

**Česká zemědělská univerzita v Praze**  
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

**Ústav ekológie lesa Slovenskej akadémie vied**

**Slovenská spoločnosť pre poľnohospodárske, lesnícke,  
potravinárske a veterinárske vedy pri SAV v Bratislave**



# **VLIV ABIOTICKÝCH A BIOTICKÝCH STRESORŮ NA VLASTNOSTI ROSTLIN 2015**

(Sborník recenzovaných vědeckých prací)

**INFLUENCE OF ABIOTIC AND BIOTIC STRESSES  
ON PROPERTIES OF PLANTS 2015**

*(Proceedings of scientific articles)*



**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Ústav ekológie lesa Slovenskej akadémie vied**

**Slovenská spoločnosť pre poľnohospodárske, lesnícke,  
potravinárske a veterinárske vedy pri SAV v Bratislave**

**Pořadatelé:**

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů ČZU v Praze

Ústav ekológie lesa Slovenskej akadémie vied

**VLIV ABIOTICKÝCH A BIOTICKÝCH  
STRESORŮ NA VLASTNOSTI ROSTLIN 2015**

(Sborník recenzovaných vědeckých prací)

Tato publikace neprošla jazykovou úpravou

**Czech University of Life Science Prague**

**Institute of Forest Ecology SAS**

**Slovak Society for the agricultural, forestry, food and  
veterinary science in SAV in Bratislava**

**Organizers:**

Faculty of Agrobiological Sciences, Food and Natural Resources

Institute of Forest Ecology SAS

**INFLUENCE OF ABIOTIC AND BIOTIC  
STRESSES ON PROPERTIES OF PLANTS 2015**

(Proceedings of scientific articles)

This publication has not undergone language editing

© **Redakčně zpracoval:** doc. Ing. František Hnilička, Ph.D.

**Jazyková korektura:** Texty příspěvků neprošly jazykovou úpravou

**Foto na titulní straně:** Rašeliniště na Kladské.

foto doc. Ing. František Hnilička, Ph.D.

**Odborný garant konference:** Margita Kuklová (ÚEL SAV)

František Hnilička (ČZU v Praze)

**Odborní recenzenti:** *doc. RNDr. Jan Novák, DrSc.*

*Mgr. Jana Šlégrová*

**Organizační výbor konference:**

doc. Ing. František Hnilička, Ph.D. (ČZU v Praze)

Ing. Helena Hniličková, Ph.D. (ČZU v Praze)

Ing. Ján Kukla, CSc. (ÚEL SAV)

Ing. Margita Kuklová, CSc. (ÚEL SAV)

© Česká zemědělská univerzita v Praze, 2015

ISBN: 978-80-813-2567-8

© Ústav ekológie lesa Slovenskej akadémie vied, 2015

ISBN: 978-80-89408-23-8

## OBSAH

	Úvodní slovo	1
<i>V. Kožnarová, L. Hájková, F. Hnilička</i>	Analýza dlouhých časových řad teplotních charakteristik ve vztahu k výskytu mimořádných jevů	3
<i>J. Chrpová, V. Šíp., A. Hanzalová., L. Štočková</i>	Vliv současných změn počasí na výskyt chorob u obilnin	11
<i>M. Bolvanský, J. Pažitný, K. Adamčíková</i>	Vplyv teplotných a zrážkových extrémov na vznik a šírenie chorôb pri vybraných druhoch lesných drevín	16
<i>J. Klimešová, T. Středa, M. Hajzler</i>	Kořenový systém meziplodin jako faktor eliminace ztrát dusíku vyplavováním	23
<i>E. Vintrlíková, J. Klimešová, T. Středa</i>	Vitalita semen a kořenového systému obilnin	27
<i>D. Holá</i>	Rostliny, sucho a omický věk: jaká je informační hodnota proteomických analýz?	32
<i>K. Kosová, P. Vítámvás, R. Vaňková, S. Planchon, J. Renault, I. T. Prášil</i>	Komplexní analýza proteomu a fytohormonů u pšenice seté ( <i>Triticum aestivum</i> L.) ozimé odrůdy Samanta a jarní odrůdy Sandra vystavených chladovému otužení	38
<i>E. Masarovičová, K. Králová, S. S. Zinjarde</i>	Kovové nanočástice v rastlinách – tvorba, funkcia, účinky, využitie	43
<i>D. Fazekašová, J. Fazekaš, L. Angelovičová, E. Michaeli</i>	Kvalita a zdravie pôdy v rôzne využívaných a zaťažených územiach	50
<i>G. Juhásová, M. Kobza, R. Ostrovský, E. Ondrušková</i>	príčiny zvýšenia výskytu škodlivých činiteľov na drevinách	56
<i>J. Hermuth, L. Dotlačil, Y. Xi, Z. Nesvadba, L. Leišová-Svobodová, V. Dvořáček</i>	Hodnocení fenotypové a genetické variability v souboru čínských odrůd ozimé pšenice	61
<i>O. Špulák, J. Martincová</i>	Pozdní mráz, poškození a fluorescence chlorofylu sazenic smrku ztepilého	69
<i>M. Golian, A. Hegedúsová, E. Szabová</i>	Vplyv teploty na rast a vývoj jedlej huby hlivy ( <i>Pleurotus ostreatus</i> ) s prihliadnutím na kvantitu a kvalitu produkcie	73
<i>I. Šembera, T. Šembera, J. Balajka, F. Fekete, M. Lapin, P. Šťastný, T. Tóth</i>	Zmeny klimatu a územné vplyvy na Nitriansky samostatný kraj (Prípadová štúdia)	78
<i>S. T. Forczek, J. Holík, L. Reiderer, V. Koza</i>	Studium faktorů, ovlivňujících rozvoj „vodního květu“ ve vodní nádrži Seč	82
<i>E. Tylová, E. Pecková, A. Soukup</i>	Význam postranních kořenů v reakci kořenového systému na abiotické stresové faktory	86
<i>P. Vítámvás, K. Kosová, I. T. Prášil</i>	Kvantitativní analýza proteomu plodin vystavených abiotickým stresům	90
<i>M. Kuklová, J. Kukla, K. Gašová, H. Hniličková, F. Hnilička</i>	Obsah zinku v asimilačních orgánech rastlín v podmienkach znečisteného prostredia	93

<i>K. Kobetičová, N. Salová</i>	Efekty nanoponožek s obsahem stříbra na vodní rostliny	97
<i>M. Kofroňová</i>	Vliv arsenu na vybrané fyziologické a strukturní parametry kořenové kultury křenu selského	100
<i>M. Molnárová, A. Fargašová</i>	Porovnanie účinku kadmia na hladinu fotosyntetických pigmentov, biomasu a obsah vody v <i>Hordeum vulgare</i> a <i>Triticum aestivum</i>	105
<i>R. Vaňková, S. Přerostová, A. Gaudinová, V. Knirsch, M. Balín, P. Dobrev</i>	Vliv nedostatku fosfátu na hladiny cytokininů	109
<i>D. Bošiaková, P. Ferus, J. Konôpková, P. Hořka</i>	Metabolické zmeny agátu bieleho ( <i>Robinia pseudoacacia</i> L.) vyvolané alelochemikáliami konkurečných drevín	112
<i>K. Gašová, M. Kuklová, J. Kukla</i>	Dynamika produkcie čerstvého opadu a hmotnosť opadankového horizontu v bukových geobiocenózach	116
<i>S. T. Forczek, J. Holík, L. Reederer, M. Ferenčík</i>	Těkavé nízkomolekulární organochlorované látky z přírodních a antropogenně ovlivněných ekosystémů	120
<i>M. Ježík, M. Blaženec, D. Sedmáková, R. Jakuš</i>	Sezónna dynamika transpiračného prúdu smreka obyčajného v reakcii na sucho v podmienkach riadeného experimentu v Kostelci nad Černými Lesy	124
<i>J. Leugner, J. Martincová, E. Erbanová</i>	Změny vodního potenciálu u sadebního materiálu borovice lesní při vysychání	128
<i>M. Madaras, M. Mayerová, I. T. Prášil</i>	Vliv hnojení na mrazuvzdornost čtyř odrůd pšenice ozimé	133
<i>T. Karuppanapandian, Ch.-M. Geilfus, K. H. Mühling, V. Gloser</i>	Ratio imaging of temporal changes in leaf apoplastic pH of <i>Vicia faba</i> (L.) plants under drought stress by fluorescence microscopy technique	137
<i>M. Mayerová, I. Stehlíková, M. Madaras</i>	Vliv stresu suchem v různých fenologických fázích na tři odrůdy pšenice	141
<i>M. Kizeková, E. Jančová, J. Martincová, M. Jančová, Z. Dugátová, Š. Pollák, R. Kanianska, J. Makovnicková</i>	Vplyv zrážok a teploty na rast a primárnu produkciu monokultúry <i>Festulolium</i> a ďatelinotravných miešaniiek	145
<i>V. Hlavjenka, A. Dufek, H. Šefrová, M. Seidenglanz</i>	Poškození kořenového systému ozimé řepky patogenem <i>Plasmodiophora brassicae</i> ve vztahu k délce hlavního kořene a šířce kořenového krčku	149
<i>H. Ivanová</i>	Zdravotný stav brezy previsnutej v mestskom prostredí	153
<i>P. Landa, R. Podlipná, T. Vaněk</i>	Vliv nanočástic na rostliny	158
<i>M. Hájková, M. Kummerová, Š. Zezulka</i>	Porovnání vlivu paracetamolu a diklofenaku na vybrané růstové a biochemické parametry u	

