida ogleda se u preuzimanju viška energije nastale unutar fotosustava, kada klorofil *a* svoje pobuđene elektrone ne uspije predati primarnom akceptoru elektrona, tj. pretvorbi te suvišne energije u toplinu, što rezultira sprječavanjem i/ili ublažavanjem fotooksidacijskih oštećenja cjelokupnog fotosintetskog aparata (Palett i Young 1993, Biswall 1995, Taiz i Zeiger 2006).

Obična bukva (*Fagus sylvatica* L.) i hrast kitnjak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) predstavljaju dvije konkurentne vrste šumskoga drveća koje često pridolaze na istim staništima gdje tvore mješovite sastojine koje se odlikuju velikom ekološkom, ekonomskom i socijalnom vrijednošću (Vukelić 2012). Bez obzira na to što često dijele stanište, ekofiziološka i/ili fiziološko-morfološka svojstva obične bukve i hrasta kitnjaka prilično su različita. Obična bukva odlikuje se mezofilnijim fiziološko-morfološkim svojstvima i osjetljivija je na sušu, dok se hrast kitnjak odlikuje kserofilnijim fiziološko-morfološkim svojstvima i tolerantniji je na sušu (Aranda i dr. 2000, Backes i Leuschner 2000, Arend i dr. 2013, Pretzsch i dr. 2013, Sánchez-Gómez i dr. 2013, Meyer i dr. 2020). Povišenu razinu tolerantnosti biljaka na sušu obično prati njihova povišena sposobnost zaštite i popravka fotosintetskog aparata od fotooksidacijskih oštećenja, što je kod vrsta iz roda *Quercus* prilično dobro izraženo (Thomas i Gausling 2000, Arend i dr. 2013). U skladu s tim, pod utjecajem sušnoga stresa, vrste i/ili njihovi genotipovi koji su tolerantniji na sušu uspijevaju koncentraciju

svojih fotosintetskih pigmenata u lišću održati višom u odnosu na one koji su manje tolerantni na sušu (Lauteri i dr. 1997, Pšidová i dr. 2013, Li i dr. 2018a, Thomas i dr. 2024). Prema tome, može se hipotetski pretpostaviti da bi dugotrajna suša mogla imati negativniji utjecaj na koncentracije fotosintetskih pigmenata u lišću obične bukve nego hrasta kitnjaka.

Nagle promjene u koncentraciji fotosintetskih pigmenata i/ili njihovih recipročnih odnosa u lišću šumskoga drveća predstavljaju prve simptome prisutnosti biotskog i/ili abiotskog stresa (Bacci i dr. 1998, Percival i dr. 2008). U skladu s tim, redovitim sezonskim praćenjem koncentracije klorofila u lišću šumskoga drveća može se kontrolirati njegova vitalnost (Li i dr. 2018b). To ima poseban značaj u kontekstu kontroliranja vitalnosti i kvalitete sadnica tijekom njihove proizvodnje u šumskim rasadnicima, što podrazumijeva raznovrsne tretmane (fertilizacija, navodnjavanje, zaštita od patogena i sl.) te kontrolu utjecaja primijenjenih tretmana na kvalitetu proizvedenih sadnica s ciljem financijske i organizacijske optimizacije proizvodnoga procesa (Bonnevillie i Fyles 2006, Seletković 2006, Perić i dr. 2009, Schmal 2011). Međutim, tradicionalne laboratorijske metode za utvrđivanje koncentracije klorofila predstavljaju svojevrsnu prepreku u provođenju kontinuiranog monitoringa sezonske dinamike klorofila u lišću šumskoga drveća, prvenstveno zbog svoje visoke cijene, dugotrajnosti analiza i destrukcije biljaka prilikom sakupljanja uzoraka (van den Berg i Perkins 2004). Iz tog razloga, u posljednje vrijeme na tržištu se pojavljuje sve veći broj prijenosnih optičkih klorofilmetara različitih proizvođača, kao što su CCM-200 (Opti Sciences, Tyngsboro, Massachusetts, USA), SPAD-502 (Minolta Camera Co., Osaka, Japan) i MC-100 (Apogee Instruments, Utah, USA) pomoću kojih je moguće na relativno jednostavan, brz, jeftin i nedestruktivan način izmjeriti koncentraciju klorofila u lišću istraživane vrste (Cate i Perkins 2003, van den Berg i Perkins 2004, Jifon i dr. 2005, Percival i dr. 2008, Silla i dr. 2010, Filimon i dr. 2014, Sever i dr. 2018, Brown i dr. 2022).

Precizna izmjera koncentracije klorofila u lišću jednogodišnjih poljoprivrednih usjeva, višegodišnjih poljoprivrednih nasada i šumskog drveća pomoću klorofilmetra zahtijeva njegovu povratnu kalibraciju. To podrazumijeva paralelnu izmjeru indeksa relativnog sadržaja klorofila (klorofilnog indeksa) pomoću klorofilmetra i stvarne koncentracije klorofila u istom tom lišću, koja je utvrđena laboratorijski. Nakon toga se pomoću odgovarajućih regresijskih modela ispituje odnos između nezavisne (klorofilnog indeksa) i zavisne (stvarne koncentracije klorofila) varijable (Li i dr. 2017). U slučaju prihvatljivog rezultata koji u prvom redu podrazumijeva

značajan odnos zavisne i nezavisne varijable te zadovoljavajući koeficijent determinacije, povratnu kalibraciju klorofilmetra za istraživanu vrstu možemo smatrati uspješnom (Brown i dr. 2022).

Međutim, ponekad se događa da klorofilmetar očitava previsoke ili preniske vrijednosti klorofilnog indeksa u odnosu na stvarnu koncentraciju klorofila u lišću (Richardson i dr. 2002, Mahajan i Pal 2016). Do toga dolazi prilikom izmjere klorofilnog indeksa u lišću koje se odlikuje različitim strukturnim značajkama (gustoćom i debljinom lisnoga parenhima te sadržajem vode), što utječe na njegove optičke značajke, tj. omjer propuštene crvene i infracrvene svjetlosti kroz plojku, na temelju čega se izračunava klorofilni indeks. Šumsko drveće odlikuje se velikom varijabilnošću strukturnih značajki lišća, što najčešće ovisi o genotipu i starosti lišća, ali i cijelom nizu okolišnih čimbenika, uključujući sušu (Gallé i Feller 2007, García-Plazaola i dr. 2008, Esteban i dr. 2015). Međusezonska varijabilnost okolišnih čimbenika u prirodi je vrlo učestala i gotovo normalna pojava koju prati promjena strukturnih i/ili optičkih značajki lišća, a koje kod šumskoga drveća od godine do godine mogu značajno varirati (Meskini-Vishkaee i dr. 2015, Sever i dr. 2016). Prema tome, može se pretpostaviti da bi parametri kalibracijskih jednadžbi (odsječci na osi Y i nagibi pravaca) konstruiranih tijekom vlažne i sušne godine mogli biti nehomogeni. To bi značilo da se u sušnoj godini pomoću klorofilmetra ne može obaviti precizna i pouzdana izmjera stvarne koncentracije klorofila u lišću šumskoga drveća ako je kalibracijska jednadžba konstruirana tijekom vlažne godine i obrnuto.

S obzirom na prethodno navedeno, ciljevi ovoga istraživanja bili su ispitati (i) utjecaj vrste i suše na koncentraciju fotosintetskih pigmenata i njihove recipročne omjere u lišću obične bukve i hrasta kitnjaka te (ii) utjecaj suše na homogenost parametara (odsječaka na osi Y i nagiba pravaca) kalibracijskih jednadžbi konstruiranih na temelju klorofilnog indeksa izmjerena pomoću klorofilmetra MC-100 i laboratorijski utvrđene koncentracije ukupnih klorofila u lišću obične bukve i hrasta kitnjaka.

