

# POUZDANOST PROCJENE STANJA ISHRANE HRASTA LUŽNJAKA (*Quercus robur* L.) S DUŠIKOM POMOĆU PRIJENOSNOG KLOROFILMETRA CCM-200

## ESTIMATION OF NITROGEN NUTRITION OF PEDUNCULATE OAK (*Quercus robur* L.) USING A PORTABLE CHLOROPHYLL METER CCM-200

Krunoslav SEVER<sup>1</sup>, Matija HRUST<sup>2</sup>, Željko ŠKVORC<sup>1</sup>, Saša BOGDAN<sup>1</sup>, Ivan SELETKOVIĆ<sup>3</sup>, Nenad POTOČIĆ<sup>3</sup>, Jozo FRANJIĆ<sup>1</sup>

### Sažetak

U radu je istražen potencijal prijenosnog optičkog klorofilmetra CCM-200 (Opti-Sciences, Tyngsboro, MA, USA) u svrhu utvrđivanja stanja ishrane hrasta lužnjaka s dušikom na temelju uzorkovanja različitih tipova lišća (lišće proljetnih i sekundarnih izbojaka). Istraživanje je provedeno na 30 biljaka uzgajanih u pokusnom nasadu tijekom dva vegetacijska razdoblja (2009. i 2010. godine). Meteorološke prilike i gnojidbeni tretman koji je bio proveden u rano proljeće 2009. godine uvjetovali su razlike između istraživanih godina s obzirom na razvoj izbojaka tijekom tercijarnoga porasta (što predstavlja potencijalni pokretač translokacije dušika u krošnjama istraživanih biljaka). Na temelju lišća proljetnih i sekundarnih izbojaka, uzorkovanoga u srpnju i rujnu 2009. i 2010. godine konstruirano je ukupno osam kalibracijskih jednadžbi. Te jednadžbe pouzdano opisuju ( $p < 0,001$ ) odnos između klorofilnoga indeksa izmjenenoga pomoću klorofilmetra i koncentracije ukupnoga dušika u lišću proljetnih i sekundarnih izbojaka s obzirom na vrijeme uzorkovanja. Pomoću ANCOVA-e ispitan je utjecaj tipa uzorkovanoga lišća na homogenost parametara kalibracijskih jednadžbi (Y-odsječaka i nagiba pravaca) s obzirom na vrijeme uzorkovanja. Tip lišća nije značajno utjecao na nagibe pravaca, ali značajno je utjecao na njihove Y-odsječke u tri od ukupno četiri promatrana vremena uzorkovanja. Homogenost parametara kalibracijskih jednadžbi konstruiranih na temelju različitih tipova lišća utvrđena je samo u rujnu 2009. godine, kada je pod utjecajem produkcije tercijarnih izbojaka došlo do izjednačenja koncentracije ukupnoga dušika u oba tipa uzorkovanoga lišća. Prema tomu, jednom konstruiranu kalibracijsku jednadžbu nije moguće istovremeno koristiti za preciznu procjenu ukupne koncentracije dušika u različitim tipovima lišća. Takav rezultat dovodi u pitanje praktičnost i pouzdanost procjene stanja ishrane hrasta lužnjaka s dušikom pomoću klorofilmetra CCM-200.

**KLJUČNE RIJEČI:** Indeks relativnog sadržaja klorofila u lišću, tercijarni porast, dinamika dušika u lišću, parametri kalibracijske jednadžbe

<sup>1</sup> Dr. sc. Krunoslav Sever, Izv. prof. dr. sc. Željko Škvorc, Izv. prof. dr. sc. Saša Bogdan, prof. dr. sc. Jozo Franjić, Šumarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Svetošimunska 25, HR-10000 Zagreb

<sup>2</sup> Matija Hrust, mag. ing. silv., Kralja Zvonimira 97, HR-34310, Pleternica

<sup>3</sup> Dr. sc. Ivan Seletković, Dr. sc. Nenad Potočić, Hrvatski šumarski institut, Cvjetno naselje 41, HR-10450, Jastrebarsko

Korespondencija: Krunoslav Sever, e-mail: ksever@sumfak.hr

## UVOD INTRODUCTION

Principi rada i konstrukcija prijenosnih optičkih klorofilmetara CCM-200 (Opti-Sciences, Tyngsboro, Massachusetts, USA) i SPAD-502 (Minolta Camera Co., Osaka, Japan) prilagođeni su jednostavnoj i brzom procjeni ukupnoga sadržaja klorofila u lišću biljaka (Cate i Perkins 2003; Van den Berg i Perkins 2004; Silla i dr. 2010). Uz to, spomenuti klorofilmetri do sada su mnogo puta opisani kao potencijalno korisni alati za procjenu ukupnog sadržaja i/ili koncentracije dušika (N) u lišću velikoga broja poljoprivrednih kultura (Wood i dr. 1992; Bullock i Anderson 1998; Rodriguez i Miller 2000; Jifon i dr. 2005; Rostami i dr. 2008) i nekoliko vrsta šumskoga drveća (Loh i dr. 2002; Chang i Robison 2003; Van den Berg i Perkins 2004; Percival i dr. 2008).

Da bi se klorofilmetar mogao uspješno koristiti u tu svrhu, nužno je konstruirati kalibracijske jednadžbe (regresijske jednadžbe) koje pouzdano opisuju odnos između indeksa relativnog sadržaja ukupnih klorofila u lišću (eng. *Chlorophyll Content Index* – CCI) očitana pomoću klorofilmetra i ukupne količine N u lišću, utvrđene nekom od standardnih laboratorijskih metoda (Loh i dr. 2002; Chang i Robison 2003; Van den Berg i Perkins 2004; Percival i dr. 2008). U tom slučaju, pozitivna korelacija između CCI očitavanja i ukupnoga N u lišću počiva na uskoj vezi između količine klorofila u lišću i N koji gradi proteine koji povezuju molekule klorofila s tilakoidnim membranama kloroplasta (Jifon i dr. 2005). Međutim, uz N koji gradi klorofilno-proteinske komplekse, ukupnu količinu N u lišću predstavlja i N koji gradi ostale strukturne i metaboličke komponente lišća (Yasumura i dr. 2006; Funk i dr. 2013). Unatoč tomu, u dosadašnjim istraživanjima regresijskom analizom dokazana je snažna veza između CCI-a i ukupnog sadržaja i/ili koncentracije N u lišću šumskoga drveća (Loh i dr. 2002.; Chang i Robison 2003; Van den Berg i Perkins 2004; Percival i dr. 2008). Na temelju toga, klorofilmetar se smatra potencijalno korisnim alatom za brzu, jednostavnu, jeftinu i nedestruktivnu procjenu ukupnoga sadržaja i/ili koncentracije N u lišću šumskoga drveća.

Hrast lužnjak pripada skupini šumskoga drveća koja ima vrlo izraženu sposobnost sukcesivne produkcije izbojaka s pripadajućim lišćem u više navrata tijekom vegetacijskoga razdoblja (Le Hir i dr. 2005; Spiess i dr. 2012; Kuster i dr. 2014). S obzirom na to, tijekom vegetacijskoga razdoblja u krošnji su često puta istovremeno zastupljeni različiti tipovi lišća s obzirom na vrijeme razvoja (proljeće ili ljeto), odnosno pripadnost pojedinom tipu izbojaka (lišće proljetnih izbojaka, lišće sekundarnih izbojaka, lišće tercijarnih izbojaka itd.). Kod vrsta iz roda *Quercus* lišće proljetnih i sekundarnih izbojaka može se značajno razlikovati u antomskoj građi i fiziološkim značajkama (Ueda i dr. 2009). S obzirom na način utvrđivanja ukupne koncentracije N u lišću pomoću

optičkog klorofilmetra upravo bi fiziološke značajke lišća mogle značajno utjecati na mogućnost njegove praktične primjene u svrhu procjene ishranjenosti hrasta lužnjaka s N.