	<i>Lemna minor</i>	.....	162
K. Kobetičová, G. Losonszky, O. Pařízek, V. Kočí	Efekty kofeinu na rostliny	.....	166
I. Blažková, E. Tesařová, S. T. Forczek	Enzymatické studie tvorby organohalo- genovaných látek pomocí modelových sub- strátů	.....	169
K. Kunderlíková, K. Brücková, M. Brestič, M. Živčák	Porovnanie fotosyntetických a fotopro- tekčných prejavov ank-chlorina mutantov a bežného genotypu pšenice	.....	173
T. Jišová, S. T. Forczek, E. Te- sařová	Příjem a distribuce chlorfenolů v ječmenu	.....	177
P. Štangelová, Z. Wimmer, E. Tesařová, S. T. Forczek	Přirozené zdroje chlorovaných uhlovodíků v podrostu smrkového lesa	.....	180
K. Brücková, K. Kunderlíková, M. Brestič, M. Živčák	Využitie multispektrálnej indukovanej fluo- rescencie pre detekciu UV-protekčných látok v listoch vybraných druhov rastlín	.....	184
E. Michaeli, M. Boltížiar, D. Fazekašová, V. Solár, M. Iva- nová	Nanogeochemistry na skládke lúženca, priemysel- ného odpadu z výroby niklu pri bývalej niklo- vej hute v Seredi	.....	187
P. Mészáros, R. Kuna, I. Matu- šíková	Antioxidačné enzýmy v úlohe markerov citli- vosti rastlín na ťažké kovy	.....	191
M. Cárach, R. Matúšová, P., Labun, T., Salaj	Štruktúrna a fyziologická charakteristika em- bryogénnych pletív hybridných jedlí po ovplyvnení ionmi kadmia	.....	196
Z. Blascheová, E. Tylová, E. Pecková, A. Soukup	Vliv kadmia na diferenciáciu apoplastických bariér v kořeni	.....	199
M. Peško, M. Molnárová, A. Fargašová	Vplyv kadmia na niektoré biochemické a rastové parametre hydroponicky pestova- ných rastlín štyroch kultivarov repky olejky	.....	203
J. Pavlovkin, R. Fiala, V. Rep- ka, M. Martinka, M. Čiamporo- vá	Distinct phytotoxic effects of zinc and cad- mium on membrane electrical potential and photoelectric reaction of reaction leaf epider- mal cells of heavy metal intolerant <i>Arabidop- sis thaliana</i> and tolerant <i>Arabidopsis halleri</i>	.....	207
V. Repka, R. Fiala, M. Martin- ka, M. Čiamporová, J. Pavlovkin	Microarray expression profiling of cultivar specific responses in maize root explants treated with cadmium and nickel	.....	211
M. Bjelková, M. Větrovcová	Vliv kadmia a olova na obsah vybraných prv- ků v semenné produkci olejného lnu, hrachu, ječmene a konopí setého	.....	215
V. Lancíková, J. Žiarovská, M. Bežo, K. Ražná, M. Danchenko, V. Berezna, N. Rashydov, M. Hajduch	Pozíčné zmeny v i-pbs profiloch ľanu rastúce- ho v podmienkach Černobyľu	.....	219
L. Bakay, M. Pástor	Fenologická aktivita drevín ako nástroj hodno- tenia ich	.....	224
I. Barányiová	Hodnotenie vplyvu abiotického stresu a účin- ku regulátorov rastu na vybrané fyziologické		

	ukazovatele pšenici ozimnej .....	228
<i>E. Candráková</i>	Formovanie úrody pšenice letnej v klimaticky teplej oblasti .....	232
<i>A. Fargašová, M. Molnárová</i>	Kovy ako abiotický faktor vplývajúci na vitalitu rastlín .....	236
<i>H. Hniličková, F. Hnilička, M. Kuklová, J. Kukla, Z. Krčka</i>	Studium biogenního poškození listnatých dřevin v lesním ekosystému NPR Milešovka .....	242
<i>Z. Holečková, M. Kulhánek, J. Balík</i>	Testování bioefektorů se zaměřením na růst, výnos a podíl sušiny kukuřice .....	246
<i>D. Kellerová, R. Janík</i>	Prízemný ozón vo vidieckych podmienkach západných karpát .....	250
<i>A. Klimaj, J. Pokrývková, V. Bárek</i>	Vplyv imisií na úrody jačmeňa jarného ( <i>Hordeum sativum</i> ) v okolí elektrárni Nováky .....	254
<i>J. Lang</i>	Kvalita píce jetelovinotravních směsí na orné půdě ve srážkově rozdílných letech .....	258
<i>K. A. Mocová, L. Gyömbérová</i>	Vliv azobarviv a produktů jejich biodegradace na růst okřehku ( <i>Lemna Minor</i> L.) .....	262
<i>B. Piršelová, T. Gálusová</i>	Vplyv kadmia a arzenu na maximálny kvantový výťažok fotosystému II v listoch sóje fazuľovej .....	266
<i>B. Šerá, R. Ryplová, E. Hnatiuc, L. Bicanová, T. Landová, K. Petrášková, T. Rákosníková</i>	Předběžné výsledky ošetření chladným plazmatem u brukve řepky olejky .....	270
<i>M. O. Urban, P. Vítámvás, J. Vašek, M. Klíma, J. Krtková, I. T. Prášil</i>	Jak sucho ovlivňuje metabolismus řepky olejky .....	274
	Nabídka firmy Ekotechnika .....	280



## JMENNÝ REJSTŘÍK

	<b>A</b>		Fazekaš	.....	50
Adamčíková	.....	16	Fazekašová	.....	50, 187
Angelovičová	.....	50	Fekete	.....	78
	<b>B</b>		Ferenčík	.....	120
Bakay	.....	224	Ferus	.....	112
Balajka	.....	78	Fiala	.....	207, 211
Balík	.....	246	Forcek	.....	82, 120, 169, 177, 180
Balin	.....	109		<b>G</b>	
Barányová	.....	228	Gálusová	.....	266
Bárek	.....	254	Gašová	.....	93, 116
Berezhna	.....	219	Gaudinová	.....	109
Bežo	.....	219	Geilfus	.....	137
Bicanová	.....	270	Gloser	.....	137
Bjelková	.....	215	Golian	.....	73
Blascheová	.....	199	Gyömbérová	.....	262
Blaženec	.....	124		<b>H</b>	
Blažková	.....	169	Hajduch	.....	219
Boltížiar	.....	187	Hájková L.	.....	3
Bolvanský	.....	16	Hájková M.	.....	162
Bošiaková	.....	112	Hajzler	.....	23
Brestič	.....	173, 184	Hanzalová	.....	11
Brücková	.....	173, 184	Hegedúsová	.....	73
	<b>C</b>		Hermuth	.....	61
Candráková	.....	232	Hlavjenka	.....	149
Cárach	.....	196	Hnautic	.....	270
	<b>Č</b>		Hnilička	.....	3, 93, 242
Čiamporová	.....	207, 211	Hniličková	.....	93, 242
	<b>D</b>		Holá	.....	32
Danchenko	.....	219	Holečková	.....	246
Dobrev	.....	109	Holík	.....	82, 120
Dotlačil	.....	61	Hořka	.....	112
Dufek	.....	149		<b>CH</b>	
Dugátová	.....	145	Chrpová	.....	11
Dvořáček	.....	61		<b>I</b>	
	<b>E</b>		Ivanová H.	.....	153
Erbanová	.....	128	Ivanová M.	.....	187
	<b>F</b>			<b>J</b>	
Fargašová	.....	105, 203, 236	Jakuš	.....	124
			Jančová Ľ.	.....	145
			Jančová M.	.....	145

<b>Janík</b>	.....	250	<b>Martinka</b>	.....	207, 211
<b>Ježík</b>	.....	124	<b>Masarovičová</b>	.....	43
<b>Jíšová</b>	.....	177	<b>Matušíková</b>	.....	191
<b>Juhásová</b>	.....	56	<b>Matúšová</b>	.....	196
			<b>Mayerová</b>	.....	133, 141
	<b>K</b>		<b>Mészáros</b>	.....	191
<b>Kanianska</b>	.....	145	<b>Michaeli</b>	.....	50, 187
<b>Karuppanapandian</b>	.....	137	<b>Mocová</b>	.....	262
<b>Kellerová</b>	.....	250	<b>Molnárová</b>	.....	105, 203, 236
<b>Kizeková</b>	.....	145	<b>Mühling</b>	.....	137
<b>Klíma</b>	.....	274			
<b>Klimaj</b>	.....	254		<b>N</b>	
<b>Klimešová</b>	.....	23, 27	<b>Nesvadba</b>	.....	61
<b>Knirsch</b>	.....	109			
<b>Kobetičová</b>	.....	97, 166		<b>O</b>	
<b>Kobza</b>	.....	56	<b>Ondrušková</b>	.....	56
<b>Kočí</b>	.....	166	<b>Ostrovský</b>	.....	56
<b>Kofroňová</b>	.....	100			
<b>Konôpková</b>	.....	112		<b>P</b>	
<b>Kosová</b>	.....	38, 90	<b>Pařízek</b>	.....	166
<b>Koza</b>	.....	82	<b>Pástor</b>	.....	224
<b>Kožnarová</b>	.....	3	<b>Pavlovkin</b>	.....	207, 211
<b>Kráľová</b>	.....	43	<b>Pažitný</b>	.....	16
<b>Krčka</b>	.....	242	<b>Pecková</b>	.....	86, 199
<b>Krtková</b>	.....	274	<b>Peško</b>	.....	203
<b>Kukla</b>	.....	93, 116, 242	<b>Petrášková</b>	.....	270
<b>Kuklová</b>	.....	93, 116, 242	<b>Piršelová</b>	.....	266
<b>Kulhánek</b>	.....	246	<b>Planchon</b>	.....	38
<b>Kummerová</b>	.....	162	<b>Podlipná</b>	.....	158
<b>Kuna</b>	.....	191	<b>Pokryvková</b>	.....	254
<b>Kunderlíková</b>	.....	173, 184	<b>Pollák</b>	.....	145
			<b>Prášil</b>	.....	38, 90, 133, 274
	<b>L</b>		<b>Přerostová</b>	.....	109
<b>Labun</b>	.....	196			
<b>Lancíková</b>	.....	219		<b>R</b>	
<b>Landa</b>	.....	158	<b>Rákosníková</b>	.....	270
<b>Landová</b>	.....	270	<b>Rashydov</b>	.....	219
<b>Lang</b>	.....	258	<b>Ražná</b>	.....	219
<b>Lapin</b>	.....	78	<b>Rederer</b>	.....	82, 120
<b>Leišová- Svobodová</b>	.....	61	<b>Renaut</b>	.....	38
<b>Leugner</b>	.....	128	<b>Repka</b>	.....	207, 211
<b>Losonszky</b>	.....	166	<b>Ryplová</b>	.....	270
	<b>M</b>			<b>S</b>	
<b>Madaras</b>	.....	133, 141	<b>Salaj</b>	.....	196
<b>Makovníková</b>	.....	145	<b>Salová</b>	.....	97
<b>Martincová Jana</b>	.....	145			
<b>Martincová Jarmila</b>	.....	69, 128			