MATERIJALI I METODE

MATERIALS AND METHODS

Biljni materijal i područje istraživanja – *Plant material and study site*

Istraživanje je provedeno tijekom 2022. i 2023. godine na pomlatku obične bukve i hrasta kitnjaka uzgajanom u Šumskom vrtu Fakulteta šumarstva i drvne tehnologije. Istraživani pomladak porijeklom je iz dviju prirodnih mješovitih sastojina hrasta kitnjaka i obične bukve s područja Karlovca i Slavonskog Broda (Sever i dr. 2022). U proljeće 2021. godine pomladak je iz spomenutih sastojina presađen u drveni sanduk dimenzija 155 × 275 × 80 cm, koji je bio ispunjen s 3800 litara Klasman TS3 supstrata za uzgoj biljaka, nakon čega se do proljeća 2022. godine aklimatizirao na stanišne prilike područja istraživanja. U proljeće 2022. i 2023. godine drveni sanduk s pomlatkom bio je natkriven prozirnim PVC pokrovom radi sprječavanja njegova natapanja s



Kolovoz 2022. godine



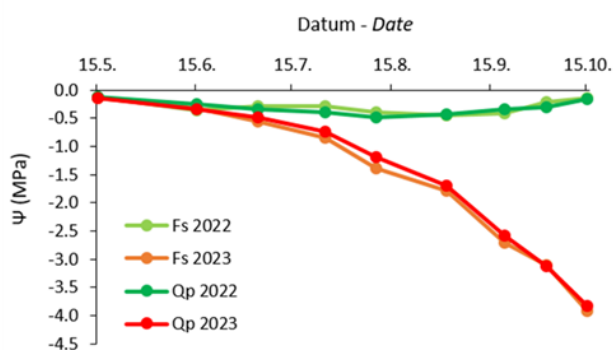
Kolovoz 2023. godine

Slika 1. Fenotipski izgled istraživanih pomlatka početkom kolovoza 2022. i 2023. godine.
Figure 1 Phenotypic appearance of the investigated saplings at the beginning of August 2022 and 2023.

prirodnim oborinama tijekom samog istraživanja. U jesen 2022. godine PVC pokrov bio je uklonjen s ciljem izlaganja istraživanih pomlatka prirodnim oborinama tijekom kasne jeseni i zime između vegetacijskih razdoblja 2022. i 2023. godine. U drveni sanduk presađeno je ukupno 100 biljaka u međusobnom razmaku 20×18 cm, od toga 50 biljaka obične bukve i 50 biljaka hrasta kitnjaka (Slika 1). U proljeće 2022. godine neposredno prije početka istraživanja prosječna visina bukova pomlatka iznosila je $46,25 \pm 16,81$ cm, a kitnjakova $49,66 \pm 21,88$ cm.

Dizajn pokusa i izmjera vodnoga potencijala u lišću – *Experimental design and measurement of water potential in leaves*

Istraživanje je započelo početkom vegetacijskog razdoblja 2022. godine tijekom kojega je istraživani pomladak svaka četiri dana bio uredno zalijevan s 40 litara vode. Tijekom 2022. godine vodni potencijal u lišću istraživanih pomlatka nije pao ispod $-0,5$ MPa (Slika 2), što sugerira da pomladak tada nije bio izložen sušnom stresu te je rastao u normalnim okolišnim uvjetima. U sljedećem vegetacijskom razdoblju, 2023. godine, istraživani pomladak više nije bio zalijevan. To je rezultiralo kontinuiranim opadanjem vodnoga potencijala u njegovu lišću koji je kod obje vrste početkom srpnja opao ispod $-0,5$ MPa, a do kraja vegetacijskoga razdoblja ispod $-3,8$ MPa (Slika 2), što kod obične bukve i hrasta kitnjaka ukazuje na snažan sušni stres (Epron i Dreyer 1993, Arend i dr. 2016). Vodni potencijal u lišću istraživanih pomlatka mjereno je svakih 15 dana tijekom oba vegetacijska razdoblja, što se obavljalo pred zorom, na jednom listu po biljci, pomoću prijenosne tlačne komore (PMS Instrument Company, Oregon, USA).

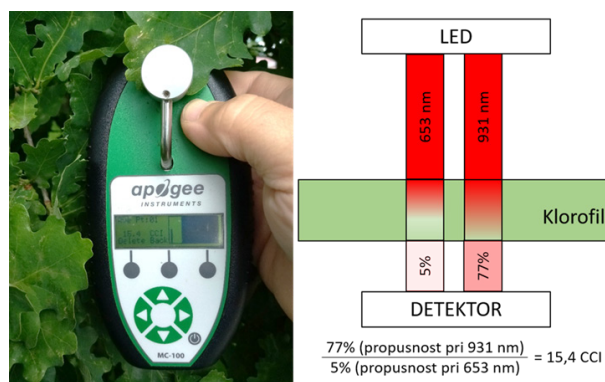


Slika 2. Sezonski trend srednjih vrijednosti vodnoga potencijala (Ψ) u lišću obične bukve (Fs) i hrasta kitnjaka (Qp) tijekom vlažne 2022. i sušne 2023. godine.

Figure 2 Seasonal pattern of the mean values of leaf water potential (Ψ) in common beech (Fs) and sessile oak (Qp) leaves during the wet year 2022 and dry year 2023.

Izmjera klorofilnog indeksa pomoću klorofilmetra MC-100 – *Measurement of the chlorophyll index using a chlorophyll meter MC-100*

U ovom istraživanju korišten je klorofilmetar MC-100 (Apogee Instruments, Utah, USA) koji za određivanje relativnog sadržaja klorofila u lišću koristi prirodno ograničenje molekula klorofila koje ne mogu u jednoj mjeri apsorbirati svjetlost različitih valnih duljina. S obzirom na to, klorofilmetar MC-100 pomoću svjetlosnih LED dioda na gornju stranu plojke lista emitira svjetlost dviju valnih duljina (jedne od 653 nm, a druge od 931 nm), a na donjoj strani plojke pomoću uparenih detektora očitava količinu propuštene svjetlosti objiju valnih duljina. Budući da je valna duljina od 653 nm fotosintetski aktivna, klorofil ju uglavnom apsorbira i slabije se propušta kroz list. Valna duljina svjetlosti od 931 nm odgovara infracrvenom dijelu sunčeva spektra koji nije fotosintetski aktivan, a služi kao referentna mjera kompenzacije razlika strukturnih značajki lista te se u većoj mjeri propušta kroz list. Na temelju omjera propuštene infracrvene i crvene svjetlosti (% propusnosti pri 931 nm / % propusnosti pri 653 nm) klorofilmetar automatski računa i na ekranu prikazuje relativni indeks sadržaja klorofila u listu (CCI – engl. *chlorophyll content index*). Budući da svjetlost emitiraju LED diode, lisno tkivo i fotosintetski pigmenti prilikom mjerenja ostaju neoštećeni. Područje mjerenja je kružnog oblika, promjera 9,0 mm i površine 63,6 mm² (Apogee Instruments-Owner's manual 2022). Na slici 3 prikazani su klorofilmetar MC-100 i osnovni princip njegova rada.



Slika 3. Klorofilmetar MC-100 i shematski prikaz principa njegova rada. Figure 3 Chlorophyll meter MC-100 and schematic principle of its operation.

Uzorkovanje i izmjera morfoloških značajki lišća – *Sampling and measurement of morphological leaf traits*

Uzorkovanje lišća podrazumijevalo je izmjeru klorofilnoga indeksa u lišću (CCI) pomoću prethodno opisanog klorofilmetra (*in situ*) i njegovo sakupljanje za potrebe daljnjih laboratorijskih analiza. To je tijekom 2022. godine obavljeno u tri navrata (20. lipnja, 16. kolovoza i 12. listopada), a tijekom 2023. godine u četiri navrata (31. svibnja, 6. srpnja, 10. kolovoza i 9. listopada). U svakom



Slika 4. Raspon boja uzorkovanoga lišća obične bukve i hrasta kitnjaka od svjetlije zelene koja ukazuje na nižu koncentraciju klorofila do tamnije zelene koja ukazuje na višu koncentraciju klorofila u lišću.

Figure 4 Colour range of common beech and sessile oak sampled leaves from lighter green, which indicates a lower concentration of chlorophyll, to darker green, which indicates a higher concentration of chlorophyll in the leaves.

navratu uzorkovanja nasumično je odabrano po 10 biljaka obične bukve i 10 biljaka hrasta kitnjaka neovisno o porijeklu i stupnju zasjenjenosti njihova lišća od strane susjednih biljaka. Jedini uvjet prilikom uzorkovanja bio je da boja lišća odabranih biljaka varira u rasponu od svjetlije do tamnije zelene (Slika 4). Sa svake od tih biljaka uzorkovan je po jedan list na kojemu je odmah izmjereno 7 vrijednosti CCI-a čiji je prosjek predstavljao CCI uzorkovanoga lista. Prema tome, s bukova, odnosno kitnjakova pomlatka tijekom 2022. godine uzorkovano je ukupno 30 listova, a tijekom 2023. godine 40 listova. Nakon izmjere CCI-a lišće je smješteno u prijenosni hladnjak na temperaturu zraka od 4 °C sve do dolaska u laboratorij, gdje je tijekom naredna 24 sata rehidratizirano. Nakon toga, svakom je listu utvrđena masa svježeg tvari (SvT) pomoću analitičke vage s točnošću od 0,01 g, a pomoću programskog paketa WinFOLIA 2005b (WinFolia™ 2001) izmjerena mu je i površina (A). Na temelju podataka o masi svježeg tvari i površine lišća, za svaki je list izračunata specifična lisna masa (SLM), što predstavlja međusobni odnos mase svježeg tvari i površine lista (g/cm²).