Naime, šumsko listopadno drveće posjeduje vrlo učinkovit mehanizam unutrašnje translokacije N tijekom vegetacijskoga razdoblja (Yasumura i dr. 2002; Cantón i dr. 2005; Millard i Grelet 2010; Ueda i dr. 2011). Okidače koji pokreću proces translokacije N često puta predstavlja sukcesivna produkcija izbojaka tijekom vegetacijskoga razdoblja. Primjerice, tijekom vegetacijskoga razdoblja N se obično iz starijega lišća (razvijenoga u proljeće) premješta u mlađe izbojke s pripadajućim lišćem (Ueda i dr. 2009) koji se pod utjecajem povoljnih okolišnih prilika mogu pojaviti tijekom ljeta (Kozłowski i Pallardy 2008; Kuster i dr. 2014). Pritom fiziološki procesi translokacije ne utječu jednako na N ugrađen u svim komponentama lišća. Primjerice, N u klorofilno-proteinskim kompleksima koji je usko povezan sa CCI očitavanjima rezistentniji je na translokaciju nego N ugrađen u ostale metaboličke komponente lišća (Mae 2004). U skladu s tim možemo pretpostaviti da se odnos između CCI-a i ukupnog sadržaja N u lišću šumskoga drveća tijekom vegetacijskoga razdoblja mijenja ovisno o intenzitetu translokacije N koja ovisi o sukcesivnoj produkciji izbojaka. Stoga odnos CCI očitavanja s jedne strane i koncentracije ukupnoga N u lišću proljetnih i/ili sekundarnih izbojaka s druge strane može značajno varirati tijekom vegetacijskoga razdoblja.

Ovo istraživanje provedeno je na hrastu lužnjaku iz razloga što je on važna gospodarska vrsta šumskoga drveća koja tvori niz šumskih zajednica na čitavom području Europe (Maděra i dr. 2008). U skladu s tim, mnogo se napora ulaže u proizvodnju žira i sadnoga materijala neophodnoga za uspješnu obnovu lužnjakovih sastojina (Matić i dr. 2008). Prema Schmal i dr. (2011) ta proizvodnja usko je povezana s dušičnom gnojivom, jer upravo N predstavlja najvažniji makroelement koji regulira gotovo sve fiziološke procese o kojima ovisi rast i razvoj biljaka (Evans 1989.; Evans i Poorter 2001; Lawlor 2001; Cantón i dr. 2005; Han i dr. 2008).

S obzirom na sve navedeno, ciljevi ovoga rada su (1) utvrditi odnos između CCI-a i koncentracije N u lišću proljetnih i sekundarnih izbojaka s obzirom na vrijeme njihova uzorkovanja, (2) utvrditi da li se kalibracijske jednadžbe konstruirane na temelju lišća proljetnih i sekundarnih izbojaka uzorkovanoga u isto vrijeme međusobno razlikuju, (3) raspraviti mogućnost praktične primjene klorofilmetra CCM-200 u svrhu precizne procjene stanja ishrane hrasta lužnjaka s N.

## MATERIJALI I METODE MATERIALS AND METHODS

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

Istraživanje je provedeno tijekom dva vegetacijska razdoblja 2009. i 2010. godine na 30 vegetativno razmnoženih jedinki

hrasta lužnjaka uzgajanih na pokusnoj plohi osnovanoj u proljeće 2008. godine koja se nalazi u blizini Zagreba (45° 50' 20" N, 16° 06' 14" E; 128 m a. s. l.). Više podataka o načinu i razlozima osnivanja pokusne plohe donose Franjić i dr. (2011.) te Sever i dr. (2012.). U proljeće 2009. godine neposredno prije početaka istraživanja prosječna visina istraživanih biljaka iznosila je  $79,2 \pm 21,4$  cm.

#### Klima istraživanog područja – *Climate of study site*

Prema Köppen-ovoj klasifikaciji klime područje na kojemu je osnovana pokusna ploha pripada 'Cfwbx' tipu klime. To je umjereno topla, kišna klima bez izraženog sušnog razdoblja, a oborine su ravnomjerno raspoređene tijekom godine. Srednja temperatura najhladnijeg mjeseca (siječanj) ne spušta se ispod  $-0,4$  °C, dok srednja mjesečna temperatura najtoplijeg mjeseca ne prelazi  $21,4$  °C. Godišnja količina oborina iznosi 900 mm (489 mm u vegetacijskom razdoblju), dok srednja temperatura vegetacijskom razdoblju iznosi  $18,6$  °C (Seletković 1996).

#### Mineralna gnojidba i kemijske analize tla – *Plant fertilisation and soil chemical analysis*

Neposredno prije početka istraživanja (u rano proljeće 2009. godine) biljke su prihranjene kompleksnim mineralnim gnojivom NPK formulacije 15-15-15 u dozi od 200 g po biljci. Gnojivo je ravnomjerno raspoređeno oko svake biljke u radijusu od oko 70 cm i prekriveno zemljom. U 2010. godini prihrana biljaka nije obavljena. Tijekom listopada 2009. i 2010. godine (na kraju vegetacijskoga razdoblja) sakupljeni su uzorci tla za kemijske analize sa dubine od 0 – 30 cm. Jedan uzorak sastojao se od tri poduzorka koji su bili sakupljeni u koncentričnom rasporedu na 50 cm udaljenosti oko debla svake biljke. Reakcija tla u suspenziji s vodom određena je potenciometarski na pH-metru HACH EC 30. Humus je utvrđen metodom po Tjurin-u, a

ukupna koncentracija dušika i ugljika u tlu utvrđeni su na elementarnom analizatoru CNS-2000 (CNS-2000 Elemental Analyzer-Instruction Manual. LECO Corp., St. Joseph).

#### Vegetativni rast i meteorološke prilike – *Plant development and meteorological conditions*

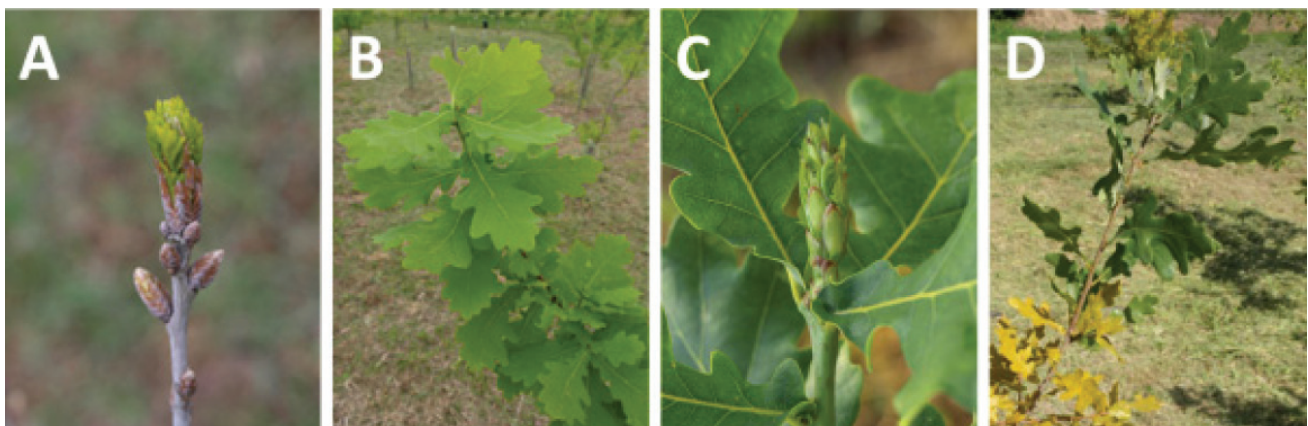
Vegetativni rast biljaka praćen je na temelju fenoloških motrenja (Slika 1) i prebrojavanja sekundarnih i tercijarnih izbojaka u krošnjama. To je obavljano jednom tjedno tijekom vegetacijskoga razdoblja. Svake godine biljkama je utvrđen visinski prirast. Za svaku je biljku na temelju odnosa između njezine visine (prije početka vegetacijskoga razdoblja) i broja sekundarnih, odnosno tercijarnih izbojaka tijekom vegetacijskoga razdoblja utvrđen indeks brojnosti izbojaka razvijenih tijekom sekundarnoga i tercijarnoga porasta.

Tijekom istraživanja, dnevna kretanja temperature zraka, količine oborina i volumetrijskoga sadržaja vlage u tlu (SWC) bilježena su pomoću automatske meteorološke postaje (Spectrum Technologies, inc. 2007.) instalirane na pokusnoj plohi.