Sedmáková	.....	124		
Seidenglanz	.....	149		
Solár	.....	187		
Soukup	.....	86, 199		
Stehlíková	.....	141		
Středa	.....	23, 27		
Szabová	.....	73		

## Ž

Žiarovská	.....	219
Živčák	.....	173, 184

## Š

Šefrová	.....	149
Šembera I.	.....	78
Šembera T.	.....	78
Šerá	.....	270
Šíp	.....	11
Špulák	.....	69
Štangelová	.....	180
Šťastný	.....	78
Štočková	.....	11

## T

Tesařová	.....	169, 177, 180
Tóth	.....	78
Tylová	.....	86, 199

## U

Urban	.....	274
-------	-------	-----

## V

Vaněk	.....	158
Vaňková	.....	38, 109
Vašek	.....	274
Větrovcová	.....	215
Vintrlíková	.....	27
Vítámvás	.....	38, 90, 274

## W

Wimmer	.....	180
--------	-------	-----

## X

Xi	.....	61
----	-------	----

## Z

Zezulka	.....	162
Zinjarde	.....	43

## ÚVODNÍ SLOVO

V letošním roce se koná patnáctý ročník multidisciplinární mezinárodní konference o působení stresorů na rostliny, tato problematika je stále vysoce aktuální a studium vlivu stresových faktorů na rostliny je stále na počátku našeho pochopení a našich znalostí.

Jsme rádi, že o uvedenou problematiku je stále velký zájem a témata referátů již zahrnují nejenom problematiku stresorů u polních plodin, okrasných rostlin, ale také dřevin. Studium stresů se již nezaměřuje pouze na klasické fyziologické metody a popisy stresových reakcí, ale stále ve větší míře se uplatňují metody genetických analýz a tzv. omik. Není ani opomenuta otázka změn biodiverzity a výskyt invazních druhů rostlin a živočichů v podmínkách střední Evropy. Z těchto důvodů je nutné věnovat maximální pozornost uchování druhů rostlin a zachování biodiverzity.

Změna biodiverzity se jeví jako vysoce pravděpodobnou, neboť podle řady výzkumů dochází k tomu, že na jihu Evropy bude převládat velmi suché počasí, kdežto ve střední Evropě by mělo převládat počasí současné jižní Evropy.

V současné době, vzhledem k působení kombinace nedostatku vody (sucha) a vysokých teplot, čehož jsme byli svědkem v letošních letních měsících, proto si musíme uvědomit, že je nutné se zaměřit nejenom na odolnost, či toleranci rostlin, zemědělských plodin, dřevin k těmto vlivům, ale také na jinou nejenom odrůdovou, ale i plodinovou skladbu, která i za nepříznivých podmínek bude být dostačující kvalitní produkci.

Závěrem je možné konstatovat, že o uvedenou konferenci je zájem, o čemž svědčí účasti na minulých ročnících, i přestože konferencí s obdobnou tematikou se pořádá nejenom v ČR velké množství. Naším přáním je, aby o uvedenou konferenci byl stále zájem a účastníci se na ní těšili, nejenom kvůli novým vědeckým poznatkům, ale také pro přátelská posezení a rozebírání jednotlivých vědeckých problémů navázání spolupráce.

Organizační výbor konference

## Vyzvané přednášky

# ANALÝZA DLOUHÝCH ČASOVÝCH ŘAD TEPLOTNÍCH CHARAKTERISTIK VE VZTAHU K VÝSKYTU MIMOŘÁDNÝCH JEVŮ

## ANALYSIS OF LONG TIME SERIES OF TEMPERATURE CHARACTERISTICS IN RELATION TO EXTREME PHENOMENON OCCURRENCE

Věra Kožnarová<sup>1</sup>, Lenka Hájková<sup>2</sup>, František Hnilička<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Česká zemědělská univerzita v Praze, FAPPZ, katedra agroekologie a biometeorologie, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchdol, koznarova@af.czu.cz

<sup>2</sup> Český hydrometeorologický ústav, oddělení biometeorologických aplikací, Na Šabatce 17, 143 06 Praha 4 Komořany hajkova@chmi.cz

<sup>3</sup> Česká zemědělská univerzita v Praze, FAPPZ, katedra botaniky a fyziologie rostlin, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchdol, hnilicka@af.czu.cz

### Summary

The presented work is a part of monography study (in the press) and it deals with the variability of air temperature at Prague-Karlov station from the period 1921–2014. Monthly, seasonal, warm half-year, cold half-year and agrometeorological year characteristics were chosen into evaluation of CHMI database. As a reference period was used standard climatological normal (1961–1990), which was complemented by other statistical parameters. The results are presented by several kinds of graphs - from simple ones described calculated values, by way of box plots up to multilevel diagrams as a modified Walter-Lieth climagram.

It is clear, the first decades of the last century were colder (especially 1921/1930). Definitely the warmest decade was the period 2001/2010 and 1991/2000 was the second warmest. The absolute daily maximum of air temperature was 38.5 °C (July 27, 1983 and August 3, 2013). The absolute daily minimum air temperature was -29.1 °C on February 11, 1929.

*Keywords: air temperature maximum and minimum, season, agrometeorological year, urban climate*

### Souhrn

Předkládaná práce je součástí rozsáhlé monografie (v tisku) a zabývá se variabilitou teploty vzduchu na stanici Praha-Karlov z období 1921 až 2014. Ke zpracování databáze Českého hydrometeorologického ústavu byly zvoleny charakteristiky maximální a minimální teplota vzduchu, resp. jejich průměry. Jako referenční charakteristika byl použit standardní klimatologický normál z období 1961–1990, který byl doplněn o další statistické parametry. Výsledky jsou prezentovány v několika typech grafů - od jednoduchých vyjadřujících vypočtené hodnoty, přes krabicové grafy až k několika úroňovému Walter-Liethovu klimagramu. Při vyhodnocení jednotlivých desetiletí je zcela zřetelné, že první dekády minulého století (zejména 1921/30) byly chladnější. Jednoznačně nejteplejší dekáda je období 2001/2010 a druhá nejteplejší je 1991/2000. Absolutní denní maximum teploty vzduchu zaznamenané na stanici je 38,5 °C (27. 7. 1983 a 3. 8. 2013). Absolutní denní minimum teploty je -29,1 °C z 11. 2. 1929.

*Klíčová slova: maximální a minimální teplota vzduchu, roční období, agrometeorologický rok, městské klima*

## ÚVOD

Detailní klimatologické studie charakterizující podnebí vybrané lokality jsou nedílnou součástí navazujících výzkumných prací s akcentem na problematiku související s pěstováním rostlin, chovem zvířat, rozšiřováním městské zástavby, vytápěním, dopravou, znečištěním ovzduší, dopady na lidský organizmus atd. Některé jsou pouze pasivně ovlivněny počasím, jiné aktivně

determinují podnebí dané oblasti. Nejvýrazněji dochází k těmto dějům ve městě. Proces urbanizace podstatnou měrou mění toky energií, které vedou k tomu, že teplota vzduchu ve městech je vyšší než v okolní volné krajině. Masy stavebních hmot, nedostatečné množství městské zeleně a naopak upravený povrch komunikací (dlažba, asphalt, beton) jsou akumulátory tepla vyzařující tepelnou energii ve dne i v nočních hodinách. Vrstva vzduchu je ohřívána kondukcí v přímém kontaktu s aktivním povrchem, konvekcí pak teplo stoupá do vyšších vrstev ovzduší. Voda z atmosférických srážek ve městě rychle odtéká kanalizací z povrchů, které neumožňují vsáknutí, a ochlazování vzduchu výparem, což se také projeví zvýšením teploty přízemní vrstvy. Tento jev se nazývá tepelným ostrovem města. Jeho intenzita závisí na mnoha dalších faktorech, např. na denní a roční době, počasí, resp. povětrnostní situaci /1/. Uvedené skutečnosti se staly příčinou, že problematikou tepelného ostrova města se zabývají vědci již ve většině světových aglomerací a postupně vznikl samostatný aplikovaný vědní obor – urbánní meteorologie a klimatologie. Její nedílnou součástí je i snaha zmírnit dopady tohoto jevu např. i zvyšováním podílu městské zeleně. Veřejná zeleň v intravilánu může mít mnoho různých podob. Může se jednat o parky, zahrady, sady, lesoparky, aleje, stromořadí, trávníky, záhony, květinové mísy, včetně tzv. zelených střech. Tedy o všechny možné formy, kdy se rostliny nacházejí ve značně stresujícím prostředí.

Základním prvkem k pochopení problematiky klimatických podmínek je pozorování všech atmosférických procesů v daném prostředí. K dosažení dobrých výsledků je nezbytné vycházet z pozorování, u nichž nejvýznamnější roli hraje reprezentativnost polohy stanic se zřetelem k reliéfu krajiny /2/. Již v roce 1947 WMO přijala rezoluci vymezující podmínky pro umístění meteorologické stanice. Problémem ve velkých městech je, že městské stanice tyto požadavky ve většině případů nesplňují, protože jsou prakticky vždy obklopeny blokem domů. Základní podmínkou pro analýzu je i stálost umístění stanice a dostatečně dlouhá časová řada měření.