Laboratorijsko određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata u lišću i konstrukcija kalibracijskih jednadžbi – Laboratory determination of the concentration of photosynthetic pigments in leaves and the construction of calibration equations

Koncentracija ukupnih klorofila i karotenoida utvrđena je u svakom uzorkovanom listu pojedinačno (svaki list predstavljao je zasebni uzorak). Usitnjeno lišće homogenizirano je tekućim dušikom u tarioniku. S 0,1 g tako pripremljenog praha ispunjene su prethodno pripremljene Eppendorf kivete zapremnine 0,2 ml uz dodatak hladnog acetona (80 %). Tkivo je nakon toga ekstrahi-

rano 15 minuta u hladnjaku, nakon čega je centrifugirano na 1000 okretaja u 10 minuta. Supernatant je dekantiran u plastične epruvete, a kruti ostatak zelene boje reekstrahirano je s acetonom sve dok tkivo nije izgubilo zelenu boju. Nakon toga, pomoću menzure izmjeren je volumen svakog uzorka. Tako pripremljeni uzorci korišteni su za spektrofotometrijsko mjerenje na UV/VIS spektrofotometru (Specord 40, Analytic Jena) pomoću kojeg je izmjerena apsorbancija uzoraka na valnim duljinama od 661,6 nm, 664,8 nm i 470 nm. Na temelju poznate lisne mase (m), volumena (V) i apsorbancije (A) pri određenoj valnoj duljini izračunate su koncentracije fotosintetskih pigmenata u svakom uzorku pomoću sljedećih formula (Lichtenthaler 1987):

$$\text{Klor } a = (11.24 \times A(661.6\text{nm}) - 2.04 \times A(644.8\text{nm})) \times V / (m \times 1000)$$

$$\text{Klor } b = (20.13 \times A(644.8\text{nm}) - 4.19 \times A(661.6\text{nm})) \times V / (m \times 1000)$$

$$\text{Klor } a+b = (7.05 \times A(661.6\text{nm}) + 18.09 \times A(644.8\text{nm})) \times V / (m \times 1000)$$

$$\text{Kar} = (1000 \times A(470\text{nm}) - 1.90 \times (11.24 \times A(661.6\text{nm}) - 2.04 \times A(644.8\text{nm})) - 63.14 \times (20.13 \times A(644.8\text{nm}) - 4.19 \times A(661.6\text{nm}))) \times V / (214 \times m \times 1000)$$

Izmjerene vrijednosti fotosintetskih pigmenata (Klor *a*, Klor *b*, Klor *a+b*, Kar) iskazane su u mg/g svježeg tvari uzorka (SvT).

Nakon laboratorijskog utvrđivanja koncentracije ukupnih klorofila u uzorkovanom lišću konstruirane su po dvije kalibracijske jednadžbe (linearne regresijske jednadžbe) za svaku vrstu, koje opisuju odnos između izmjerenoga CCI-a (*in situ*) i stvarne laboratorijski utvrđene koncentracije ukupnih klorofila u lišću, tijekom vlažne 2022. i sušne 2023. godine.

Statistička analiza – Statistical analysis

Faktorska ANOVA provedena je s ciljem ispitivanja utjecaja vrste (obična bukva u odnosu na hrast kitnjak), suše (vlažna 2022. u odnosu na sušnu 2023. godina) i njihove interakcije na izmjerene vrijednosti morfoloških značajki lišća (SvT, A, SLM), koncentraciju fotosintetskih pigmenata (Klor *a*, Klor *b*, Klor *a+b*, Kar) i njihove međusobne omjere (Klor *a/b* i Klor/Kar) te *in situ* izmjereni klorofilni indeks (CCI). Tukeyjev post-hoc test proveden je s ciljem utvrđivanja značajnih razlika ($p < 0,05$) između vrsta i/ili godina. Regresijska analiza provedena je pomoću REG procedure u SAS/STAT 9,3 softverskom paketu (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) za svaku vrstu unutar godine posebno. Linearne regresijske jednadžbe konstruirane su na način da je CCI predstavljao nezavisnu varijablu, a koncentracija ukupnih klorofila (Klor *a+b*) zavisnu varijablu. Analiza kovarijance (ANCOVA) provedena je pomoću JMP 9,0 softverskog paketa (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), uključujući analizu interakcije s ciljem ispitivanja homogenosti odsječaka na osi Y i nagiba pravaca linearnih regresijskih jednadžbi konstruiranih na temelju lišća uzorkovanoga tijekom vlažne 2022. i sušne 2023. godine, za svaku vrstu posebno.

REZULTATI

RESULTS

Utjecaj vrste i suše na strukturne značajke lišća, fotosintetske pigmente i klorofilni indeks – Effect of species and drought on structural leaf traits, photosynthetic pigments and chlorophyll index

Na masu svježe tvari, površinu i specifičnu masu lišća značajno je utjecala samo vrsta (Tablica 1). To znači da je lišće obične bukve imalo značajno manju masu svježe tvari, površinu i specifičnu masu nego lišće hrasta kitnjaka, kako tijekom vlažne 2022. tako i tijekom sušne 2023. godine (Slika 5a – c).

Na koncentracije klorofila *a*, klorofila *b*, ukupnih klorofila *a+b* te omjer koncentracije klorofila *a/b* značajno je utjecala samo godina (Tablica 1). To znači da su koncentracije klorofila *a* i *b* te ukupnih klorofila *a+b*, kao i omjer koncentracije klorofila *a/b* kod obiju vrsta bili podjednaki, ali značajno niži u sušnoj 2023. nego u vlažnoj 2022. godini (Slika 5d – g). Prema tome, u sušnoj 2023. u odnosu na vlažnu 2022. godinu koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih klorofila *a+b* u lišću obične bukve bile su niže za 47 %, 28 % i 43 %, a u lišću hrasta kitnjaka za 55 %, 45 % i 53 %.

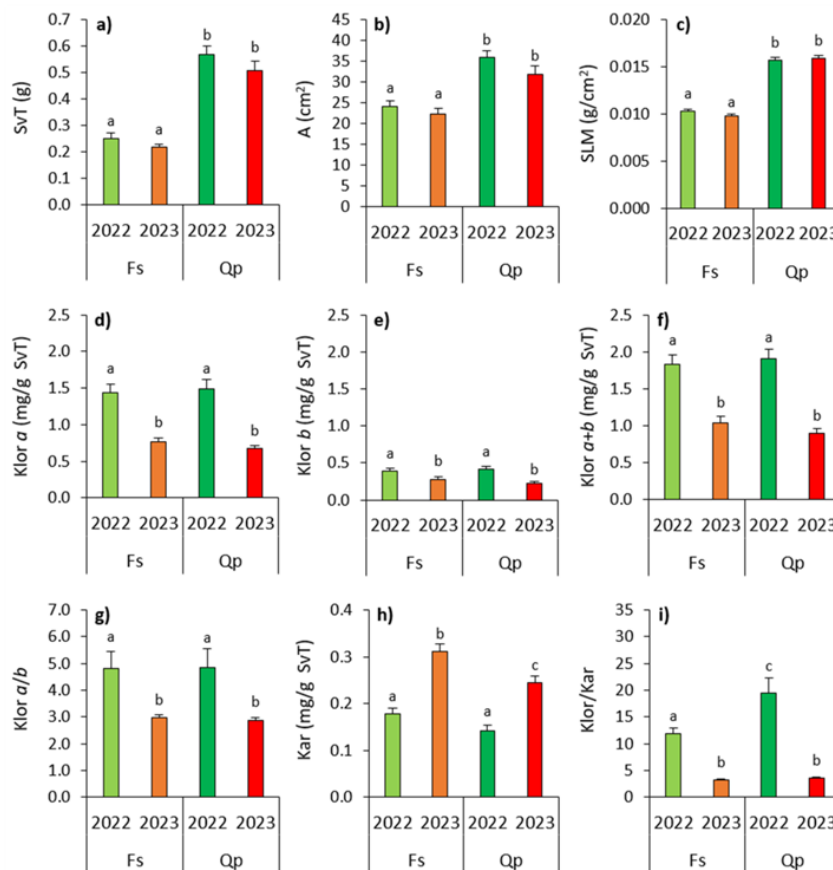
Na koncentraciju karotenoida značajno su utjecale vrsta i godina, ali ne i njihova interakcija (Tablica 1). To znači da je koncentracija karotenoida u lišću obične bukve bila značajno viša nego u lišću hrasta kitnjaka. Također, koncentracija karotenoida u lišću obje vrste bila je značajno viša u sušnoj 2023. godini nego u vlažnoj 2022. godini (Slika 5h), i to za 43 % kod obje vrste.