#### Uzorkovanje lišća i konstrukcija kalibracijskih jednadžbi – *Leaf sampling and construction of calibration equations*

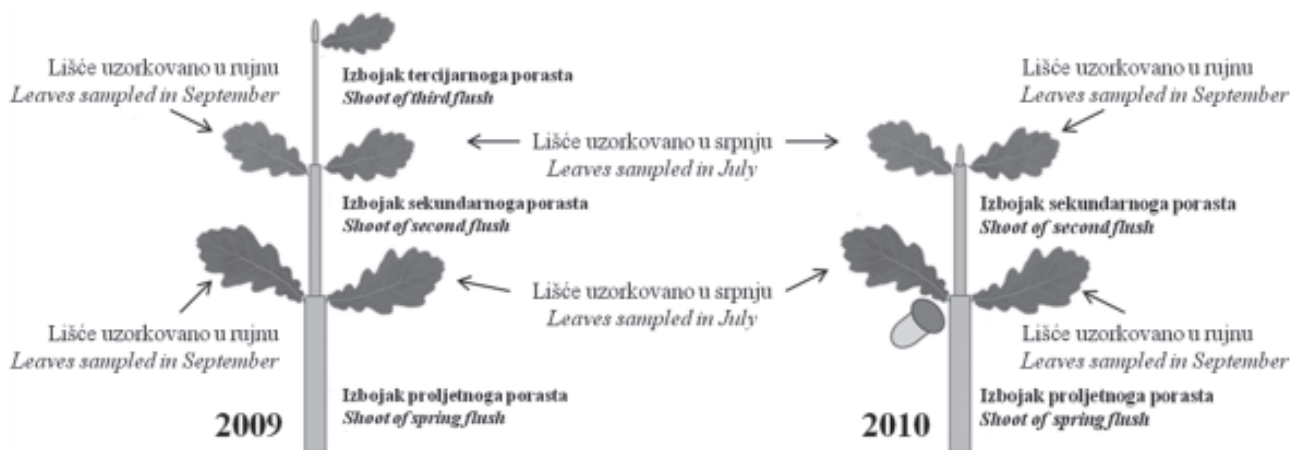
Za potrebe istraživanja birano je potpuno razvijeno i zdravo lišće (starije od 30 dana). Uzorkovanje lišća, što podrazumijeva mjerenje CCI-a i njegovo sakupljanje za potrebe laboratorijske obrade tj. utvrđivanja ukupne koncentracije N u suhoj tvari lišća, obavljani su istoga dana.

U obje godine uzorkovanje lišća obavljeno je na 30 istih biljaka. Lišće porijeklom s izbojaka razvijenih tijekom proljetnoga i sekundarnoga porasta uzorkovano je dva puta tijekom vegetacijskoga razdoblja, prvi puta u srpnju, a drugi puta u rujnu (Slika 2).



**Slika 1.** Fenofaze proljetnoga, sekundarnoga i tercijarnoga porasta izbojaka tijekom dva vegetacijska razdoblja (2009. i 2010. godine). A) Početak proljetnoga porasta, B) proljetni izbojci s pripadajućim lišćem su potpuno razvijeni, C) početak sekundarnoga/tercijarnoga porasta, D) sekundarni/tercijarni izbojci s pripadajućim lišćem su potpuno razvijeni.

**Figure 1** Phenological phases of spring, second and/or third flush in two growing seasons (2009 and 2010). A) start of a spring flush, B) spring shoot with accompanying leaves fully developed, C) start of second and/or third flush, D) second and/or third flush shoot with accompanying leaves fully developed.



**Slika 2.** Shematski prikaz razvoja i načina uzorkovanja lišća. U 2009. godini biljke su razvijale izbojke tri puta tijekom vegetacijskoga razdoblja: tijekom proljetnoga, sekundarnoga i tercijarnoga porasta. U 2010. godini biljke su razvijale izbojke dva puta tijekom vegetacijskoga razdoblja: tijekom proljetnoga i sekundarnoga porasta.

**Figure 2** Scheme of plant development and sampling method of leaves. In 2009 the plants produced shoots three times in growing season: during spring flush, second flush and third flush. In 2010 the plants produced shoots two times in growing season: during spring and second flush.

Na temelju tako uzorkovanoga lišća konstruirano je ukupno osam kalibracijskih jednadžbi ( $n = 30$ ) koje opisuju odnos između CCI-a i ukupne koncentracije N u lišću proljetnih i sekundarnih izbojaka uzorkovanoga u srpnju i rujnu 2009. i 2010. godine.

### Izmjera CCI-a i ukupne koncentracije dušika – *Measurements of CCI and leaf nitrogen concentration*

Izmjera CCI-a obavljena je pomoću prijenosnog optičkog klorofilmetra CCM-200 (Opti-sciences, Tyngsboro, Mass.). Princip rada i osnovne značajke samoga uređaja detaljno su opisali Cate i Perkins (2003.) te Silla i dr. (2010.). Na svakom uzorkovanom listu obavljeno je pet očitavanja CCI-a, čiji je prosjek predstavljao CCI uzorkovanog lista. Nakon toga, lišće je bilo sakupljeno i smješteno u prijenosni hladnjak na temperaturu zraka od 4 °C sve do dolaska u laboratorij. Sadržaj N u suhoj tvari lišća utvrđen je pojedinačno za svaki uzorkovani list metodom suhog spaljivanja pomoću CNS-2000 elementarnog analizatora (CNS-2000 Elemental Analyzer-Instruction Manual. LECO Corp., St. Joseph).

### Statistička analiza – *Statistical analysis*

Sve statističke analize provedene su pomoću softwaerskog paketa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Student-ov t-test proveden je s ciljem utvrđivanja razlika ( $p < 0,05$ ) između godina s obzirom na kemijske značajke tla i visinski prirast biljaka. Faktorijalna ANOVA provedena je s ciljem utvrđivanja utjecaja mjeseca uzorkovanja i tipa uzorkovanoga lišća na CCI i ukupnu koncentraciju N u lišću. Tukey-ev *post hoc* test proveden je s ciljem utvrđivanja

signifikantnih razlika ( $p < 0,05$ ) između mjeseca uzorkovanja i tipa uzorkovanoga lišća.

Regresijska analiza provedena je pomoću REG procedure u SAS/STAT 9.3 softwaerskom paketu (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Kalibracijske jednadžbe (linearne regresijske jednadžbe) konstruirane su na način da je CCI predstavljao nezavisnu varijablu, a ukupna koncentracija N u lišću zavisnu varijablu.

Analiza kovarijance (ANCOVA) provedena je pomoću JMP 9.0 softwaerskog paketa (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), uključujući analizu interakcije s ciljem ispitivanja homogenosti Y-odsječaka i nagiba pravaca kalibracijskih jednadžbi između različitih tipova uzorkovanoga lišća unutar istog vremena uzorkovanja.

## REZULTATI RESULTS

### Kemijske značajke tla – *Soil chemical preperities*

Unatoč gnojidbi tla u rano proljeće 2009. godine statistički značajna razlika između godina s obzirom na pH reakciju tla, koncentraciju humusa i koncentraciju dušika u tlu nije utvrđena. Tlo je kisele reakcije, koncentracija N u tlu tijekom istraživanja varirala je između 0,13 – 0,15 % što ukazuje na dobru opskrbljenost tla s ukupnim N. Odnos C/N u tlu bio je prilično uzak i stabilan (Tablica 1).

### Meteorološke prilike – *Meteorological conditions*

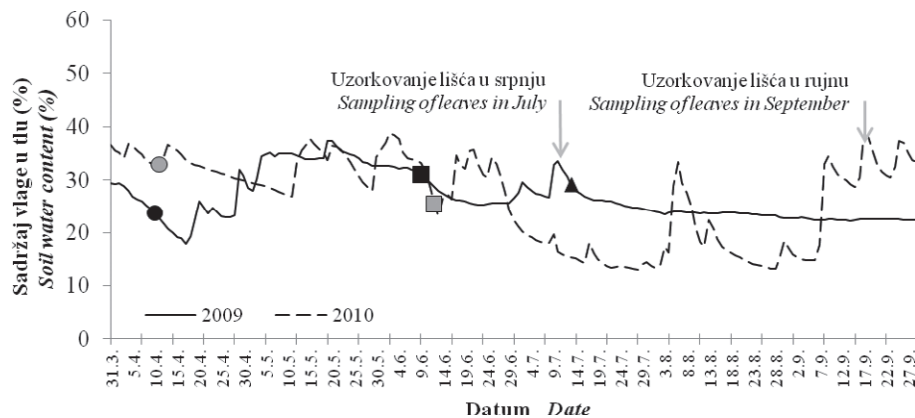
Tijekom vegetacijskoga razdoblja 2009. godine sadržaj vlage u tlu bio je prilično visok i nije se spuštao ispod 22 %. Isto je utvrđeno i tijekom prve polovice vegetacijskoga razdoblja

**Tablica 1.** Kemijske značajke tla (pH reakcija, koncentracija humusa i dušika te C/N odnos) u vegetacijskom razdoblju 2009. i 2010. godine.  
**Table 1** Soil chemical properties (pH reaction, humus and nitrogen concentrations, and C/N ratio) in the 2009 and 2010 growing seasons.