Praha má k dispozici tři takové stanice – Klementinum, Karlov a Ruzyně. V předložené studii jsme použili data ze stanice Praha Karlov, která má již téměř stoletou řadu pozorování. Je součástí rozsáhlé práce, která je připravena k tisku /1/. Jsme si vědomi, že tato stanice nesplňuje metodické podmínky vymezené předpisy WMO a ČHMÚ (meteorologické přístroje jsou umístěny na ploše, která se nachází na věži, víc než 20 m nad dlažbou měst). Cílem předložené práce však není porovnání s jinými databázemi, ale jednotná analýza základních a účelových klimatologických charakteristik v průběhu času pouze na této lokalitě (mimořádně její nadmořská výška odpovídá téměř Suchdolu). V souvislosti s uvedenými fakty a změnami, které v této oblasti v minulém století proběhly (zejména nárůst dopravy na magistrále), lze stanici Praha-Karlov považovat za vhodnou pro zpracování dlouhých časových řad a popis změny mikroklimatických podmínek v této lokalitě v navazujících studiích.

Praha má v současné době rozlohu 496 km<sup>2</sup> (k 1. 1. 2012). Díky těmto administrativním úpravám a narůstajícímu počtu obyvatel a rozšiřováním území je dnes Praha patnáctým největším městem Evropské Unie. Podle Českého statistického úřadu měla k 1. lednu 2015 celkem 1 259 079 obyvatel /3/. Interakce atmosféry a urbanizovaného území je typickým příkladem otevřeného systému kde se v plné míře uplatňují zpětné vazby.

Obecně lze konstatovat, že Praha patří k nejteplejším místům České republiky vůbec. Stejná teplota či mírně tepleji je pouze na jižní Moravě. Pražská aglomerace leží v poměrně členitém terénu s relativním převýšením, které je větší než 200 m, projevujícím se nejzřetelněji u teploty vzduchu. Pokles teploty vzduchu s výškou závisí na orografických a místních poměrech, na expozici terénu ke světovým stranám apod. Lokality s hustou zástavbou jsou teplejší večer a v noci; ve dne se ohřívají pomaleji /4/.

Optimální mikroklima mají mírně skloněné svahy orientované k jihu, jihozápadu a západu, některé rovinné a mírně zvlněné plochy na okraji města. Ostatní okrajové plochy se vyznačují dobrými mikroklimatickými podmínkami, někde je však mírně zhoršuje nadměrná ventilace. Vysoké rychlosti větru jsou nepříznivé především pro vznik sekundární prašnosti. V severní části

města se často vyskytuje jihovýchodní až jihozápadní proudění s malou turbulencí v zimě, což přispívá k přenosu vysokých koncentrací škodlivin z centrální a průmyslové zóny města. Střední mikroklimatickou bonitu mají širší otevřená údolí. Nejhorší podmínky s častým výskytem inverzí, silným zákalem, nejvyšším úbytkem slunečního svitu a s nedostatečnou ventilací jsou v centrální části v údolní nivě na nejnižších terasách Vltavy a v údolích jejich přítoků /5/.

## MATERIÁL A METODA

Meteorologická stanice Praha-Karlov je umístěna na budově Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v ulici Ke Karlovu 3 v Praze 2. Nachází se v jihozápadní části budovy, na věži,



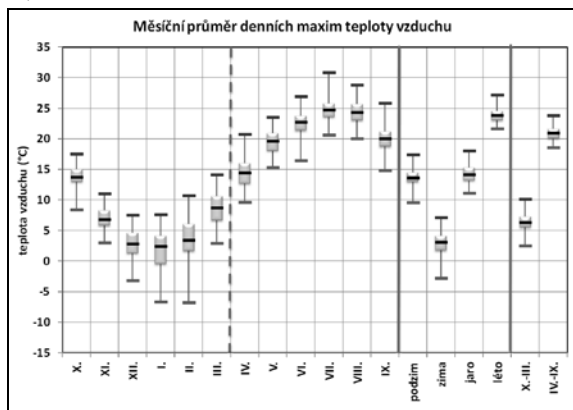
která převyšuje ostatní části budovy (obr. 1), kde jsou meteorologické přístroje umístěny na plošině věže, ve výšce 27 m nad terénem a 260,5 m nad mořem. Jako nadmořská výška stanice je uvedena výška střechy pod srážkoměrem; v historických publikacích je uváděna jako výška stanice 232 m n. m., což odpovídá terénu pod budovou.

Obr. 1: Stanice Praha Karlov na střeše budovy Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy

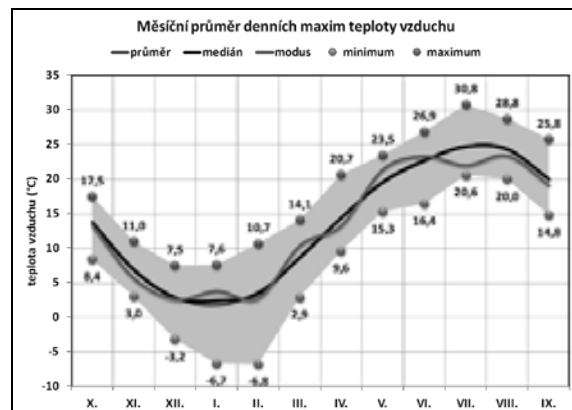
Měření a pozorování bylo zahájeno na stanici Praha – Karlov 1. 1. 1920, záznamy jsou k dispozici od roku 1921. Výrazným milníkem v její historii je 1. 8. 2002, kdy se stala stanicí kombinovaného typu. Z databáze ČHMÚ byly zpracovány pouze dvě teplotní charakteristiky maximální a minimální teplota vzduchu, resp. jejich průměry v měsících, v ročních obdobích a v tzv. agrometeorologickém roce. Pro hodnocení jsme použili základní statistické charakteristiky a k posouzení variability vyjádření pomocí percentilů na základě doporučení World Meteorological Organization /6/.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

V souvislosti s mimořádnými jevy jsme zaměřili pozornost na maximální a minimální teplotu vzduchu. Výsledky jsou prezentovány v tabulkách a grafech. Další výsledky lze najít v literatuře /1, 7–11/.

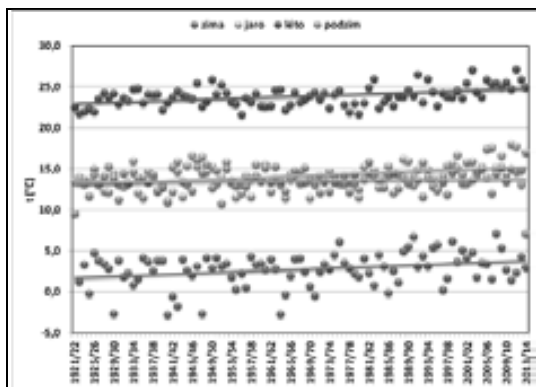


Obr. 2: Krabicový graf vyjadřující rozložení dat maximální teploty vzduchu



Obr. 3: Základní statistické veličiny maximální teploty vzduchu

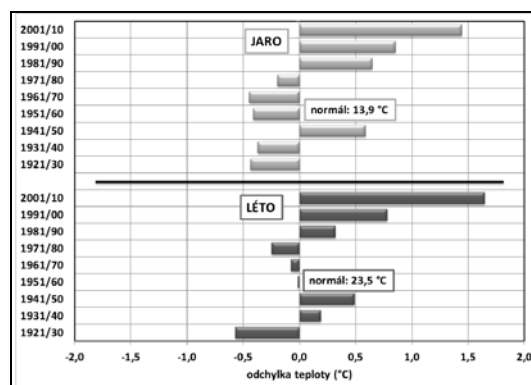
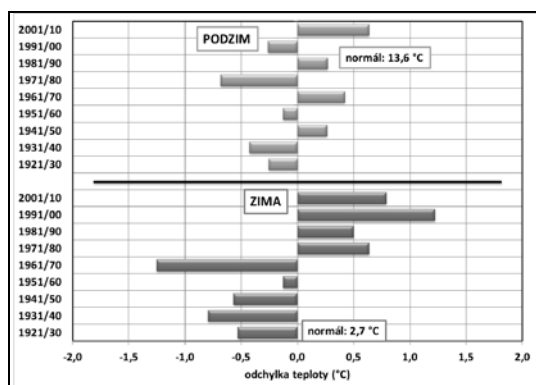




Tab. 1: Rovnice trendů

jaro	$y = 0,004x + 13,35$
léto	$y = 0,019x + 22,96$
podzim	$y = 0,024x + 13,06$
zima	$y = 0,023x + 1,63$

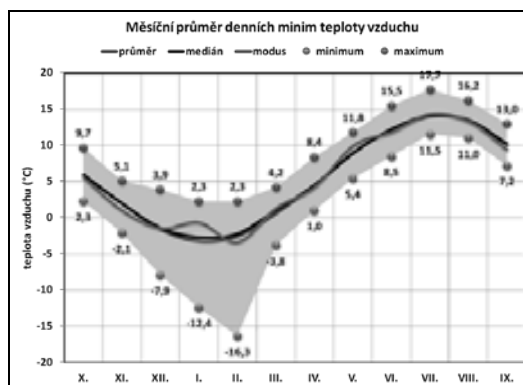
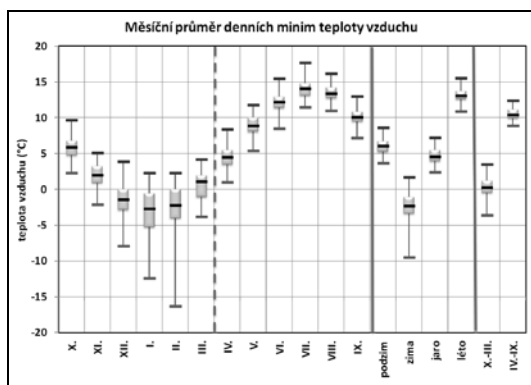
Obr. 4: Trendy v sezónních hodnotách maximální teploty vzduchu



Obr. 5a, b: Odchylky desetiletých průměrů maxima teploty vzduchu od normálu (1961–1990)