Tablica 1. Utjecaj vrste (obična bukva u odnosu na hrast kitnjak), suše (vlažna 2022. u odnosu na sušnu 2023. godinu) i njihove interakcije (vrsta × suša) na masu svježe tvari lišća (SvT), površinu lišća (A), specifičnu lisnu masu (SLM), koncentraciju klorofila *a* (Klor *a*), koncentraciju klorofila *b* (Klor *b*), koncentraciju ukupnih klorofila (Klor *a+b*), omjer klorofila *a* i *b* (Klor *a/b*), koncentraciju karotenoida (Kar), omjer ukupnih klorofila i karotenoida (Klor/Kar) i izmjerene vrijednosti klorofilnog indeksa (CCI).

Table 1 The main effect of species (common beech vs. sessile oak), drought (wet year 2022 vs. dry year 2023), and its interaction (species × drought) on leaf fresh matter (SvT), leaf area (A), specific leaf mass (SLM), concentration of chlorophyll *a* (Klor *a*), concentration of chlorophyll *b* (Klor *b*), concentration of total chlorophyll (Klor *a+b*), ratio of chlorophyll concentration *a* and *b* (Klor *a/b*), concentration of carotenoids (Kar), ratio of total chlorophyll and carotenoid concentration (Klor/Kar) and the measured values of chlorophyll index (CCI).

Svojstva Traits	Vrsta Species		Suša Drought		Vrsta × suša Species × drought	
	F	p	F	p	F	p
SvT	128,262	0,0001	3,184	0,077	0,276	0,600
LA	41,493	0,0001	3,059	0,083	0,413	0,522
SLM	455,531	0,0001	0,286	0,594	1,750	0,188
Klor <i>a</i>	0,062	0,804	79,185	0,0001	0,722	0,397
Klor <i>b</i>	0,213	0,645	23,971	0,0001	1,536	0,217
Klor <i>a+b</i>	0,128	0,722	84,425	0,0001	1,247	0,266
Klor <i>a/b</i>	0,003	0,954	21,533	0,0001	0,022	0,882
Kar	13,151	0,0001	69,499	0,0001	1,043	0,309
Klor/Kar	8,871	0,003	81,978	0,0001	7,266	0,008
CCI	17,457	0,0001	41,153	0,0001	7,199	0,008

Podebljane vrijednosti ukazuju na značajne utjecaje pri $p < 0,05$
Values in bold indicate significant effects at $p < 0.05$



Slika 5. Srednje vrijednosti $\pm$ S.E. za masu svježe tvari lišća (SvT; prikaz a), površinu lišća (A; prikaz b), specifičnu masu lišća (SLM; prikaz c), koncentraciju klorofila a (Klor a; prikaz d), klorofila b (Klor b; prikaz e) i ukupnih klorofila (Klor a+b; prikaz f), omjer koncentracije klorofila a i b (Klor a/b; prikaz g), koncentraciju karotenoida (Kar; prikaz h) te omjer koncentracije ukupnih klorofila i karotenoida (Klor/Kar; prikaz i) u lišću obične bukve (Fs) i hrasta kitnjaka (Qp) uzorkovanom tijekom vlažne 2022. i sušne 2023. godine. Različita mala slova ukazuju na značajne razlike između godina i/ili vrsta pri $p < 0,05$.

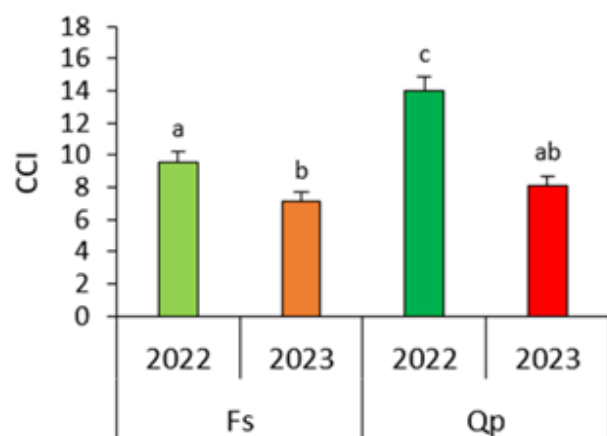
Figure 5 Mean values $\pm$ S.E. for mass of leaf fresh matter (SvT; panel a), leaf area (A; panel b), specific leaf mass (SLM; panel c), concentration of chlorophyll a (Klor a; panel d), concentration of chlorophyll b (Klor b; panel e) concentration of total chlorophyll (Klor a+b; panel f), ratio of chlorophyll a and b concentration (Klor a/b; panel g), concentration of carotenoids (Kar; panel h) and ratio of total chlorophyll and carotenoid concentration (Klor/Kar; panel i) in common beech (Fs) and sessile oak (Qp) leaves sampled in wet year 2022 and dry year 2023. Different small letters indicate significant differences among year and/or species at $p < 0.05$.

Na međusobni omjer koncentracije ukupnih klorofila i karotenoida značajno su utjecale vrsta i godina, ali i njihova međusobna interakcija (Tablica 1). To znači da je u lišću obične bukve omjer ukupnih klorofila i karotenoida bio značajno niži nego u lišću hrasta kitnjaka, ali samo tijekom vlažne 2022. godine, dok su tijekom sušne 2023. godine omjeri ukupnih klorofila i karotenoida u lišću obiju vrsta bili podjednaki (Slika 5i).

Na klorofilni indeks značajno su utjecale vrsta i godina, ali i njihova međusobna interakcija (Tablica 1). To znači da su u lišću obične bukve izmjerene značajno niže vrijednosti klorofilnog indeksa nego u lišću hrasta kitnjaka, ali samo tijekom vlažne 2022. godine, dok su tijekom sušne 2023. godine izmjere vrijednosti klorofilnog indeksa u lišću obiju vrsta bile podjednake (Slika 6).

Utjecaj suše na povratnu kalibraciju klorofilmetra MC-100 – Effect of drought on return calibration of chlorophyll meter MC-100

Između izmjerenih vrijednosti klorofilnog indeksa i koncentracije ukupnih klorofila a+b u lišću obiju vrsta utvrđene su visoko značajne ($p < 0,0001$) korelacije, kako



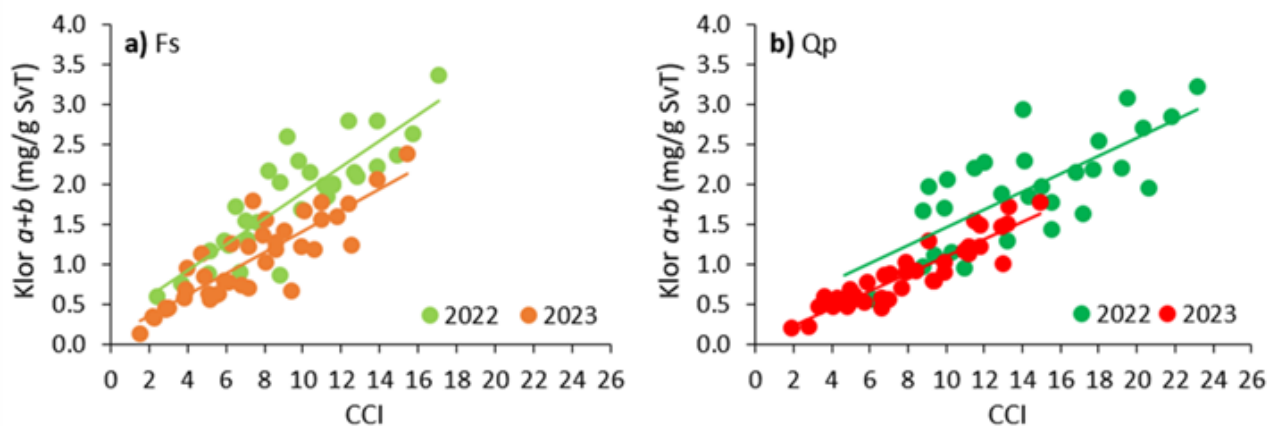
Slika 6. Srednje vrijednosti $\pm$ S.E. klorofilnoga indeksa (CCI) izmjerena u lišću obične bukve (Fs) i hrasta kitnjaka (Qp) uzorkovanoga tijekom vlažne 2022. i sušne 2023. godine. Različita mala slova ukazuju na značajne razlike između godina i/ili vrsta pri $p < 0,05$.