Godina Year	pH	Humus (%)	Dušik (%) Nitrogen (%)	C/N odnos C/N ratio	Gnojidba Fertilization
2009	5,54 ± 0,23 <sup>a</sup>	1,82 ± 0,56 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,07 <sup>a</sup>	12,2	+
2010	5,47 ± 0,24 <sup>a</sup>	1,83 ± 0,63 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,07 <sup>a</sup>	15,6	-

(+) godina s gnojidbenim tretmanom – year with fertilisation treatment / (–) godina bez gnojidbenog tretmana – year without fertilization treatment

Isto slovo ukazuje na nepostojanje signifikantne razlike između godina prema Student-ovom t-testu ( $p < 0,05$ ) – Same small letters indicate absence of significant differences between years given by Student t-test ( $p < 0.05$ )



**Slika 3.** Sadržaj vlage u tlu tijekom vegetacijskoga razdoblja 2009. i 2010. godine. Krugovi ukazuju na početak proljetnoga porasta u 2009. godini (crni krug) i 2010. godini (sivi krug). Kvadrati ukazuju na prosječni početak sekundarnoga porasta u 2009. godini (crni kvadrat) i 2010. godini (sivi kvadrat). Crni trokut ukazuje na prosječni početak tercijarnoga porasta 2009. godine.

**Figure 3.** Soil water content in 2009 and 2010 growing seasons. Circles indicate average start of spring flush in 2009 (black circle) and 2010 (grey circle). Squares indicate average start of second flush in 2009 (black square) and 2010 (grey square). Black triangle indicates average start of third flush in 2009.

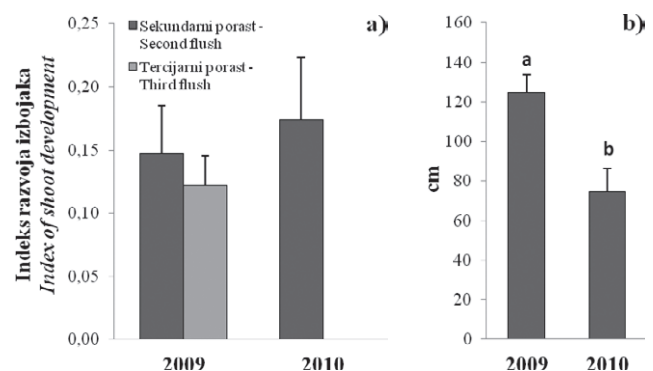
2010. godine. Međutim, u 2010. godini početkom srpnja sadržaj vlage u tlu naglo se spustio do 13 %, početkom kolovoza na kratko se oporavlja, a nakon toga ponovo pada (Slika 3).

Takva dinamika sadržaja vlage u tlu povezana je s ravnomjernom raspodjelom ukupne količine oborina tijekom vegetacijskoga razdoblja 2009. godine (356 mm), odnosno neravnomjernom raspodjelom oborina u 2010. godini (508 mm). Prosječne dnevne temperature zraka tijekom vegetacijskih razdoblja 2009. (18,8 °C) i 2010. (17,6 °C) godine bile su podjednake i nisu značajnije odstupale od 30-godišnjeg prosjeka (18,6 °C) za područje istraživanja.

### Vegetativni rast – Vegetative growth

Vegetativni rast istraživanih biljaka značajno se razlikovao između godina (Slika 4). Uz proljetni porast izbojaka u obje godine zabilježen je i njihov sekundarni porast. Međutim, tercijarni porast izbojaka zabilježen je samo 2009. godine (Slika 4a). U skladu s tim, biljke su imale veći visinski prirast 2009. nego 2010. godine. (Slika 4b). Proljetni porast izbojaka u obje godine započeo je početkom travnja, sekundarni sredinom lipnja, a tercijarni sredinom srpnja (Slika 3). Indeks razvoja izbojaka (prosječni odnos između visine biljaka na početku vegetacijskoga razdoblja i/ili tercijarnih

izbojaka razvijenih tijekom vegetacijskoga razdoblja) ukazuje na to da je 2009. godine tijekom sekundarnoga i tercijarnoga porasta razvijeno znatno više izbojaka nego 2010. godine kada je produkcija izbojaka tijekom tercijarnoga porasta u potpunosti izostala (Slika 4a).



**Slika 4.** Parametri koji opisuju razvoj biljaka u 2009. i 2010. godini. Indeks razvoja izbojaka (a) i prosječni visinski prirast biljaka (b). Različita slova ukazuju na signifikantne razlike ( $p < 0,05$ ) između godina. Vertikalne linije ukazuju na  $\pm$  S.E.

**Figure 4** Parameters, which describe trees development in 2009 and 2010. Index of shoot development (a) and mean height growth increment (b). Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between years. Vertical bars indicate  $\pm$  S.E.

**Tablica 2.** Utjecaj tipa lišća (lišće proljetnih i sekundarnih izbojaka) i mjeseca uzorkovanja (srpanj i rujn) u 2009. i 2010. godini na indeks ukupnog sadržaja klorofila (CCI) i koncentraciju dušika u lišću (N) što je potvrđeno pomoću faktorijalne ANOVA-e.

**Table 2** Effect of leaf flush type (spring and second flush leaves) and sampling month (July and September) in 2009 and 2010 on chlorophyll content index (CCI) and leaf nitrogen concentration (N) tested by factorial ANOVA.

Godina Year	Značajka lista Leaf trait	Tip lista Leaf flush type	Mjesec uzorkovanja Sampling month	Tip lista × Mjesec uzorkovanja Leaf flush type × Sampling month
2009	CCI	n.s.	n.s.	n.s.
	N	n.s.	***	**
2010	CCI	**	n.s.	n.s.
	N	***	n.s.	n.s.

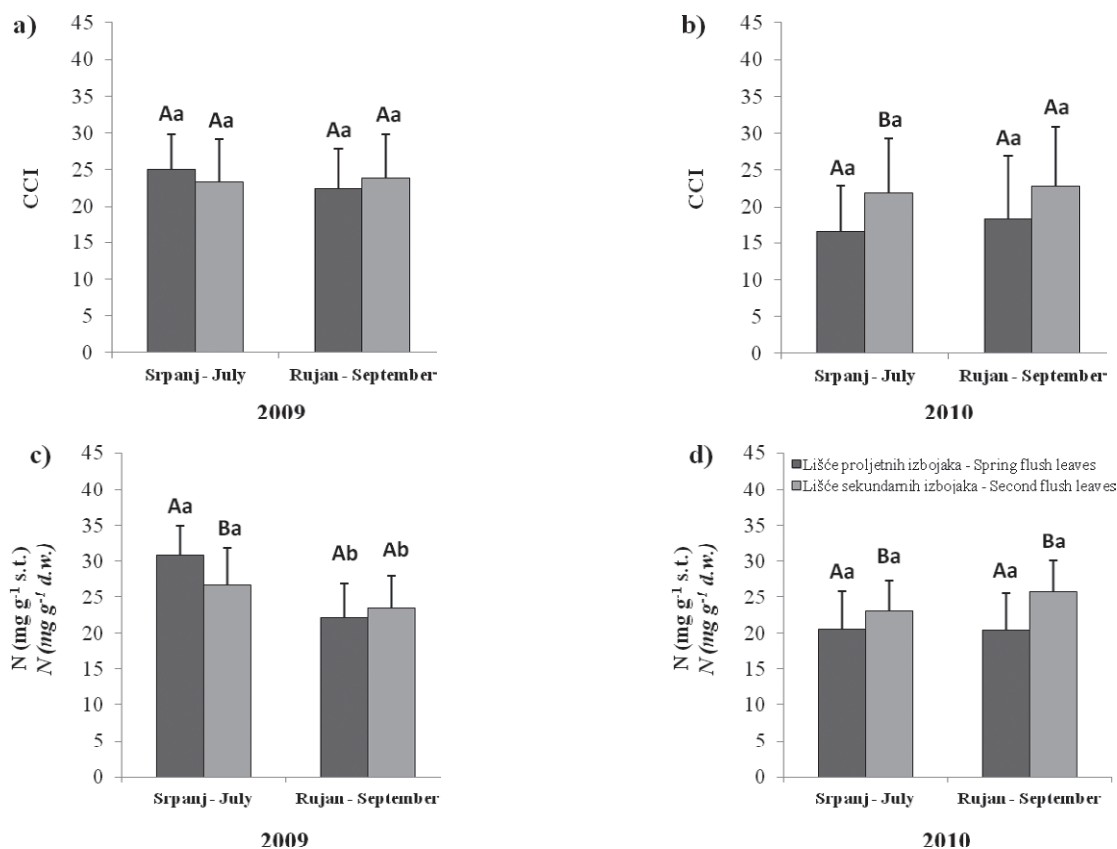
Razina signifikantnosti: \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; n.s., nije signifikantno