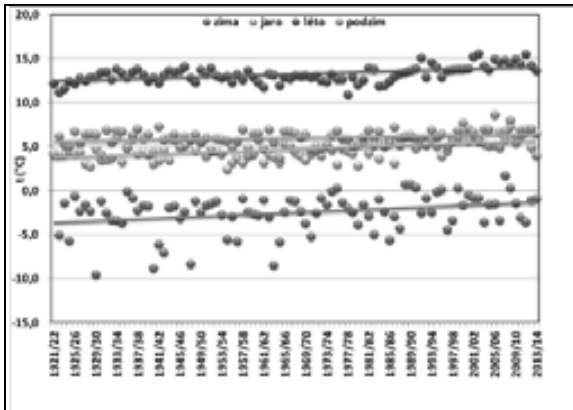
Tab. 2: Základní statistické charakteristiky sezónního průměru denních maxim teploty

	Jaro	Léto	Podzim	Zima	X.–III.	IV.–IX.	AMT rok
<b>Průměr</b>	14,2	23,9	13,5	2,8	6,3	20,9	13,6
<b>Minimum</b>	11,1	21,6	9,6	-2,8	2,5	18,6	11,0
<b>První decil</b>	12,1	22,4	12,1	-0,1	4,5	19,5	12,3
<b>Dolní kvartil</b>	13,2	23,0	12,9	1,8	5,6	20,1	13,0
<b>Medián</b>	14,1	23,8	13,6	3,1	6,3	20,9	13,6
<b>Horní kvartil</b>	15,3	24,5	14,5	4,1	7,3	21,6	14,3
<b>Devátý decil</b>	16,0	25,5	15,1	5,0	7,7	22,4	14,9
<b>Maximum</b>	18,0	27,2	17,4	7,1	10,1	23,8	16,3
<b>Modus</b>	14,3	23,7	13,7	3,4	7,8	20,1	13,4
<b>Směr. odch.</b>	1,5	1,2	1,4	2,1	1,4	1,1	1,0
<b>Rozptyl</b>	2,4	1,4	2,0	4,3	1,9	1,2	1,0



Obr. 6: Krabicový graf vyjadřující rozložení dat minimální teploty vzduchu

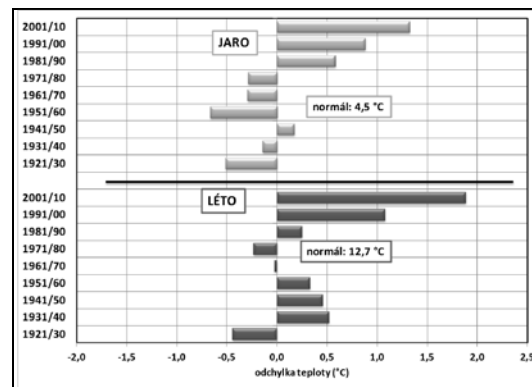
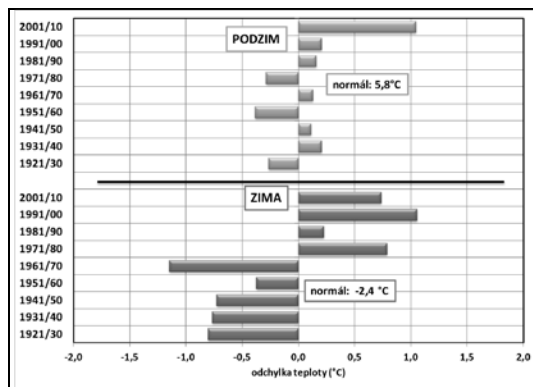
Obr. 7: Základní statistické veličiny minimální teploty vzduchu



Tab. 3: Rovnice trendů

jaro	$y = 0,024x + 3,71$
léto	$y = 0,018x + 12,39$
podzim	$y = 0,008x + 5,58$
zima	$y = 0,025x - 3,71$

Obr. 8: Trendy v sezónních hodnotách minimální teploty vzduchu



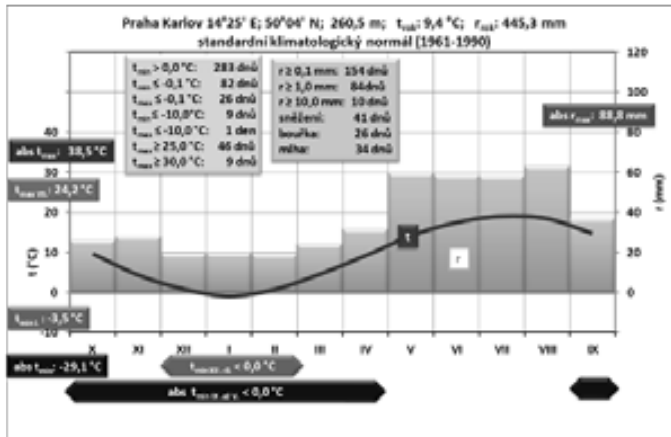
Obr. 9a, b: Odchylky desetiletých průměrů minima teploty od normálu (1961–1990)

Tab. 3: Základní statistické charakteristiky sezónního průměru denních minim teploty vzduchu

	Jaro	Léto	Podzim	Zima	X.–III.	IV.–IX.	AMT rok
<b>Průměr</b>	4,7	13,2	6,0	-2,5	0,2	10,6	5,4
<b>Minimum</b>	2,4	10,9	3,7	-9,5	-3,6	8,9	3,2
<b>První decil</b>	3,2	12,2	4,8	-5,6	-1,5	9,6	4,3
<b>Dolní kvartil</b>	3,9	12,7	5,3	-3,4	-0,5	9,9	4,7
<b>Medián</b>	4,6	13,1	6,1	-2,3	0,3	10,4	5,4
<b>Horní kvartil</b>	5,5	13,8	6,7	-1,1	1,2	11,1	6,0
<b>Devátý decil</b>	6,1	14,4	7,0	0,0	1,5	11,7	6,5
<b>Maximum</b>	7,2	15,6	8,6	1,7	3,5	12,4	7,6
<b>Modus</b>	4,2	13,7	6,7	-1,6	1,4	10,4	4,5
<b>Směr. odch.</b>	1,1	0,9	0,9	2,2	1,3	0,8	0,9
<b>Rozptyl</b>	1,2	0,8	0,9	4,8	1,8	0,7	0,8

Nejčastěji používanými charakteristikami v různých studiích jsou průměrná měsíční teplota vzduchu a měsíční úhrn srážek. Tento systém přetrvává z doby, kdy zpracování dat bylo omezené možnostmi výpočtu (ručně, logaritmickým pravítkem a prvními kalkulátory). Současná technika každému umožňuje zpracovávat poměrně rozsáhlé soubory. Je proto možné popsat teplotní poměry lokality na základě měření teploty vzduchu v meteorologické budce pomocí celé řady dalších teplotních charakteristik. Proto doporučujeme více využívat v aplikovaných oborech další charakteristiky, jako jsou absolutní a průměrné extrémy (měsíční, sezónní, půlroční a roční), počty dnů s definovanou teplotní hranicí (dny letní, tropické, mrazové, ledové, se silným mrazem, arktické) a speciální (definované podle nároků rostlin – efektivní a aktivní teploty a další. Kombinaci více parametrů pak umožňují vyjádřit různé typy klimagramů. Postup při volbě

charakteristik je jednoduchý a založen na zvážení účelu zpracování, zda práce vyžaduje všeobecný popis, nebo je sledován problém, který je počasím přímo limitován (např. mrazy, sucho, přivalové deště). V prvním případě obvykle vystačíme s údaji, které jsou méně popisné (průměry), v druhém případě doporučujeme pozornost soustředit na charakteristiky detailu. Jako příklad použití různých charakteristik teploty vzduchu uvádíme obr. 10.



Obr. 10: Klimagram z období standardního klimatologického normálu 1961–1990

**VYSVĚTLIVKY:** černá linie -  $t$  = průměrná měsíční teplota vzduchu (°C); šedé sloupce -  $r$  = průměrný měsíční úhrn srážek (mm); nahoře:  $t_{rok}$  = průměrná roční teplota (°C);  $r_{rok}$  = průměrný roční úhrn srážek (mm); vlevo:  $abs\ t_{max}$  = absolutní maximum teploty (°C);  $t_{max\ vii}$  = průměrná měsíční teplota nejteplejšího měsíce;  $t_{min\ i}$  = průměrná měsíční teplota nejchladnějšího měsíce;  $abs\ t_{min}$  = absolutní minimum teploty (°C); dole:  $t_{min\ xii-ii} < 0,0$  °C = měsíce s průměrným minimem teploty < 0,0 °C;  $abs\ t_{min\ ix-vi} < 0,0$  °C = měsíce s absolutním minimem teploty < 0,0 °C; vpravo:  $abs\ r_{max}$  = absolutní maximum denního úhrnu srážek; růžový čtverec:  $t_{min} > 0,0$  °C = průměrný počet dnů s teplotou > 0,0 °C;  $t_{min} \leq -0,1$  °C = průměrný počet mrazových dnů;  $t_{max} \leq -0,1$  °C = průměrný počet ledových dnů;  $t_{min} \leq -10,0$  °C = průměrný počet dnů se silným mrazem;  $t_{max} \leq -10,0$  °C = průměrný počet arktických dnů;  $t_{max} \geq 25,0$  °C = průměrný počet letních dnů;  $t_{max} \geq 30,0$  °C = průměrný počet tropických dnů; zelený čtverec:  $r \geq 0,1$  mm = průměrný počet dnů se srážkovým úhrnem  $\geq 0,1$  mm;  $r \geq 1,0$  mm = průměrný počet dnů se srážkovým úhrnem  $\geq 1,0$  mm;  $r \geq 10,0$  mm = průměrný počet dnů se srážkovým úhrnem  $\geq 10,0$  mm; sněžení = průměrný počet dnů se sněžením; bouřka = průměrný počet dnů s bouřkou; mlha = průměrný počet dnů s mlhou

Tab. 5: Nejteplejší roční období a agrometeorologický rok podle různých kritérií

Průměrná sezónní teplota vzduchu (°C) / Average seasonal air temperature (°C)									
Rok	Jaro	Rok	Léto	Rok	Podzim	Rok	Zima	Rok	AMT
2007, 2012	12,4	2003	21,7	2005	12,8	2006/07	4,4	2006/07	11,9
Průměrné denní maximum teploty vzduchu (°C) / Average daily maximum air temperature (°C)									
Rok	Jaro	Rok	Léto	Rok	Podzim	Rok	Zima	Rok	AMT
2011	12,7	2012	17,6	2006	12,1	2006/07	6,9	2006/07	10,6
Nejvyšší denní maximum teploty vzduchu (°C) / The highest daily maximum air temperature (°C)									
Datum	Jaro	Datum	Léto	Datum	Podzim	Datum	Zima	Datum	AMT
26. 5. 11	21,3	27. 7. 83 3. 8. 13	38,5	14. 9. 47	33,4	4. 12. 29 23. 2. 43	28,0	27. 7. 83 3. 8. 13	38,5
Letní dny ( $t_{max} \geq 25,0$ °C) / Summer days ( $t_{max} \geq 25,0$ °C)									
Rok	Jaro	Rok	Léto	Rok	Podzim	Rok	Zima	Rok	AMT
2012	21	2003	65	1947	17	–	–	2011/12	93
Tropické dny ( $t_{max} \geq 30,0$ °C) / Tropical days ( $t_{max} \geq 30,0$ °C)									
Rok	Jaro	Rok	Léto	Rok	Podzim	Rok	Zima	Rok	AMT
2012	5	2006	30	1947	9	–	–	2005/06	31

Provedená analýza prokázala výrazné změny v teplotě vzduchu v lokalitě Praha Karlov. Vyšší hodnoty (ať již v °C, nebo v počtu dnů) v letním období připadají na roky po roce 2000.