Figure 6 Mean values $\pm$ S.E. of chlorophyll index (CCI) measured in common beech (Fs) and sessile oak (Qp) leaves sampled in wet year 2022 and dry year 2023. Different small letters indicate significant differences among year and/or species at $p < 0.05$.

Tablica 2. Kalibracijske jednadžbe (linearne regresijske jednadžbe) konstruirane na temelju izmjerenog klorofilnoga indeksa (CCI) i stvarne koncentracije ukupnih klorofila (Klor a+b) u lišću obične bukve (Fs) i hrasta kitnjaka (Qp) uzorkovanoga tijekom vlažne 2022. i/ili sušne 2023. godine.

Table 2 Calibration equations (linear regression equations) constructed on the basis of the measured chlorophyll index (CCI) and the actual concentration of total chlorophyll (Klor a+b) in common beech (Fs) and sessile oak (Qp) leaves sampled during the wet year 2022 and/or the dry year 2023.

Vrsta Species	Godina Year	n	Kalibracijska jednadžba Calibration equation	p	R ²
<i>Fagus sylvatica</i>	2022.	30	Klor a+b (mg/g SvT) = 0,161 CCI + 0,291	< 0,0001	0,748
	2023.	40	Klor a+b (mg/g SvT) = 0,132 CCI + 0,099	< 0,0001	0,757
	2022. + 2023.	70	Klor a+b (mg/g SvT) = 0,164 CCI + 0,037	< 0,0001	0,738
<i>Quercus petraea</i>	2022.	30	Klor a+b (mg/g SvT) = 0,111 CCI + 0,350	< 0,0001	0,575
	2023.	40	Klor a+b (mg/g SvT) = 0,109 CCI + 0,015	< 0,0001	0,842
	2022. + 2023.	70	Klor a+b (mg/g SvT) = 0,133 CCI + 0,070	< 0,0001	0,778



Slika 7. Linearni odnos između klorofilnoga indeksa (CCI) i koncentracije ukupnih klorofila (Klor a+b) u svježoj tvari uzorkovanoga lišća (mg/g SvT) tijekom vlažne 2022. i sušne 2023. godine, kod obične bukve (Fs; prikaz a) i hrasta kitnjaka (Qp; prikaz b).

Figure 7 Linear relationship between the chlorophyll index (CCI) and the concentration of total chlorophyll (Klor a+b) in the fresh matter of sampled leaves (mg/g SvT) during the wet year 2022 and the dry year 2023 in common beech (Fs; panel a) and sessile oak (Qp; panel b).

Tablica 3. Razine značajnosti (p) dobivene pomoću ANCOVA-e s ciljem usporedbe odsječaka na osi Y i nagiba pravaca kalibracijskih jednadžbi koje opisuju odnos između klorofilnoga indeksa (CCI) i koncentracije ukupnih klorofila (Klor a+b) u lišću obične bukve (Fs) i hrasta kitnjaka (Qp) uzorkovanoga tijekom vlažne 2022. i sušne 2023. godine. Na razlike u nagibima pravaca ukazuju značajne interakcije godina × CCI. Samo u slučaju ako interakcija nije značajna opravdano je interpretirati razlike između odsječaka na osi Y (faktor godina).

Table 3 Significance levels (p) calculated by ANCOVA with the aim of comparing the Y-intercepts and slopes of the calibration equations which describe the relationship between the chlorophyll index (CCI) and the concentration of total chlorophyll (Klor a+b) in the common beech (Fs) and sessile oak (Qp) leaves sampled during the wet year 2022 and the dry year 2023. Differences in the slopes are indicated by a significant interaction of year × CCI. Only if the interaction is not significant can differences in the Y-intercept (year factor) be interpreted.

Vrsta Species	Godina Year	CCI	Godina × CCI Year × CCI
<i>Fagus sylvatica</i>	0,319	< 0,0001	0,166
<i>Quercus petraea</i>	0,151	< 0,0001	0,914

Razina značajnosti; $p < 0,05$

Significance level; $p < 0.05$

u vlažnoj 2022. tako i u sušnoj 2023. godini. Koeficijenti determinacije (r^2) ukazuju da je u lišću obične bukve uzorkovanom tijekom vlažne 2022. i sušne 2023. godine na temelju izmjerenih vrijednosti CCI-a moguće objasniti 75 i 76 % varijacije u koncentraciji ukupnih klorofila a+b, a kod hrasta kitnjaka 58 % i 84 % (Tablica 2 i Slika 7)

Prema rezultatima ANCOVA-e utjecaj godine (suše) na parametre kalibracijskih jednadžbi (nagibe pravaca i odsječke na osi Y) koje opisuju odnos između klorofilnog indeksa i koncentracije ukupnih klorofila a+b nije bio značajan niti kod jedne vrste (Tablica 3). Uz to, koeficijenti determinacije, nagibi pravaca i odsjeci na osi Y regresijskih jednadžbi konstruiranih na temelju lišća uzorkovanog tijekom obiju godina (vlažna 2022. + sušna 2023.) bili su vrlo slični kao i kod jednadžbi koje opisuju odnos klorofilnog indeksa i koncentracije ukupnih klorofila a+b u lišću uzorkovanom posebno tijekom vlažne 2022. i sušne 2023. godine (Tablica 2).

RASPRAVA DISCUSSION

Utjecaj vrste i suše na strukturne značajke lišća i koncentraciju fotosintetskih pigmenta – *Effect of species and drought on structural leaf traits and concentration of photosynthetic pigments*

Prema dobivenim rezultatima, strukturne značajke lišća nisu se značajno razlikovale između vlažne 2022. i sušne 2023. godine, niti kod obične bukve niti kod hrasta kitnjaka (Tablica 1, Slika 5a – c). Međutim, srednje vrijednosti mase i površine lišća te specifične lisne mase kod obiju vrsta bile su nešto niže u sušnoj 2023. nego u vlažnoj 2022. godini (Slika 5a – c). To je do određene mjere u skladu s rezultatima ranijih istraživanja provedenih na šumskom drveću, uključujući običnu bukvu i hrast kitnjak, prema kojima suša umanjuje masu i površinu lišća, što ujedno mijenja njegovu specifičnu lisnu površinu i/ili specifičnu lisnu masu (Aspelmeier 2001, Farooq i dr. 2012, Weithmann i dr. 2022, Thomas i dr. 2024). Značajno viša specifična lisna masa kod hrasta kitnjaka (Tablica 1, Slika 5c) ukazuje na veću sklerofilnost njegova lišća (Abrams 1994, Backes i Leuschner 2000), što mu u odnosu na običnu bukvu osigurava bolju sposobnost adaptacije na sušni stres i/ili bolju sposobnost podnošenja suše (Aranda i dr. 1996, Aranda i dr. 2000, Raftoyannis i Radoglou 2002, Meyer i dr. 2020). U skladu s tim, bilo je za očekivati da će izloženost obiju vrsta istoj razini sušnoga stresa imati negativniji utjecaj na koncentracije fotosintetskih pigmenta u lišću obične bukve nego hrasta kitnjaka. Međutim, prema našim rezultatima to se nije dogodilo. Koncentracije klorofila u lišću obiju vrsta tijekom sušne 2023. godine bile su podjednake (Slika 5d – f), dok su koncentracije karotenoida u lišću obične bukve bile značajno više nego u lišću hrasta kitnjaka (Slika 5h). Prema tome, može se pretpostaviti da je u lišću obične bukve tijekom sušne 2023. godine uslijed naglog porasta koncentracije karotenoida došlo do sprječavanja fotooksidacijskih oštećenja kloroplasta (Choudhury i Behera 2001, Gitelson i dr. 2002), što je u konačnici rezultiralo sličnim koncentracijama klorofila u lišću obiju vrsta. U skladu s tim, može se pretpostaviti da obična bukva efikasnijom produkcijom karotenoida tijekom sušnoga razdoblja održava svoju konkurentnost prema suši tolerantnijem hrastu kitnjaku. Negativan utjecaj suše na koncentraciju klorofila u lišću može biti posljedica već spomenutih fotooksidacijskih oštećenja tilakoidnih membrana kloroplasta (Berthars i Schofes 1999), ali i nedovoljno razvijenih kloroplasta zbog otežanog usvajanja ugljika i dušika (Sack i dr. 2003, Hu i dr. 2023). U skladu s tim, ne iznenađuje što su koncentracije klorofila u lišću obiju vrsta bile značajno niže (Slika 5d – f), a koncentracije karotenoida značajno više (Slika 5h) u sušnoj 2023. nego u vlažnoj 2022.