Level of significance: \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; n.s., not significant

### Utjecaj tipa lišća i mjeseca uzorkovanja na CCI i koncentraciju dušika – Effect of leaf flush type and sampling month on CCI and leaf nitrogen concentration

Tip lišća i mjesec uzorkovanja različito su utjecali na CCI i koncentraciju N u lišću 2009. i 2010. godine (Tablica 2). U 2009. godini pod signifikantnim utjecajem mjeseca uzorkovanja te interakcije tip lišća × mjesec uzorkovanja

bila je samo koncentracija N u lišću. U srpnju 2009. godine koncentracija N u lišću proljetnih izbojaka bila je signifikantno veća nego u lišću sekundarnih izbojaka, što u rujnu iste godine više nije bio slučaj. Osim toga, u razdoblju od srpnja do rujna 2009. godine došlo je do signifikantnog smanjenja koncentracije N u oba tipa lišća (Slika 5c). Za razliku od N, CCI nije bio signifikantno utjecan ni tipom lišća niti mjesecom uzorkovanja, što znači da je bio vrlo



**Slika 5.** Srednje vrijednosti indeksa ukupnoga sadržaja klorofila (CCI) i koncentracije dušika (N) tijekom vegetacijskoga razdoblja 2009. i 2010. godine u lišću proljetnih i sekundarnih izbojaka s obzirom na vrijeme uzorkovanja (srpanj i rujn). Različita velika slova ukazuju na signifikantne razlike ( $p < 0,05$ ) između lišća proljetnih i sekundarnih izbojaka unutar istog mjeseca, dok različita mala slova ukazuju na signifikantne razlike ( $p < 0,05$ ) između srpnja i rujna unutar istog tipa lišća. Vertikalne linije ukazuju na  $\pm$  S.D.

**Figure 5** Mean values of chlorophyll content index (CCI) and leaf nitrogen concentration (N) in 2009 and 2010 growing seasons for spring and second flush leaves regardless sampling time (July and September). Different capital letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between spring and second leaf flush type within the same sampling month, whilst different small letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between July and September within same leaf flush type. Vertical bars indicate  $\pm$  S.D.

**Tablica 3.** Kalibracijske jednadžbe konstruirane na temelju indeksa sadržaja ukupnih klorofila (CCI) i koncentracije dušika (N) u lišću proljetnih i sekundarnih izbojaka uzorkovanih u srpnju i rujnu 2009. i 2010. godine. Jednadžbe pretvaraju indeks sadržaja ukupnih klorofila (CCI) u procijenjenu koncentraciju ukupnoga dušika u lišću (N).

**Table 3** Calibration equations constructed based on chlorophyll content index (CCI) and leaf nitrogen concentration (N) in spring and second flush leaves sampled in July and September 2009 and 2010. The equations convert the chlorophyll content index (CCI) into the estimated leaf nitrogen concentration (N).

Mjesec i godina uzorkovanja Sampling month and year	Tip lišća Leaf flush type	n	Kalibracijske jednadžbe Calibration equations	r <sup>2</sup>	p	N (mg g <sup>-1</sup> ) (min-max)
Srpanj 2009 July 2009	Lišće proljetnih izbojaka Spring flush leaves	30	$N \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = 17,28 + 0,52 \times \text{CCI}$	0,384	< 0,00026	22,5 – 38,0
	Lišće sekundarnih izbojaka Second flush leaves	30	$N \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = 12,75 + 0,72 \times \text{CCI}$	0,681	< 0,00000	17,5 – 40,0
Rujan 2009 September 2009	Lišće proljetnih izbojaka Spring flush leaves	30	$N \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = 9,60 + 0,58 \times \text{CCI}$	0,430	< 0,00009	13,2 – 30,0
	Lišće sekundarnih izbojaka Second flush leaves	30	$N \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = 8,74 + 0,61 \times \text{CCI}$	0,640	< 0,00000	15,9 – 31,7
Srpanj 2010 July 2010	Lišće proljetnih izbojaka Spring flush leaves	30	$N \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = 8,87 + 0,70 \times \text{CCI}$	0,707	< 0,00000	12,4 – 31,9
	Lišće sekundarnih izbojaka Second flush leaves	30	$N \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = 14,18 + 0,47 \times \text{CCI}$	0,435	< 0,00007	15,2 – 34,6
Rujan 2010 September 2010	Lišće proljetnih izbojaka Spring flush leaves	30	$N \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = 10,27 + 0,56 \times \text{CCI}$	0,870	< 0,00000	9,6 – 31,5
	Lišće sekundarnih izbojaka Second flush leaves	30	$N \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = 16,26 + 0,41 \times \text{CCI}$	0,594	< 0,00000	14,6 – 33,3

stabilan u razdoblju od srpnja do rujna 2009. godine u oba tipa lišća (Slika 5a).

U 2010. godini na CCI i koncentraciju N u lišću signifikantno je utjecao samo tip lišća (Tablica 2). Prema tomu, u 2010. godini CCI i LNC bili su uglavnom signifikantno niži u lišću proljetnih izbojaka nego u lišću sekundarnih izbojaka. U razdoblju od srpnja do rujna 2010. godine nije došlo do značajnijih promjena CCI-a i koncentracije N u lišću proljetnoga i sekundarnoga porasta (Slika 5b i d).

#### Odnos između CCI-a i koncentracije dušika u lišću – *Relationship between CCI and leaf nitrogen concentration*

Snažna veza ( $p < 0,001$ ) između CCI-a i ukupne koncentracije N utvrđena je kod svih tipova uzorkovanoga lišća

(Tablica 3). Koeficijenti determinacije ( $r^2$ ) prilično su visoki, izuzev kod lišća proljetnih izbojaka uzorkovanoga u srpnju ( $r^2 = 0,384$ ) i rujnu ( $r^2 = 0,430$ ) 2009. godine te kod lišća sekundarnih izbojaka uzorkovanoga u srpnju 2010. godine ( $r^2 = 0,435$ ).

#### Utjecaj tipa lišća na parametre kalibracijskih jednadžbi – *Effect of leaf flush type on calibration equation parameters*

Prema rezultatima ANCOVA-e, nagibi pravaca međusobno uspoređenih kalibracijskih jednadžbi nisu bili signifikantno utjecani tipom lišća. Međutim, isti rezultat nije utvrđen za Y-odsječke koji su bili signifikantno utjecani tipom lišća prilikom njihova uzorkovanja u srpnju 2009. godine te u srpnju i rujnu 2010. godine.

**Tablica 4.** Signifikantne vrijednosti ( $p$ ) dobivene pomoću ANCOVA-e koje ukazuju na razlike u Y-odsječcima i nagibima kalibracijskih jednadžbi konstruiranih za različite tipove lišća (lišće proljetnih i sekundarnih izbojaka) u različito vrijeme uzorkovanja (srpanj i rujan 2009. godine te srpanj i rujan 2010. godine).

**Table 4** ANCOVA significance values ( $p$ ) for differences in the Y intercept and slope of the equation constructed for different leaf flush type (spring flush leaves and second flush leaves) at different sampling time (July 2009 and 2010; September 2009 and 2010)

Mjesec i godina uzorkovanja Sampling month and year	Efekt tipa lista Effect of leaf flush type	Efekt CCI Effect of CCI	Tip lista × CCI Leaf flush type × CCI
Srpanj 2009 July 2009	< 0,001	< 0,0001	0,1935
Rujan 2009 September 2009	0,1995	< 0,0001	0,8478
Srpanj 2010 July 2010	< 0,0001	< 0,0001	0,0862
Rujan 2010 September 2010	< 0,0001	< 0,0001	0,0690

$n = 30$  uzorkovanih listova po svakom tipu lišća – 30 sampled leaves per each leaf-flush type

Signifikantna interakcija tip lista × CCI ukazuje na razlike u nagibu pravaca – A significant interaction leaf flush type × CCI indicates differences in slope

Vrijednosti u kurzivu ukazuju na signifikantan utjecaj;  $p < 0,05$  – Values in italics indicate significant effects;  $p < 0,05$

## RASPRAVA DISCUSSION

Ovo istraživanje provedeno je u pokusnom nasadu s ciljem da se istraživane biljke izlože što realnijem utjecaju različitih vanjskih čimbenika koji od godine do godine, kao i unutar vegetacijskoga razdoblja, mogu značajno varirati, a kojima su biljke inače izložene u šumskim nasadima (npr. rasadnicima i/ili klonskim sjemenskim plantažama). Stoga je u rano proljeće 2009. godine na samom početku istraživanja provedena mineralna gnojidba istraživanih biljaka, koja je neizostavni dio rasadničke proizvodnje i jedan od glavnih pomotehničkih zahvata u šumskim nasadima (Schmal i dr. 2011.). U skladu s tim, rezultati ovoga istraživanja trebali bi na realan način predstaviti mogućnost praktične primjene klorofilmetra CCM-200 u svrhu procjene ukupne koncentracije N u lišću hrasta lužnjaka.