Charakteristiky chladného období se objevují jako mimořádné především v prvních dekádách minulého století. Zřetelně to dokazují tab. 5 a 6, kde jsme k analyzovaným charakteristikám přidali i další z připravované studie a které poskytují informace o nejteplejším a nejchladnějším období podle různých kritérií.

Tab. 6: Nejchladnější roční období a agrometeorologický rok podle různých kritérií

Průměrná sezónní teplota vzduchu (°C) / Average seasonal air temperature (°C)									
Rok	Jaro	Rok	Léto	Rok	Podzim	Rok	Zima	Rok	AMT
1941	7,0	1923	16,7	2013	5,3	1928/29	-5,9	1939/40	7,3
Průměrné denní minimum teploty vzduchu (°C) / Average daily minimum air temperature (°C)									
Rok	Jaro	Rok	Léto	Rok	Podzim	Rok	Zima	Rok	AMT
1955	2,4	1978	10,9	1965	3,7	1928/29	-9,5	1928/29	3,2
Nejnižší denní minimum teploty vzduchu (°C) / The lowest daily minimum air temperature (°C)									
Datum	Jaro	Datum	Léto	Datum	Podzim	Datum	Zima	Datum	AMT
3.3.29	-22,6	1.6.77	1,7	15.11.83	-10,5	11.2.29	-29,1	11.2.29	-29,1
Mrazové dny ( $t_{min} \leq -0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$ ) / Frost days ( $t_{min} \leq -0.1 \text{ } ^\circ\text{C}$ )									
Rok	Jaro	Rok	Léto	Rok	Podzim	Rok	Zima	Rok	AMT
1931	35	–	–	1965	30	1939/40	83	1995/96	121
1958						1962/63			
Ledové dny ( $t_{max} \leq -0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$ ) / Ice days ( $t_{max} \leq -0.1 \text{ } ^\circ\text{C}$ )									
Rok	Jaro	Rok	Léto	Rok	Podzim	Rok	Zima	Rok	AMT
1987	9	–	–	1993	10	1939/40	65	1939/40	71
Dny se silným mrazem ( $t_{min} \leq -10,0 \text{ } ^\circ\text{C}$ ) / Days with strong frost ( $t_{min} \leq -10.0 \text{ } ^\circ\text{C}$ )									
Rok	Jaro	Rok	Léto	Rok	Podzim	Rok	Zima	Rok	AMT
1987	5	–	–	1984	2	1939/40	44	1939/40	44
Arktické dny ( $t_{max} \leq -10,0 \text{ } ^\circ\text{C}$ ) / Arctic days ( $t_{max} \leq -10.0 \text{ } ^\circ\text{C}$ )									
Rok	Jaro	Rok	Léto	Rok	Podzim	Rok	Zima	Rok	AMT
–	–	–	–	–	–	1941/42	12	1941/42	12

## LITERATURA

- 1/ Kožnarová, V., Hájková, L., Klabzuba, J., Bachanová, S. Vybrané klimatologické charakteristiky na stanici Praha-Karlovy pro biologické a technické aplikace. Praha: ČHMÚ. (v tisku 430 s.?)
- 2/ Gregor, A. Podnebí Prahy. Praha: Academia. 1968. 194 s.
- 3/ Anon. Praha počet obyvatel. [cit. 30. 7. 2015]. Dostupné z [https://cs.wikipedia.org/wiki/Praha#Po.C4.8Det\\_obyvatel](https://cs.wikipedia.org/wiki/Praha#Po.C4.8Det_obyvatel).
- 4/ Červený, J. (ed). Podnebí a vodní režim ČSSR. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. 1968. 414 s.
- 5/ Anon. Klima hl. m. Prahy. Kategorie kvality klimatu. [cit. 30. 7. 2015]. Dostupné z <http://www.migesp.cz/klimaticke-regiony-cr>.
- 6/ Klabzuba, J., Kožnarová, V., Voborníková J. Hodnocení počasí v zemědělství. Praha: PowerPrint. 1999. 122 s. ISBN 80-213-0584-3.
- 7/ Beranová, R., Huth, R. Pražský tepelný ostrov za různých synoptických podmínek. Praha: Český hydrometeorologický ústav. Meteorologické zprávy. r. 56, č. 5, s. 137–142. 2003. ISSN 0026-1173.
- 8/ Kožnarová, V., Klabzuba, J. Doporučení WMO pro popis meteorologických, resp. klimatologických podmínek definovaného období, Rostlinná výroba, ČAZV - ÚZPI, ISSN 0370-663X, duben 2002, č. 4, ročník 48, s. 190-192. ISSN 0370-663X.
- 9/ Kožnarová, V., Klabzuba, J. Tradiční i moderní metody hodnocení počasí a podnebí v biologických disciplínách. In: Současné možnosti fyziologie a zemědělského výzkumu přispět k produkci rostlin. Praha: PowerPrint. 2010. ISBN 978-80-7427-023-9. 310 s.
- 10/ Kožnarová, V., Hájková, L. Variabilita srážek v agrometeorologickém roce na stanici Praha Karlov v období 1921/22 až 2013/14. In: Rožnovský, J., Litschmann, T., (eds): Závlahy a jejich perspektiva. Mikulov, 18. – 19. 3. 2015. 13 p. ISBN 978-80-87577-47-9.
- 11/ Kožnarová, V., Sulovská, S., Hájková, L. Urban Heat Island in Prague. In: Kožnarová, V., Sulovská, S., Hájková, L. (eds.), In: Bioclimate 2012 – Bioclimatology of Ecosystems, International Scientific Conference. Ústí nad Labem, August 29th–31th 2012. Praha: ČBkS, s. 52-53. ISBN 978-80-213-2299-8.

**Poděkování**

Příspěvek vznikl s institucionální podporou Českého hydrometeorologického ústavu, Programu pro dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné instituce poskytovaného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a S grantem MŠMT ČR.

**VLIV SOUČASNÝCH ZMĚN POČASÍ NA VÝSKYT CHOROB U OBILNIN*****EFFECTS OF CLIMATIC CHANGES ON OCCURRENCE OF DISEASES IN CEREALS***

Jana Chrpová, Václav Šíp, Alena Hanzalová, Lenka Štočková

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.- Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně; chrpova@vurv.cz

***Summary***

Weather and climatic factors influence the occurrence and severity of certain cereal diseases. In this paper there is described variation in occurrence of *Fusarium* head blight and yellow rust in dependence on climatic and weather conditions.

*Key words: wheat; Fusarium; deoxynivalenol; yellow rust; average annual temperature; average annual sum of precipitation*

***Souhrn***

Počasí a klimatické faktory ovlivňují výskyt chorob a intenzitu napadení. V příspěvku je popsána průměrnivost výskytu klasových fuzarióz a rzi plevové v závislosti na klimatických podmínkách a na počasí.

*Klíčová slova: pšenice; Fusarium; deoxynivalenol; rez plevová; průměrná roční teplota; průměrné roční srážky*

**ÚVOD**

Výskyt chorob obilovin je podmíněn řadou faktorů. Nezbytné je vytvoření vhodných podmínek pro rozvoj patogena, což zahrnuje přítomnost náchylné hostitelské rostliny, dostatečné množství inokula patogena a vhodné podmínky prostředí pro původce chorob, popř. vektory (přenašeče chorob). Výskyt chorob rostlin významně ovlivňují povětrnostní podmínky v daném ročníku. V tomto příspěvku je věnována pozornost dvěma závažným chorobám: klasovým fuzariózám a rzi plevové.

Klasové fuzariózy jsou závažným onemocněním obilovin, v různé míře se vyskytují ve všech oblastech světa, kde se pěstují obilniny. Kromě toho, že v důsledku napadení chorobou dochází ke snížení kvality zrna a k výnosovým ztrátám, produkují houby mykotoxiny, které mají negativní vliv na zdraví lidí a hospodářských zvířat. K rozšíření klasových fuzarióz přispívá ústup od tradičního střídání plodin (převažující obilniny, mizející víceleté pícniny) a standardního zpracování půdy. Přestože Česká republika nepatří k nejvíce ohroženým oblastem, v některých ročnících dochází ke zvýšenému výskytu klasových fuzarióz a k překročení Limitů maximálního obsahu mykotoxinů (především deoxynivalenolu). Limity maximálního obsahu fuzariových toxinů v obilovinách jsou stanoveny podle Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 z 19. 12. 2006. Pro nezpracované obiloviny kromě pšenice tvrdé, ovesa a kukuřice je limit pro deoxynivalenol 1,25 mg/kg.