godini. Takav rezultat u skladu je s rezultatima ranijih istraživanja prema kojima pod utjecajem suše obično dolazi do opadanja koncentracije klorofila uz istovremeni porast koncentracije karotenoida, što ujedno rezultira opadanjem recipročnog omjera ukupnih klorofila i karotenoida (Munné-Bosch i Alegre 2000, Saha i dr. 2020). U našem slučaju to je također zabilježeno. Na to ukazuju značajno niži recipročni omjeri klorofila i karotenoida u sušnoj 2023. nego u vlažnoj 2022. godini kod obiju vrsta (Slika 5i). Uz to, pod utjecajem sušnoga stresa može doći i do degradacije klorofila *b* u klorofil *a*, što rezultira porastom recipročnog omjera klorofila *a* i *b* (Guo i dr. 2016, Mulero i dr. 2022). Međutim, u našem slučaju to nije zabilježeno kod niti jedne vrste. Na to ukazuju značajno niži recipročni omjeri klorofila *a* i *b* u sušnoj 2023. nego u vlažnoj 2022. godini, kako kod obične bukve tako i kod hrasta kitnjaka (Slika 5g).

Utjecaj suše na povratnu kalibraciju klorofilmetra MC-100 – *Effect of drought on return calibration of chlorophyll meter MC-100*

U vlažnoj 2022. i u sušnoj 2023. godini laboratorijski utvrđene koncentracije ukupnih klorofila bile su u snažnoj vezi s izmjerenim vrijednostima klorofilnoga indeksa uz prilično visoke koeficijente determinacije, kako u lišću obične bukve tako i u lišću hrasta kitnjaka (Tablica 2, Slika 7). Takav rezultat u skladu je s ranijim rezultatima povratne kalibracije i/ili testiranja optičkih klorofilmetara na primjeru šumskoga drveća (Demarez i dr. 1999, Uddling i dr. 2007, Percival i dr. 2008, Coste i dr. 2010, Silla i dr. 2010, Cerovic i dr. 2012, Parry i dr. 2014, Sever i dr. 2018, Dong i dr. 2019, Brown i dr. 2022). Unatoč statistički značajnim razlikama između godina s obzirom na koncentraciju ukupnih klorofila (Slika 5f) i klorofilnog indeksa (Slika 6), rezultati ANCOVA-e nisu potvrdili negativan utjecaj godine i/ili suše na homogenost odsječaka na osi *Y* i nagibe pravaca kalibracijskih jednadžbi koje opisuju odnos klorofilnog indeksa i koncentracije ukupnih klorofila, niti kod obične bukve niti kod hrasta kitnjaka (Tablica 3). U skladu s tim, kod obiju vrsta bilo je opravdano konstruirati uniformne kalibracijske jednadžbe na temelju lišća uzorkovanoga tijekom obiju godina, vlažne 2022. i sušne 2023. (Tablica 3).

ZAKLJUČCI CONCLUSIONS

Pod utjecajem suše došlo je do opadanja koncentracije klorofila i porasta koncentracije karotenoida u lišću obiju vrsta. Međutim, tijekom suše porast koncentracije karotenoida bio je izraženiji u lišću obične bukve nego u lišću hrasta kitnjaka, dok su koncentracije klorofila bile podjednake u lišću obiju vrsta. To sugerira da bi obična bukva mogla imati efikasniju produkciju karotenoida

tijekom sušnog razdoblja što bi joj moglo pomoći u održavanju konkurentnosti prema suši tolerantnijem hrastu kitnjaku.

Na parametre kalibracijskih jednadžbi koje opisuju odnos između klorofilnog indeksa i koncentracije ukupnih klorofila u lišću obične bukve i hrasta kitnjaka nisu utjecale suša i/ili godina. Prema tome, klorofilmetar MC-100 uz primjenu odgovarajućih kalibracijskih jednadžbi predstavlja pouzdan alat za procjenu koncentracije ukupnih klorofila u lišću obične bukve i hrasta kitnjaka, neovisno o utjecaju suše.

ZAHVALA

ACKNOWLEDGEMENTS

Ovo istraživanje provedeno je u sklopu istraživačkog projekta „IP-2020-02-5204 Fenotipski odgovor provenijencija obične bukve i hrasta kitnjaka na dugotrajnu sušu u interakciji s različitom koncentracijom fosfora u tlu” kojega financira Hrvatska zaklada za znanost, a koji se od 1. siječnja 2021. do 31. prosinca 2024. godine provodi na Sveučilištu u Zagrebu Fakultetu šumarstva i drvene tehnologije.

LITERATURA

REFERENCES

- Abrams, M.D., 1994: Genotypic and phenotypic variation as stress adaptations in temperate tree species: a review of several case studies. *Tree Physiology* 14: 833–842. <https://doi.org/10.1093/treephys/14.7.8-9.833>
- Apogee Instruments, 2022: Owner's manual-Chlorophyll Concentration Meter, Model MC-100. Apogee Instruments, Inc., Logan, Utah, USA.
- Aranda, I., L. Gil, J.A. Pardos, 1996: Seasonal water relations of three broadleaved species (*Fagus sylvatica* L., *Quercus petraea* (Mattuschka) Liebl. and *Quercus pyrenaica* Willd.) in a mixed stand in the centre of the Iberian Peninsula. *Forest Ecology and Management* 84: 219–229. [https://doi.org/10.1016/0378-1127\(96\)03729-2](https://doi.org/10.1016/0378-1127(96)03729-2)
- Aranda, I., L. Gil, J.A. Pardos, 2000: Water relations and gas exchange in *Fagus sylvatica* L. and *Quercus petraea* (Mattuschka) Liebl. in a mixed stand at their southern limit of distribution in Europe. *Trees – Structure and Function* 14: 344–352. <https://doi.org/10.1007/s004680050229>
- Arend, M., K. Sever, R. Pflug, A. Gessler, M. Schaub, 2016: Seasonal photosynthetic response of European beech to severe summer drought: Limitation, recovery and post-drought stimulation. *Agricultural and Forest Meteorology* 220: 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2016.01.011>
- Arend, M., A. Brem, T.M. Kuster, M.S. Günthardt-Goerg, 2013: Seasonal photosynthetic responses of European oaks to drought and elevated daytime temperature. *Plant Biology* 15: 169–176. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00625.x>
- Aspelmeier, S., 2001: Genotypic variation in drought response of silver birch (*Betula pendula* Roth). Doktorski rad, Die Fakultäten der Georg-August-Universität Göttingen, Njemačka.
- Bacci, L., M. De Vincenzi, B. Rapi, B. Arca, F. Benincasa, 1998: Two methods for the analysis of colorimetric components applied to plant stress monitoring. *Computers and Electronics in Agriculture* 19: 167–186. [https://doi.org/10.1016/S0168-1699\(97\)00042-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1699(97)00042-2)
- Backes, K., C. Leuschner, 2000: Leaf water relations of competitive *Fagus sylvatica* and *Quercus petraea* trees during 4 years differing in soil drought. *Canadian Journal of Forest Research* 30: 335–346. <https://doi.org/10.1139/x99-205>
- Berthars, M., B. Schofes, 1999: Photosynthetic pigment metabolism in plants during stress. U (Pessaraki, M., ur.): *Handbook of Plant and Crop Stress*, Second Edition. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, pp. 527–544.
- Biswall, B., 1995: Carotenoid catabolism during leaf senescence and its control by light. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 30: 3–14. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(95\)07197-A](https://doi.org/10.1016/1011-1344(95)07197-A)
- Bonneville, M., J.W. Fyles, 2006: Assessing variations in SPAD-502 chlorophyll meter measurements and their relationships with nutrient content of trembling aspen foliage. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 37: 525–539. <https://doi.org/10.1080/00103620500449385>
- Bréda, N., R. Huc, A. Granier, E. Dreyer, 2006: Temperate forest trees and stands under severe drought: A review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. *Annals of Forest Science* 63 (6): 625–644. <https://doi.org/10.1051/forest:2006042>
- Brown, L.A., O. Williams, J. Dash, 2022: Calibration and characterisation of four chlorophyll meters and transmittance spectroscopy for non-destructive estimation of forest leaf chlorophyll concentration. *Agricultural and Forest Meteorology* 323: 109059. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2022.109059>
- Buras, A., A. Rammig, C.S. Zang, 2020: Quantifying impacts of the 2018 drought on European ecosystems in comparison to 2003. *Biogeosciences* 17 (6): 1655–1672. <https://doi.org/10.5194/bg-17-1655-2020>
- Cate, T.M., T.D. Perkins, 2003: Chlorophyll content monitoring in sugar maple (*Acer saccharum*). *Tree Physiology* 23: 1077–1079. <https://doi.org/10.1093/treephys/23.15.1077>
- Cerovic, Z.G., G. Masdoumier, N.B. Ghazlen, G. Latouche, 2012: A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. *Physiologia Plantarum* 146: 251–260. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01639.x>
- Choudhury, N., R. Behera, 2001: Photoinhibition of photosynthesis: Role of carotenoids in photoprotection of chloroplast constituents. *Photosynthetica* 39: 481–488. <https://doi.org/10.1023/A:1015647708360>
- Coste, S., C. Baraloto, C. Leroy, É. Marcon, A. Renaud, A.D. Richardson, J.-C. Roggy, H. Schimann, J. Uddling, B. Hérault, 2010: Assessing foliar chlorophyll contents with the SPAD-502 chlorophyll meter: a calibration test with thirteen tree species of tropical rainforest in French Guiana. *Annals of Forest Science* 67: 607. <https://doi.org/10.1051/forest/2010020>
- Croft, H., J.M. Chen, X. Luo, P. Bartlett, B. Chen, R.M. Staebler, 2017: Leaf chlorophyll content as a proxy for leaf photosynthetic capacity. *Global Change Biology* 23: 3513–3524. <https://doi.org/10.1111/gcb.13599>
- Demarez, V., J.P. Gastellu-Etchegorry, E. Mougin, G. Marty, C. Poisy, E. Dufrene, V. Le Dantec, 1999: Seasonal variation of leaf chlorophyll content of a temperate forest. Inversion of the PROSPECT model. *International Journal of Remote Sensing* 20: 879–894. <https://doi.org/10.1080/014311699212975>
- Dong, T., J. Shang, J.M. Chen, J. Liu, B. Qian, B. Ma, M.J. Morrison, C. Zhang, Y. Liu, Y. Shi, H. Pan, G. Zhou, 2019: Assessment of portable chlorophyll meters for measuring crop leaf chlorophyll concentration. *Remote Sensing* 11: 2706. <https://doi.org/10.3390/rs11222706>
- Epron, D., E. Dreyer, 1993: Long-term effects of drought on photosynthesis of adult oak trees [*Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L.] in a natural stand. *New Phytologist* 125: 381–389. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb03890.x>
- Esteban, R., O. Barrutia, U. Artetxe, B. Fernández-Marín, A. Hernández, J.I. García-Plazaola, 2015: Internal and external factors affecting photosynthetic pigment composition in plants: A meta-analytical approach. *New Phytologist* 206: 268–280. <https://doi.org/10.1111/nph.13186>
- Farooq, M., M. Hussain, A. Wahid, K. Siddique, 2012: Drought stress in plants. U (Aroca, R., ur.): *Plant responses to drought stress: From morphological to molecular features*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1–33. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0>