### Gnojidbeni tretman, meteorološke prilike i vegetativni rast biljaka – *Fertilisation treatment, meteorological conditions and plant vegetative growth*

Unatoč mineralnoj gnojidbi provedenoj u rano proljeće 2009. godine koncentracija N u tlu nije se značajno razlikovala između 2009. i 2010. godine (Tablica 1). Takav rezultat nije iznenađujuć s obzirom na brzinu ispiranja umjetno dodanoga N u dublje slojeve tla (Vukadinović i Vukadinović 2010.) i/ili njegovo brzo usvajanje od strane biljaka (El Zein i dr. 2011). Prema Škoriću (1965.) tla s koncentracijom N u rasponu 0,1 – 0,2 % dobro su opskrbljena s N. U skladu s tim, tlo pokusne plohe tijekom istraživanja bilo je dobro opskrbljeno s N. Uz to, pH reakcija tla koja iznosi 5,5 – 5,6 vrlo je povoljna za usvajanje N od strane vrsta iz roda *Quercus* (Williston i LaFayette 1978.). S obzirom na uzak i prilično stabilan C:N odnos u tlu, mikrobiološka aktivnost (razlaganje organske tvari u tlu) vjerojatno nije ograničavala usvajanje N od strane biljaka (Kuster i dr. 2013.). Zahvaljujući povoljnim kemijskim značajkama tla, ishranjenost biljaka s N tijekom istraživanja bila je zadovoljavajuća. To potvrđuje koncentracija N u lišću proljetnih i sekundarnih izbojaka koja se tijekom istraživanja nije spuštala ispod 20 mg g<sup>-1</sup> s.t. (Slika 5c i d). Prema Bergmann (1993) koncentracija N u lišću hrasta lužnjaka od 20 mg g<sup>-1</sup> s.t. ukazuje na njegovu zadovoljavajuću ishranjenost s N. Ukupno gledano, lišće proljetnih izbojaka uzorkovano u srpnju 2009. godine imalo je znatno veću koncentraciju N nego 2010. godine koja se već do rujna 2009. godine značajno smanjila (Slika 5c i d). To ukazuje na postupno slabljenje utjecaja jednokratne mineralne gnojidbe provedene u rano proljeće 2009. godine na ishranjenost hrasta lužnjaka s N, kako u razdoblju od srpnja do rujna 2009. godine, tako i u razdoblju od 2009. do 2010. godine.

Nakon razvoja proljetnih izbojaka u 2009. godini, vjerojatno pod utjecajem vrlo dobre ishranjenosti s N i visokog

sadržaja vlage u tlu, biljke su razvijale izbojke još u dva navrata, tijekom sekundarnoga i tercijarnoga porasta (Slika 4a). To je glavni razlog zbog kojega su biljke imale bujniji vegetativni rast 2009. u odnosu na 2010. godinu (Slika 4a i b). Produkcija sekundarnih izbojaka u 2010. godini također je mogla biti potaknuta zadovoljavajućom ishranjenošću biljaka s N (Slika 5c i d) i visokim sadržajem vlage u tlu (Slika 3). Međutim, produkcija tercijarnih izbojaka u 2010. godini u potpunosti je izostala (Slika 4a). Prema Spiess i dr. (2012.) takav rezultat mogao bi ukazivati da je prilično nizak sadržaj vlage u tlu (oko 13 %) tijekom srpnja i kolovoza 2010. godine (Slika 3) spriječio produkciju tercijarnih izbojaka. U konačnici, ovakav rezultat je u skladu s rezultatima ranijih istraživanja prema kojima zadovoljavajuća ishranjenost hrasta lužnjaka s N i povoljne meteorološke prilike potiču produkciju sekundarnih i/ili tercijarnih izbojaka (Spiess i dr. 2012.; Kuster i dr. 2014.).

### Odnos između CCI-a i ukupne koncentracije dušika u lišću – *Relations between CCI and leaf nitrogen concentration*

S ciljem da se veza između CCI-a očitana pomoću klorofilmetra i laboratorijski utvrđene koncentracije ukupnoga N pravilno interpretira, nužno je raspraviti raspodjelu ukupnoga N unutar lišća i sposobnost njegove translokacije u krošnjama listopadnoga drveća tijekom vegetacijskoga razdoblja. Prema Yasumura i dr. (2006.) N je u listu raspodijeljen na nekoliko razina između strukturnih i metaboličkih komponenti. U strukturnim komponentama lišća N je ugrađen u plazmatske membrane i stanične stijenke. Taj N ujedno predstavlja i stabilnu frakciju N u lišću koja se tijekom vegetacijskoga razdoblja značajnije ne mijenja (Ueda i dr. 2011.). Metabolički N raspoređen je između nefotosintetskih (aminokiseline, nukleinske kiseline, obrambene sekundarne tvari i anorganski N) i fotosintetskih komponenti. Unutar fotosintetskih komponenti N je raspoređen između klorofilno-proteinskih kompleksa (komponente zadužene za sakupljanje svjetlosti) s jedne strane i enzima Calvinova ciklusa te spojeva koji sudjeluju u prijenosu elektrona i upotrebi svjetlosne energije za fiksaciju CO<sub>2</sub> (komponenti zaduženih za upotrebu sakupljene svjetlosti) s druge strane (Yasumura i dr. 2006.). S obzirom na takvu raspodjelu N unutar lišća i princip rada klorofilmetra CCM-200 (Cate i Perkins 2003.; Silla i dr. 2010.), jasno je da su CCI očitavanja u uskoj vezi samo sa N koji gradi klorofilno-proteinske komplekse (proteine pomoću kojih su molekule klorofila povezane s tilakoidnim membranama). Uz to, N koji gradi klorofilno-proteinske komplekse znatno je stabilniji tijekom vegetacijskoga razdoblja (Hikosaka 2003.; Mae 2004.) nego N ugrađen u ostale metaboličke komponente lišća (Hörtensteiner i Feller 2002; Yasumura i dr. 2005.; Funk i dr. 2013.). U prilog navedenome ide i to da se klorofilno-proteinski kompleksi kod listopadnog drveća najintenzivnije



razlažu na jednostavnije spojeve sposobne za translokaciju tek krajem listopada, pred sam kraj vegetacijskoga razdoblja (Pevalek-Kozlina 2003.).

U obje godine od srpnja do rujna (promatrano za svaki tip lišća posebno) CCI očitavanja (koja predstavljaju N ugrađen u klorofilno-proteinskim kompleksima) nisu se značajnije mijenjale (Slika 5a i b), odnosno bila su stabilnija nego ukupna koncentracija N (Slika 5c i d) koja predstavlja obje frakcije N u lišću (stabilnu i mobilnu) istovremeno.

Unatoč tomu što su CCI očitavanja usko povezana samo s N koji gradi klorofilno-proteinske komplekse, u dosadašnjim istraživanjima koja su provedena na listopadnim drvenastim vrstama regresijskom analizom dokazana je snažna povezanost između CCI-a i ukupne koncentracije N u lišću (Chang i Robison 2003.; Van den Berg i Perkins 2004.; Percival i dr. 2008.; Salifu i dr. 2008.; Ghasemi i dr. 2011.). U skladu s tim i ovaj rezultat ukazuje na snažnu vezu ( $p < 0,001$ ) između CCI-a i ukupne koncentracije N u lišću hrasta lužnjaka (Tablica 3). Prema dobivenim koeficijentima determinacije ( $r^2$ ) pomoću CCI-a kao nezavisne varijable moguće je objasniti 38 – 87 % varijabilnosti ukupne koncentracije N u lišću proljetnih i sekundarnih izbojaka (Tablica 3). To je u skladu s rezultatima ranijih istraživanja provedenima na hrastu lužnjaku ( $r^2 = 0,85$ ), gorskom javorju ( $r^2 = 0,86$ ) i običnoj bukvi ( $r^2 = 0,92$ ), (Percival i dr. 2008.), topoli ( $r^2 = 0,32$ ), likvidamburu ( $r^2 = 0,37$ ), platani ( $r^2 = 0,57$ ), pensilvanskom jasenu ( $r^2 = 0,72$ ), (Chang i Robison 2003.), crvenom hrastu ( $r^2 = 0,72$ ), (Salifu i dr. 2008.) i kruški ( $r^2 = 0,77$ ), (Ghasemi i dr. 2011.).