Je známo, že výskyt jednotlivých druhů fuzariových patogenů výrazně souvisí s klimatickými podmínkami dané lokality a existují i údaje o vlivu měnícího se klimatu na fuzariové patogeny /1/. Dlouhodobě byl druh *Fusarium culmorum* považován za hlavního původce klasových fuzarióz u pšenice ve střední Evropě. Zřejmě v důsledku klimatických změn se postupně hlavním původcem klasových fuzarióz u pšenice stává *Fusarium graminearum* /2/, /3/, /4/. Na základě výsledků vlastního výzkumu je možno konstatovat, že v ročnících 2012 a 2013 bylo u pšenice zjištěno vysoké zastoupení *F. poae*. Podle nejnovějších poznatků dochází k většímu zastoupení *F. poae* u pšenice především v ročnících, které jsou nepříznivé pro výskyt *F. graminearum* (tedy v relativně sušších ročnících). Patogeny z rodu *Fusarium* produkují široké

spektrum mykotoxinů. Významným mykotoxinem produkovaným druhy *F. graminearum* a *F. culmorum* je deoxynivalenol (DON).

Mezi významné choroby pšenice patří rez plevová. V našich podmínkách se vyskytuje nepravidelně, epidemie trvají obvykle několik let. K prostorovému šíření rzi slouží nejen vzdušné proudy, ale přispívá i lidská činnost (pohyb osob a zboží uvnitř i mezi kontinenty). Epidemie rzi většinou souvisejí s výskytem nových ras překonávajících geny rezistence v pěstovaných odrůdách, případně ras majících vyšší agresivitu. Došlo k rozšíření nových teplomilných ras, které měly zároveň i vyšší agresivitu /5/, v souvislosti s tím došlo k epidemickým výskytům rzi plevové. Ve Švýcarsku byla již v roce 2009 zjištěna nová virulence překonávající dříve účinné geny rezistence. Adaptace rzi plevové na místní klimatické podmínky byla ve Francii prokázána i v lokálním měřítku srovnáním teplotních nároků rzi z jižní a severní oblasti země /6/. V roce 2014 došlo k mimořádně časnému a silnému výskytu rzi plevové v západní Evropě, postižena byla i Česká republika, Rakousko, Maďarsko a Švýcarsko. Epidemie rzi plevové zpravidla předznamenává riziko silných výskytů patogena v následujících několika letech. U náchylných odrůd mohou škody dosáhnout až 50 % předpokládaného výnosu.

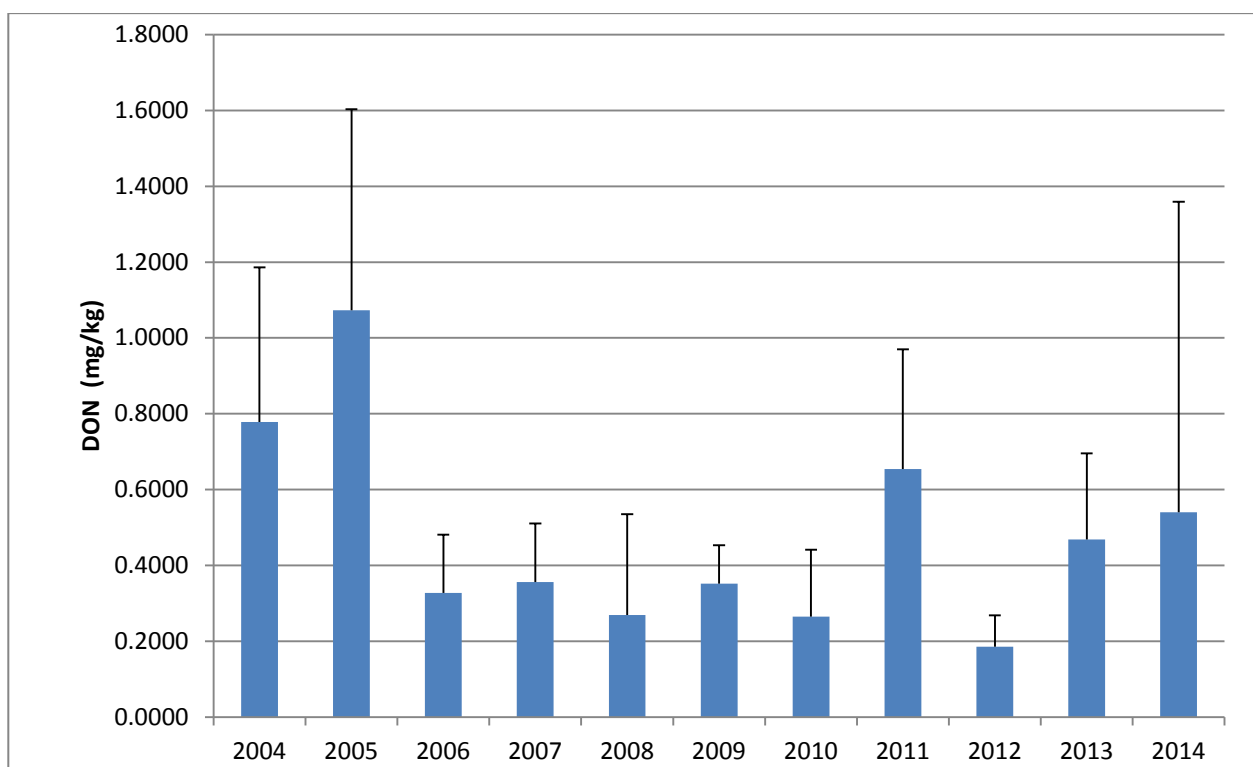
## MATERIÁLY A METODY

Údaje o výskytu škodlivých organismů a chorob rostlin na území České republiky získané na základě průzkumu na stálých pozorovacích bodech i mimo ně, včetně údajů o průběhu počasí, každoročně zpracovává ÚKZÚZ (dříve Státní rostlinolékařská správa – SRS). Výskyt klasových fuzarióz a akumulace zrna mykotoxiny jsou sledovány ve spolupráci ÚKZÚZ a VÚRV, v.v.i.. ÚKZÚZ zajišťuje náhodný odběr klasů z pozorovacích bodů, ve VÚRV, v.v.i. je hodnocen stupeň napadení klasů a stanoven obsah deoxynivalenolu (DON) metodou ELISA. Výskytem rzi se zabývá ÚKZÚZ (dříve SRS) a změnami spektra patogenů VÚRV, v.v.i. Zde je také připravováno inokulum k polním infekčním testům z aktuálních sběrů a je sledováno jejich rasové spektrum.

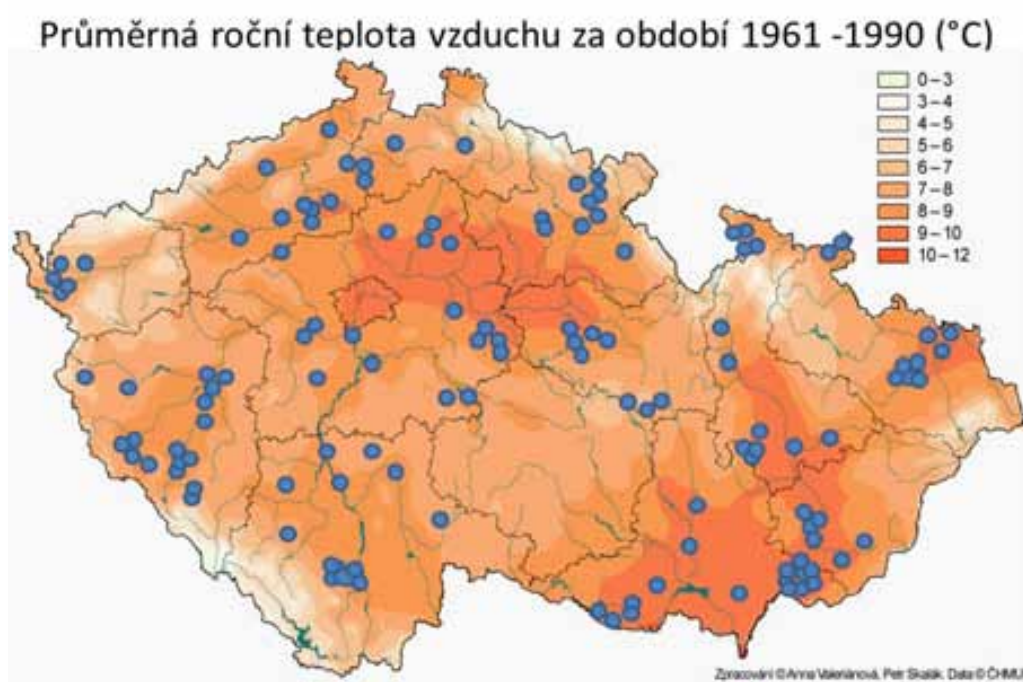
## VÝSLEDKY A DISKUSE

Graf 1 ukazuje významný vliv ročníku na obsah DON v zrna pšenice. V souladu s předchozími zjištěními /7/ lze konstatovat, že výskyt klasových fuzarióz je významně ovlivněn ročníkem. Vývoj patogena nepodporuje suché jaro (duben, květen) a slunečné, velmi teplé počasí s nižším úhrnem srážek nebo krátkými přivalovými dešti v době kvetení a bezprostředně po něm. Z hlediska srážek je dále rozhodující období 10, popř. 20 dní před kvetením a dále i období těsně po infekci. Naopak vysoce podlimitní koncentrace mykotoxinem DON byla zaznamenána při srážkách nižších než 10 mm v období 10 dnů před kvetením. Teploty v období 10 a 20 dnů před kvetením nebyly pro obsah DON rozhodující. Hromadění mykotoxinu bezprostředně po infekci podporují spíše nižší teploty (v průměru kolem 16 °C). Jako výrazně omezující produkci DON se ukázaly až průměrné teploty nad 22 °C. Z praktického hlediska lze těchto poznatků využít při rozhodování o použití fungicidní ochrany.