- Filimon, V.R., R. Filimon, L. Rotaru, 2014: Characterization of some *Vitis vinifera* L. indigenous varieties by analysis of leaf photosynthetic pigments. *Bulletin UASVM Horticulture* 71 (2): 246–255. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-hort:10278>
- Gallé, A., U. Feller, 2007: Changes of photosynthetic traits in beech saplings (*Fagus sylvatica*) under severe drought stress and during recovery. *Physiologia Plantarum* 131: 412–421. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00972.x>
- García-Plazaola, J.I., R. Esteban, K. Hormaetxe, B. Fernández-Marín, J.M. Becerril, 2008: Photoprotective responses of Mediterranean and Atlantic trees to the extreme heat-wave of summer 2003 in Southwestern Europe. *Trees – Structure and Function* 22: 385–392. <https://doi.org/10.1007/s00468-007-0199-y>
- Gitelson, A.A., Y. Zur, O.B. Chivkunova, M.N. Merzlyak, 2002: Assessing carotenoid content in plant leaves with reflectance spectroscopy. *Photochemistry and Photobiology* 75 (3): 272–281. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0750272AC-CIPL2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0750272AC-CIPL2.0.CO2)
- Guo, Y.Y., H.Y. Yu, D.S. Kong, F. Yan, Y.J. Zhang, 2016: Effects of drought stress on growth and chlorophyll fluorescence of *Lycium ruthenicum* Murr. seedlings. *Photosynthetica* 54: 524–531. <https://doi.org/10.1007/s11099-016-0206-x>
- Hu, F., Y. Zhang, J. Guo, 2023: Effects of drought stress on photosynthetic physiological characteristics, leaf microstructure, and related gene expression of yellow horn. *Plant Signaling & Behavior* 18 (1): e2215025. <https://doi.org/10.1080/15592324.2023.2215025>
- IPCC, 2023: Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. 929169164X, IPCC, Geneva, Switzerland. <https://doi.org/10.59327/IPCC/AR6-9789291691647.001>
- Jifon, J.L., J.P. Syvertsen, E. Whaley, 2005: Growth environment and leaf anatomy affect nondestructive estimates of chlorophyll and nitrogen in Citrus sp. leaves. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130: 152–158. <https://doi.org/10.21273/JASHS.130.2.152>
- Lauteri, M., A. Scartazza, M.C. Guido, E. Brugnoli, 1997: Genetic variation in photosynthetic capacity, carbon isotope discrimination and mesophyll conductance in provenances of *Castanea sativa* adapted to different environments. *Functional Ecology* 11: 675–683. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1997.00140.x>
- Li, G., D. Aubrey, H. Sun, 2017: Predictive capability of a leaf optical meter for determining leaf pigment status during senescence. *Photosynthetica* 55: 543–552. <https://doi.org/10.1007/s11099-016-0678-8>
- Li, Y., C. Liu, J. Zhang, H. Yang, L. Xu, Q. Wang, L. Sack, X. Wu, J. Hou, N. He, 2018a: Variation in leaf chlorophyll concentration from tropical to cold-temperate forests: Association with gross primary productivity. *Ecological Indicators* 85: 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.10.025>
- Li, Y., N. He, J. Hou, L. Xu, C. Liu, J. Zhang, Q. Wang, X. Zhang, X. Wu, 2018b: Factors influencing leaf chlorophyll content in natural forests at the biome scale. *Frontiers in Ecology and Evolution* 6: 64. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00064>
- Lichtenthaler, H.K., 1987: Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Mafakheri, A., A. Siosemardeh, B. Bahrmanjad, P. Struik, Y. Sohrabi, 2010: Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Australian Journal of Crop Science* 4: 580–585.
- Mahajan, M., P.K. Pal, 2016: Growing conditions influence non-destructive estimation of chlorophyll in leaves of *Vale-riana jatamansi*. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 3 (3): 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.05.005>
- Meskini-Vishkaee, F., M.H. Mohammadi, M.R. Neyshabouri, F. Shekari, 2015: Evaluation of canola chlorophyll index and leaf nitrogen under wide range of soil moisture. *International Agrophysics* 29 (1): 83–90. DOI: <https://doi.org/10.1515/intag-2015-0014>
- Meyer, B.F., A. Buras, A. Rammig, C.S. Zang, 2020: Higher susceptibility of beech to drought in comparison to oak. *Dendrochronologia* 64: 125780. <https://doi.org/10.1016/j.dendro.2020.125780>
- Mulero, G., H. Bacher, U. Kleiner, Z. Peleg, I. Herrmann, 2022: Spectral estimation of in vivo wheat chlorophyll a/b ratio under contrasting water availabilities. *Remote Sensing* 14 (11): 2585. <https://doi.org/10.3390/rs14112585>
- Munné-Bosch, S., L. Alegre, 2000: Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* 210: 925–931. <https://doi.org/10.1007/s004250050699>
- Palett, K.E., A.J. Young, 1993: Carotenoids. U (Alscher, R.G., J.L. Hess, ur): Antioxidants in Higher Plants. CRC Press Inc., Boca Raton, London, New York, pp. 60–89. <https://doi.org/10.1201/9781315149899>
- Parry, C., J.M. Blonquist, B. Bugbee, 2014: In situ measurement of leaf chlorophyll concentration: analysis of the optical/absolute relationship. *Plant, Cell & Environment* 37: 2508–2520. <https://doi.org/10.1111/pce.12324>
- Percival, G.C., I.P. Keary, K. Noviss, 2008: The potential of a chlorophyll content SPAD meter to quantify nutrient stress in foliar tissue of Sycamore (*Acer pseudoplatanus*), English oak (*Quercus robur*), and European beech (*Fagus sylvatica*). *Arboriculture & Urban Forestry* 34: 89–100.
- Perić, S., M. Tijardović, M. Oršanić, J. Margaletić, 2009: Rasad- nička proizvodnja i važnost šumskog reprodukcijskog materijala u RH. Radovi Hrvatski šumarski institut 44 (1): 17–27.
- Pretzsch, H., K. Bielak, J. Block, A. Bruchwald, J. Dieler, H.P. Ehrhart, U. Kohnle, J. Nagel, H. Spellmann, M. Zasada i dr., 2013: Productivity of mixed versus pure stands of oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L.) and European beech (*Fagus sylvatica* L.) along an ecological gradient. *European Journal of Forest Research* 132: 263–280. <https://doi.org/10.1007/s10342-012-0673-y>
- Pšidová, E., L. Ditmarová, G. Jamnická, J. Váľka, D. Gömöry, 2013: Assessment of the impact of drought stress on particular biochemical and physiological characteristics of beech saplings leaves from different provenances. *Folia Oecologica* 40: 97–106.
- Raftoyannis, Y., K. Radoglou, 2002: Physiological responses of beech and sessile oak in a natural mixed stand during a dry summer. *Annals of Botany* 89 (6): 723–730. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf133>
- Richardson, A.D., S.P. Duigan, G.P. Berlyn, 2002: An evaluation of non-invasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist* 153: 185–194. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646X.2001.00289.x>
- Sack, L., P.D. Cowan, N. Jaikumar, N.M. Holbrook, 2003: The 'hydrology' of leaves: co-ordination of structure and function in temperate woody species. *Plant, Cell and Environment* 26: 1343–1356. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2003.01058.x>
- Saha, S., H.H. Begum, S. Nasrin, R. Samad, 2020: Effects of drought stress on pigment and protein contents and antioxidant enzyme activities in five varieties of rice (*Oryza sativa* L.). *Bangladesh Journal of Botany* 49 (4): 997–1002. <https://doi.org/10.3329/bjb.v49i4.52516>
- Sánchez-Gómez, D., T.M. Robson, A. Gascó, E. Gil-Pelegrín, I. Aranda, 2013: Differences in the leaf functional traits of six beech (*Fagus sylvatica* L.) populations are reflected in their response to water limitation. *Environmental and Experimental Botany* 87: 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.09.011>
- Schmal, J.L., D.F. Jacobs, C. O'Reilly, 2011: Nitrogen budgeting and quality of exponentially fertilized *Quercus robur* seedlings in Ireland. *European Journal of Forest Research* 130: 557–567. <https://doi.org/10.1007/s10342-010-0443-7>
- Senf, C., A. Buras, C.S. Zang, A. Rammig, R. Seidl, 2020: Excess forest mortality is consistently linked to drought across Europe. *Nature Communications* 11 (1): 6200. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19924-1>