### Utjecaj tipa lišća na nagibe i Y-odsječke kalibracijskih jednadžbi – *Influence of leaf flush type on slopes and Y intercepts of calibration equations*

Nagibi pravaca kalibracijskih jednadžbi koje opisuju odnos između CCI očitavanja i ukupne koncentracije N nisu bili značajno utjecani različitim tipom lišća s obzirom na promatrano vrijeme uzorkovanja (srpanj i rujna 2009. i 2010. godine), što je vidljivo iz tablice 4. Takav rezultat ukazuje na to da su promjene ukupne koncentracije N i CCI očitavanja u lišću proljetnih i sekundarnih izbojaka u obje godine bile prilično usklađene. Međutim, takav rezultat nije potvrđen i za Y-odsječke. Značajan utjecaj tipa lišća na Y-odsječke nije utvrđen samo prilikom konstruiranja kalibracijskih jednadžbi na temelju lišća uzorkovanoga u rujnu 2009. godine (Tablica 4). Stoga mogućnost primjene iste kalibracijske jednadžbe koja bi pouzdano opisivala odnos između CCI-a i koncentracije ukupnoga N u lišću proljetnih i sekundarnih izbojaka u najvećoj mjeri ograničava varijabilnost Y-odsječaka.

Prema Chang i Robison (2003.) varijabilnost Y-odsječaka izravno ovisi o koncentraciji ukupnoga N u lišću na temelju kojega se jednadžbe konstruiraju, što ovisi o velikom broju

unutarnjih i vanjskih čimbenika (Campbell i dr. 1990.). U skladu s tim, Y-odsječki kalibracijskih jednadžbi konstruiranih na temelju različitih tipova lišća (lišće proljetnih i sekundarnih izbojaka uzorkovano u rujnu 2009. godine) s podjednakom koncentracijom N nisu bili značajno različiti (Tablica 4 i Slika 5c). U ostalim slučajevima, kada su kalibracijske jednadžbe bile konstruirane na temelju različitih tipova lišća s različitom koncentracijom N (lišće proljetnih i sekundarnih izbojaka uzorkovano u srpnju 2009. te u srpnju i rujnu 2010. godine) utvrđeni su značajno različiti Y-odsječki (Tablica 4 i Slika 5c i d).

Dobiveni rezultat vjerojatno je uzrokovan različitim koncentracijama N u lišću proljetnih i sekundarnih izbojaka, što je posljedica specifične translokacije N tijekom vegetacijskoga razdoblja u krošnjama istraživanih biljaka. Gnojidbeni tretman i meteorološke prilike (vanjski čimbenici) koji su utjecali na produkciju izbojaka (unutrašnji čimbenici) tijekom sekundarnoga i tercijarnoga porasta u najvećoj bi mjeri mogli biti odgovorni za različite koncentracije N u promatranim tipovima lišća uzorkovanim u isto vrijeme tijekom vegetacijskoga razdoblja 2009. i 2010. godine. Specifično variranje ukupne koncentracije N u istom tipu lišća tijekom vegetacijskih razdoblja također je moglo biti potaknuto istim čimbenicima. To se može objasniti tako, što je u srpnju 2009. godine koncentracija N u lišću proljetnih izbojaka bila značajno veća nego u lišću sekundarnih izbojaka. Međutim, u rujnu je koncentracija N u oba tipa lišća bila podjednaka (Slika 5b). Prema svemu sudeći, to je posljedica translokacije N iz lišća proljetnih i sekundarnih izbojaka prema izbojcima razvijenim tijekom tercijarnoga porasta, što je u razdoblju od srpnja do rujna rezultiralo izjednačenjem koncentracije N u oba tipa lišća. Međutim, u razdoblju od srpnja do rujna 2010. godine koncentracija N u lišću proljetnih i sekundarnih izbojaka nije se značajnije mijenjala (Slika 5b), vjerojatno zbog izostanka produkcije tercijarnih izbojaka u 2010. godini (Slika 4a). Ta pretpostavka jako se dobro slaže s rezultatima ranijih istraživanja prema kojima translokaciju N u krošnjama listopadnoga drveća tijekom vegetacijskoga razdoblja kontrolira produkcija izbojaka tijekom sekundarnoga i/ili tercijarnoga porasta (Ueda i dr. 2009. i 2011.) što ujedno predstavlja i glavna mjesta alokacije N porijeklom iz starijeg lišća u krošnji. U skladu s tim, značajan utjecaj tipa lišća na Y-odsječke kalibracijskih jednadžbi izostao je samo u rujnu 2009. godine prilikom njihove konstrukcije na temelju lišća s podjednakom koncentracijom N (Tablica 4).

## ZAKLJUČCI CONCLUSIONS

Ranija istraživanja na temelju kojih se klorofilmetar spominje kao prikladan alat pomoću kojega je moguće na brz, jednostavan, jeftin i nedestruktivan način uspješno proci-

jeniti ishranjenost šumskoga drveća s N, provedena su tijekom samo jednoga vegetacijskoga razdoblja. U skladu s tim, njihovi rezultati zapravo dokazuju samo to da je na temelju CCI-a izmjenjenoga pomoću klorofilmetra moguće uspješno procijeniti ukupnu koncentraciju N u lišću. To je potvrđeno prilično snažnom i statistički signifikantnom povezanošću CCI-a i ukupne koncentracije N u lišću.

Međutim, rezultati ovoga istraživanja provedenoga tijekom dva vegetacijska razdoblja, uzevši u obzir različite tipove lišća koji su tijekom vegetacijskoga razdoblja često puta zastupljeni u krošnji, dovode u pitanje brzu, jednostavnu, jeftinu i nedestruktivnu procjenu ishranjenosti hrasta lužnjaka s N pomoću klorofilmetra. Naime, dinamika N u različitim tipovima lišća pod utjecajem produkcije tercijarnih izbojaka potaknute mineralnom gnojivom i povoljnim meteorološkim prilikama može se značajno razlikovati od godine do godine, odnosno od mjeseca do mjeseca tijekom vegetacijskoga razdoblja. To ne utječe značajno na povezanost CCI-a i koncentracije ukupnoga N u lišću. Međutim, značajno utječe na parametre kalibracijskih jednadžbi (posebno Y-odječke), što uglavnom onemogućuje da jednom konstruiranu kalibracijsku jednadžbu istovremeno koristimo za procjenu ukupnoga N u različitim tipovima lišća.

## LITERATURA REFERENCES

- Bergmann, W., 1993: Ernährungsstörungen bei Kulturpflanzen. Entstehung, visuelle und analytische Diagnose. Gustav Fischer Verlag Jena, pp 1-835.
- Bullock, D.G., D. S. Anderson, 1998: Evaluation of the Minolta SPAD-502 chlorophyll meter for nitrogen management in corn. *J Plant Nutr* 21(4):741–755.
- Campbell, R.J., K.N. Mobley, R.P. Marini, D.G. Pfeiffer, 1990: Growing conditions alter the relationships between SPAD-501 values and apple leaf chlorophyll. *Hortscience* 25:330–331.
- Cantón, F.R., M. F. Suárez, F. M. Cánovas, 2005: Molecular aspects of nitrogen mobilization and recycling in trees. *Photosynth Res* 83:265–278.
- Cate, T.M., T. D. Perkins, 2003: Chlorophyll content monitoring in sugar maple (*Acer saccharum*). *Tree Physiol* 23:1077–1079.
- Chang, S. X., D. J. Robison, 2003: nondestructive and rapid estimation of hardwood foliar nitrogen status using the SPAD-502 chlorophyll meter. *For Ecol Manage* 181:337–338.
- El Zein, R., N. Bréda, D. Gérant, B. Zeller, P. Millard, 2011: Nitrogen sources for current-year shoot growth in 50-year-old sessile oak trees: an in situ <sup>15</sup>N labeling approach. *Tree Physiol* 31:1390–1400.
- Evans, J. R., 1989: Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves C3 plants. *Oecologia* 78:9–19.
- Evans, J. R., H. Poorter, 2001: Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. *Plant Cell Environ* 24:755–767.
- Franjić, J., K. Sever, S. Bogdan, Ž. Škvorc, D. Krstonošić, I. Alešković, 2011: Fenološka neujednačenost kao ograničavajući čimbenik uspješnoga oprašivanja u klonskim sjemenskim plantažama hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.). *Croat J For Eng* 32:141–156.
- Funk, J. L., L. A. Glenwinkel, L. Sack, 2013: Differential allocation to photosynthetic and non photosynthetic nitrogen fractions among native and invasive species. *PLoS ONE* 8(5):e64502. doi:10.1371/journal.pone.0064502.
- Ghasemi, M., K. Arzani, A. Yadollahi, S. Ghasemi, S. Sarikhani Khoorrami, 2011: Estimate of leaf chlorophyll and nitrogen content in Asian Pear (*Pyrus serptina* Rehd.) by CCM-200. *Not Sci Biol* 3(1):91–94.
- Han, Q., D. Kabeya, A. Iio, Y. Kakubari, 2008: Mastings in *Fagus crenata* and its influence on the nitrogen content and dry mass of winter buds. *Tree Physiol* 28:1269–1276.
- Hikosaka, K., 2003: A model of dynamics of leaves and nitrogen in a plant canopy: an integration of canopy photosynthesis, leaf life span, and nitrogen use efficiency. *Am Nat* 162:149–164.
- Hörtensteiner, S., U. Feller, 2002: Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J Exp Bot*, 53: 927–937.
- 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. *J Amer Soc Hort Sci* 130:152–158.
- Kozłowski, T.T., S. G. Pallardy, 2008: Physiology of Woody Plants, 3rd edn. Academic Press, San Diego, CA, USA pp 411.
- Kuster, T. M., M. Arend, M. S. Günthardt-Goerg, R. Schulin, 2013: Root growth of different oak provenances in two soils under drought stress and air warming conditions. *Plant Soil* 369:61–71.
- Kuster, T. M., M. Dobbertin, M. S. Günthardt-Goerg, M. Schaub, M. Arend, 2014: A phenological timetable of Oak growth under experimental drought and air warming. *PLoS ONE* 9(2):e89724. doi:10.1371/journal.pone.0089724.
- Lawlor, D. W., 2001: Photosynthesis. 3<sup>rd</sup> Edition. Scientific Publishers Limited, Oxford, U.K.
- Le Hir, R., S. Pelleschi-Traverien, J. D. Viemont, N. Leduc, 2005: Source synthase expression pattern in the rhythmically growing shoot of common oak (*Quercus robur* L.). *Ann For Sci* 62:585–591.
- Loh, F. C. W., J. C. Grabosky, N. L. Bassuk, 2002: Using the SPAD 502 meter to assess chlorophyll and nitrogen content of benjamin fig and cottonwood leaves. *Hort Technology* 12:682–686.
- Maděra, P., J. Vukelić, D. Baričević, 2008: Floodplain forest plant communities In: Klimo E (ed) Floodplain forests of the temperate zone of Europe. Lesnická práce: Kostelec and Černými lesy, pp 102–159.
- Mae, T., 2004: Leaf senescence and nitrogen metabolism. In: Noodén LD (ed) Plant Cell Death Processes. Elsevier Academic Press, pp 157–168.
- Matić, S., I. Anić, M. Oršanić, 2008: Forest management in floodplain forests. In: Klimo E (ed) Floodplain forests of the temperate zone of Europe. Lesnická práce: Kostelec and Černými lesy, pp 231–283.
- Millard, P., G. A. Grelet, 2010: Nitrogen storage and remobilisation by trees: ecophysiological relevance in a changing world. *Tree Physiol* 30:1083–1095.

- 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 and Urban Forestry* 34:89–100.
- Pevalek-Kozlina, B., 2003: Fiziologija bilja, Profil, Zagreb, pp 568.
- Rodriguez, I. R., G. L. Miller, 2000: Using a chlorophyll meter to determine the chlorophyll concentration, nitrogen concentration, and visual quality of St. Augustinegrass. *HortScience* 35(4):751–754.
- Rostami, M., A. R. Koocheki, M. Nasiri Mahallati, M. Kafi, 2008: Evaluation of chlorophyll meter (SPAD) data for prediction of nitrogen status in corn (*Zea mays* L.). *American-Eurasian J Agric and Environ Sci.* 3(1):79–85.
- Salifu, K. F., K. G. Apostol, D. F. Jacobs, M. A. Islam, 2008: Growth, physiology, and nutrient retranslocation in nitrogen-15 fertilized *Quercus rubra* seedlings. *Ann For Sci* 65:100–109.
- Schmal, J. L., D. F. Jacobs, C. O'Reilly, 2011: Nitrogen budgeting and quality of exponentially fertilized *Quercus robur* seedlings in Ireland. *Eur J For Res.* 130: 557–567.
- Seletković, Z., 1996: Klima lužnjakovih šuma. In: Klepac D (ed) *Hrast lužnjak (Quercus robur L.) u Hrvatskoj*, HAZU, Centar za znanstveni rad u Vinkovcima i Hrvatske šume, Zagreb-Vinkovci, pp 71–82.
- Sever, K., Ž. Škvorc, S. Bogdan, J. Franjić, D. Krstonošić, I. Alešković, S. Kereša, G. Fruk, T. Jemrić, 2012: In vitro pollen germination and pollen tube growth differences among *Quercus robur* L. clones in response to meteorological conditions, *Grana* 51(1):25–34.
- 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. *Ann For sci* 67:108. doi: 10.1051/forest/2009093.
- Spiess, N., M. Oufir, I. Matusikova, M. Stierschneider, D. Kopecky, 2012: Ecophysiological and transcriptomic responses of oak (*Quercus robur*) to long-term drought exposure and rewatering. *Environ Exp Bot* 77:117–126.
- Škorić, A., 1965: Pedološki praktikum, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, pp 51.
- Ueda, M. U., E. Mizumachi, N. Tokuchi, 2009: Allocation of nitrogen within the crown during leaf expansion in *Quercus serrata* saplings. *Tree Physiol* 10:1–7.
- Ueda, M. U., E. Mizumachi, N. Tokuchi, 2011: Foliage nitrogen turnover: differences among nitrogen absorbed at different times by *Quercus serrata* saplings. *Ann Bot-London* 108:169–175.
- Ueda, M. U., 2012: Gross nitrogen retranslocation with a canopy of *Quercus serrata* saplings. *Tree Physiol* 32:859–866.
- 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. *For Ecol Manage* 200:113–117.
- Vukadinović, V., V. Vukadinović, 2010: Ishrana bilja, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek, pp 442.
- Williston, H.L., R. LaFayette, 1978: Species suitability and pH of soils in southern forests. USDA Forest Service. Southeastern Area, state and Private Forestry. *Forest Management Bulletin*, pp 4.
- Wood, C. W., P. W. Tracy, D. W. Reeves, K. L. Edmisten, 1992: Determination of cotton nitrogen status with a hand-held chlorophyll meter. *J Plant Nutr* 15:1435–1448.
- Yasumura, Y., K. Hikosaka, K. Matsui, T. Hirose, 2002: Leaf-level nitrogen use efficiency of canopy and understorey species in a beech forest. *Funct Ecol* 16:826–834.
- Yasumura, Y., Y. Onoda, K. Hikosaka, T. Hirose, 2005: Nitrogen resorption from leaves under different growth irradiance in three deciduous woody species. *Plant Ecol* 178:29–37.
- Yasumura, Y., K. Hikosaka, T. Hirose, 2006: Seasonal changes in photosynthesis, nitrogen content and nitrogen partitioning in *Lindera umbellata* leaves grown in high or low irradiance. *Tree Physiol* 26:1315–1323.

## SUMMARY

In this paper we investigated potential of portable chlorophyll meter CCM-200 (Opti-Sciences, Tyngsboro, MA, USA) to estimate total nitrogen concentration in different types of Pedunculate oak leaves. Research was conducted on 30 plants grown in field trial, during two vegetation periods (in years 2009 and 2010). Fertilization treatment (carried out in early spring in 2009) and meteorological conditions caused differences between investigated years regarding third-flush shoots (that can be considered as potential trigger for translocation of nitrogen in leaves and branches of investigated plants). Eight calibration curves were constructed based on spring and second-flush leaves, sampled in July and September in 2009 and 2010. These equations shown to be reliable ( $p < 0,001$ ) in describing relationship between chlorophyll content index, measured with chlorophyll meter, and total nitrogen concentration in spring and second-flush leaves, regarding moments of sampling (July and September 2009 and 2010). Influence of leaf flush type on homogeneity of equation parameters (i.e. slope and intercept), regarding moment of sampling, was tested using ANCOVA. Leaf flush type (spring or second-flush) did not have significant influence on slope, but did influence intercepts in three moments of sampling (July 2009, and July and September 2010). Homogeneity of equation parameters was observed only for one moment of sampling, e.g. September in 2009, when third-flush shoots occurred which resulted in levelling of total nitrogen concentration in sampled leaves.

**KEY WORDS:** Chlorophyll content index, leaf third-flush, leaf nitrogen dynamic, the parameters of the calibration equations