- Sever, K., S. Bogdan, Ž. Škvorc, M.Z. Ostrogović Sever, J. Franjić, 2016: Estimation of leaf nitrogen concentrations in *Quercus robur* L. using the CCM-200 portable chlorophyll meter for different patterns of vegetative growth and acorn production. *New Forests* 47: 513–527. <https://doi.org/10.1007/s11056-016-9528-6>
- Sever, K., S. Bogdan, J. Franjić, Ž. Škvorc, 2018: Nedestruktivna procjena koncentracije fotosintetskih pigmenata u lišću hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.). *Šumarski list* 142 (5-6): 247–257. <https://doi.org/10.31298/sl.142.5-6.6>
- Sever, K., A. Vukmirović, L. Hodak, S. Bogdan, I. Katičić Bogdan, D. Krstonošić, T. Karažija, J. Franjić, Ž. Škvorc, 2022: Funkcionalna prilagodba prirodnog pomlatka hrasta kitnjaka i obične bukve na različite stanišne prilike. *Šumarski list* 146 (7-8): 293–307. <https://doi.org/10.31298/sl.146.7-8.2>
- Silla, F., A. González-Gil, M.E. González-Molina, S. Mediavilla, A. Escudero, 2010: Estimation of chlorophyll in *Quercus* leaves using a portable chlorophyll meter: effects of species and leaf age. *Annals of Forest Science* 67: 108. <https://doi.org/10.1051/forest/2009093>
- Taiz, L., E. Zeiger, 2006: *Plant Physiology*. Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Thomas F.M., S. Preusser, B. Backes, W. Werner, 2024: Leaf traits of Central-European beech (*Fagus sylvatica*) and oaks (*Quercus petraea/robur*): Effects of severe drought and long-term dynamics, *Forest Ecology and Management* 559: 121823. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2024.121823>
- Thomas, F.M., T. Gausling, 2000: Morphological and physiological responses of oak seedlings (*Quercus petraea* and *Q. robur*) to moderate drought. *Annals of Forest Science* 57: 325–333. <https://doi.org/10.1051/forest:2000123>
- Uddling, J., J. Gelang-Alfredsson, K. Piikki, H. Pleijel, 2007: Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynthesis Research* 91: 37–46. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9077-5>
- van den Berg, A.K., T.D. Perkins, 2004: Evaluation of a portable chlorophyll meter to estimate chlorophyll and nitrogen contents in sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) leaves. *Forest Ecology and Management* 200: 113–117. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2004.06.005>
- Vukelić, J., 2012: Šumska vegetacija Hrvatske. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet i Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.
- Weithmann, G., B. Schuldt, R.M. Link, D. Heil, S. Hoeber, H. John, H. Müller-Haubold, L.M. Schüller, K. Schumann, C. Leuschner, 2022: Leaf trait modification in European beech trees in response to climatic and edaphic drought. *Plant Biology* 24: 1272–1286. <https://doi.org/10.1111/plb.13366>
- WinFolia™, 2001: WinFOLIA ver. PRO 2005b. Regent Instruments Inc. Quibec City, Canada.

SUMMARY

The goals of this study were to investigate the effects of species and drought on the concentration of photosynthetic pigments (chlorophyll and carotenoids) and their reciprocal ratios in the leaves of common beech and sessile oak. Additionally, the study aimed to assess how drought influences the accuracy of non-destructive estimates of total chlorophyll concentration using a portable optical chlorophyll meter (MC-100). The research was conducted on natural saplings of common beech and sessile oak, which were regularly watered during the 2022 growing season and exposed to drought during the 2023 growing season. Leaves were collected from these saplings in both years, and the chlorophyll index was measured in situ using the chlorophyll meter. The collected leaves were then analyzed in the laboratory to determine their morphological traits and the concentration of photosynthetic pigments, specifically chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophylls (which are crucial for electron and/or energy transfer within photosystems I and II), and carotenoids (which primarily protect the photosynthetic apparatus from photooxidative damage). Given that common beech exhibits more mesophilic traits while sessile oak shows more xerophytic traits, it was hypothesized that drought would have a more pronounced negative effect on the concentration of photosynthetic pigments in common beech compared to sessile oak leaves.

The results of factorial ANOVA and descriptive statistics indicated that drought led to a decrease in chlorophyll concentration and an increase in carotenoid concentration in the leaves of both species. However, during the dry year of 2023, the increase in carotenoid concentration was more pronounced in common beech compared to sessile oak, while chlorophyll concentrations and the reciprocal ratios of chlorophyll to carotenoid concentrations were similar in the leaves of both species. This suggests that enhanced carotenoid production during dry periods may help common beech mitigate photooxidative damage to chloroplasts and/or counteract a significant decrease in chlorophyll concentration. Consequently, it is possible that common beech maintains its competitiveness relative to the more drought-resistant sessile oak due to its more efficient carotenoid production during drought.

The results of ANCOVA and regression analysis revealed that the year or drought did not significantly affect the parameters of the calibration equations describing the relationship between the chlorophyll index and total chlorophyll concentration in the leaves of common beech and sessile oak. This implies that the chlorophyll meter MC-100, when used with appropriate calibration equations, is a reliable tool for estimating total chlorophyll concentration in the leaves of both species, irrespective of drought conditions.

KEY WORDS: chlorophyll meter, chlorophyll index, chlorophylls, carotenoids, *Fagus sylvatica*, *Quercus petraea*