V rámci této již 11leté studie bylo potvrzeno, že výskyt klasových fuzarióz významně ovlivňují lokální klimatické podmínky (Obr. 1). V rámci ČR lze vymezit oblasti, kde opakovaně dochází ke zvýšené akumulaci DON. Z mapy dlouhodobých průměrných ročních teplot je zřejmé, že pro vysokou akumulaci mykotoxinu DON je limitující nižší teplota. Výskyt nadlimitních hodnot byl zaznamenán v oblastech s průměrnou roční teplotou vyšší než 6°. Akumulace mykotoxinu nestoupá s úhrnem srážek. Nadlimitní hodnoty se často vyskytují v blízkosti říčních toků. Pro rozvoj choroby a akumulaci mykotoxinů má pravděpodobně velký význam vzdušná vlhkost (mlhy, rosa). Při zvýšení teplot v důsledku klimatických změn je možno předpokládat i rozšíření klasových fuzarióz a vyšší akumulaci mykotoxinu DON ve vyšších polohách. Dosažené výsledky naznačují i změny v druhové spektru, které s sebou nesou i tvorbu dalších dosud méně studovaných mykotoxinů (tzv. emerging mykotoxiny)

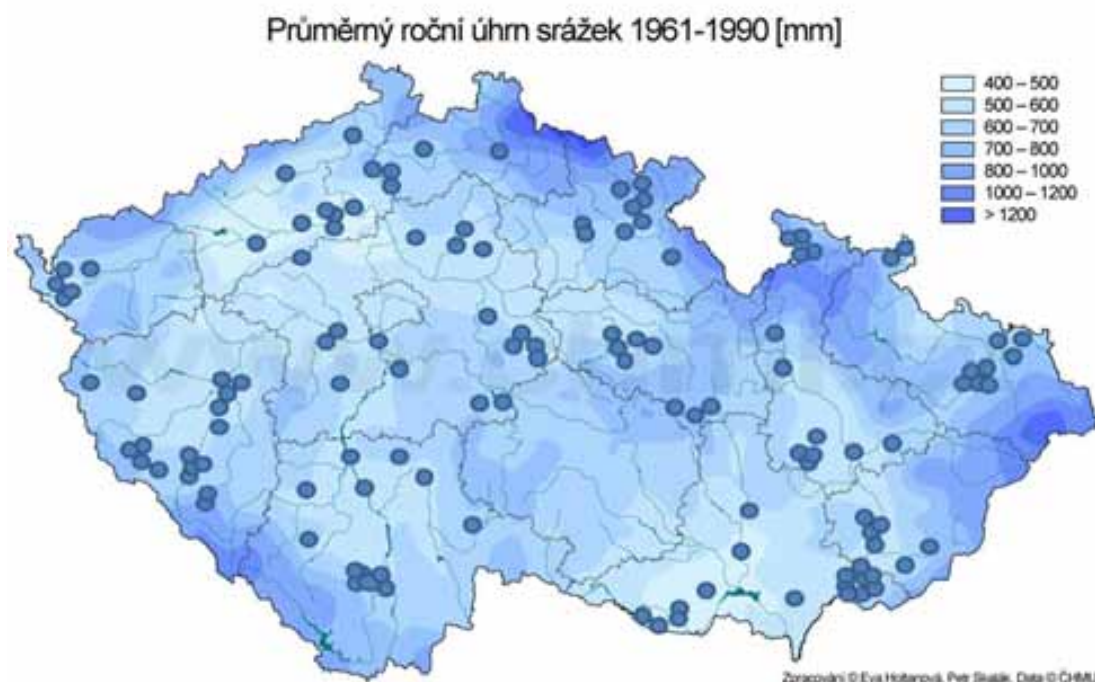


Graf 1 Vliv ročníku na obsah DON v zrně pšenice (průměrné hodnoty a intervaly spolehlivosti;  $p < 0,05$ )



Obr. 1a: Výskyt klasových fuzarióz na území ČR vzhledem k průměrné roční teplotě a průměrnému ročnímu úhrnu srážek: nadlimitní vzorky (obsah deoxynivalenolu 1,25 mg/kg) zjištěné na základě náhodného monitoringu v ročnících 2004-2014





Obr. 1b: Výskyt klasových fuzarióz na území ČR vzhledem k průměrné roční teplotě a průměrnému ročnímu úhrnu srážek: nadlimitní vzorky (obsah deoxynivalenolu 1,25 mg/kg) zjištěné na základě náhodného monitoringu v ročnících 2004-2014

#### Rez plevová

Změnu rasového spektra v našich podmínkách dokládají zjištěné významné rozdíly v napadení jednotlivých odrůd rzi plevovou mezi ročníky 2012 a 2014. Výsledky byly získány z lokality Praha – Ruzyně v pokusech s umělou infekcí, kde bylo použito aktuální rasové spektrum. Významné změny byly dány výskytem nových ras, které překonávají rezistenci řady dříve odolných odrůd. Epidemický výskyt rzi plevové, ale i možné epidemie dalších chorob, např. rzi travní, zvyšují zájem o odolnost pěstovaných odrůd pšenice. Při využívání odrůdové odolnosti je třeba vycházet z místních zkušeností s výskytem chorob a brát na ně ohled při volbě odrůd.

Výskyt klasových fuzarióz včetně akumulace mykotoxinů i rzi plevové je ovlivněn podmínkami daného ročníku. Epidemie rzi plevové souvisí s výskytem nových ras tolerantních k vyšším teplotám, pro jejichž šíření je příznivý průběh posledních dvou zim.

#### LITERATURA

- /1/ West J.S., Holdgate S., Townsend J.A., Edwards S.G., Jennings P. Fitt B.D.L. Impacts of changing climate and agronomic factors on fusarium ear blight of wheat in the UK. *Fungal Ecol.*, 5, 2012: 53–61.
- /2/ Sýkorová, S., Šíp, V., Nevřklová, M., Sypecká, Z., Hajšlová, J., Hýsek, J.,: The survey of Fusarium mycotoxins content in grain of winter wheat cultivars collected from different regions of Czech Republic. In: Pogna, N.E., Romano, M., Pogna, E.A., Galterio, G. (eds.) *Proceedings of the 10th International Wheat Genetics Symposium*. September 1-6, 2003. Paestum, Italy: 1266 – 1268.
- /3/ Šíp, V., Chrpová, J., Sýkorová, S.: Assessing resistance to head blight in wheat cultivars inoculated with different Fusarium isolates. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 44, 2008: : 43-59.
- /4/ Polišínská, I., Jirsa, O., Salava, J., Matušinský, P., Prokeš, J.: Fuzáriové mykotoxiny a patogeny Fusarium v obilovinách sklizně roku 2009. *Obilnářské listy*, 18, 2010: 12-16.
- /5/ Hovmoller M.S., Sorensen, C.K., Walter S., Justensen, A.F.: diversity of *Puccinia striiformis* on cereal and grasses. *Ann. Rev. Phytopathol.* 49, 2011: 197-217.

- /6/ Mhoup M., Bahri B., Leconte M., deVallavieille-Pope, C., Kaltz, O., Enjalbert, J.: Genetic structure and local adaptation of European wheat yellow rust populations: the role of temperature specific-adaptations. *Evolutionary applications*, 5, 2012: 341-352.
- /7/ Bártová, Š., Šíp, V., Chrpová, J., Štočková, L. Klasové fuzariózy pšenice a predikce rizika napadení Úroda, 58, 2010: 8 - 10

### **Poděkování**

Příspěvek byl zpracován s podporou projektu QJ 1210189 a s využitím institucionálního příspěvku RO0415.

## VPLYV TEPLOTNÝCH A ZRÁŽKOVÝCH EXTRÉMOV NA VZNIK A ŠÍRENIE CHORÔB PRI VYBRANÝCH DRUHOCH LESNÝCH DREVÍN

### *EFFECT OF AIR TEMPERATURE AND RAINFALL EXTREMES ON OCCURRENCE AND SPREAD OF DISEASES IN THE SELECTED FOREST TREE SPECIES*

Milan Bolvanský, Jozef Pažitný, Katarína Adamčíková

Ústav ekológie lesa SAV vo Zvolene, Pobočka biológie drevín v Nitre, Akademická 2, 94901 Nitra, milan.bolvansky@savzv.sk

#### *Summary*

It is now recognized that climate change will affect the pathogen, the host and the interaction between them, resulting in changes in disease impact. Climate change, when combined with pathogen and host introductions, may result in unprecedented effects. Drought is expected to lead to increased frequency of tree pathogens, mainly through indirect effects on host physiology. Severe drought conditions in 1996 in a dry inner Alpine valley and the extremely dry and hot summer of 2003 in the Southern Alps accelerated growth decline and caused death of *Castanea sativa* trees infected by *Cryphonectria parasitica*. The same meteorological conditions triggered occurrence of chestnut blight damages in old chestnut orchards and stands in Slovakia in the particular years during period 1976 – 2009. Relationship between occurrence of chestnut blight damages and preceding warm winter was recorded.

*Key words: climate change, pathogens, Castanea sativa, Cryphonectria parasitica, drought*

#### **Súhrn**

V súčasnosti sa všeobecne uznáva, že nastupujúca klimatická zmena ovplyvňuje patogény, hostiteľov, ako aj interakcie medzi nimi a prejavuje sa zmenami v účinku choroby. V kombinácii s introdukciou patogénov a hostiteľov môže mať nečakaný výsledok. Predpokladá sa, že najmä sucho vedie k zvýšenému účinku patogénov drevín, hlavne v dôsledku jeho vplyvu na fyziológiu hostiteľa. Kruté suchá v roku 1996 a extrémne suché a horúce leto roku 2003 zapríčinili v časti talianskych a švajčiarskych Álp uhynutie gaštanov napadnutých druhom *Cryphonectria parasitica*. Rovnaké meteorologické podmienky v niektorých rokoch obdobia 1976 – 2009 boli príčinou prvého výskytu rakoviny gaštana v starých gaštanových sadoch na Slovensku. Zvýšený výskyt vysychania stromov gaštana v dôsledku rakoviny kôry bol pozorovaný v rokoch začínajúcich teplou zimou.

*Kľúčové slová: klimatická zmena, patogény, Castanea sativa, Cryphonectria parasitica, sucho*

## **ÚVOD**

Väčšina chorôb rastlín je silne ovplyvňovaná podmienkami prostredia, preto nastupujúca klimatická zmena môže ovplyvniť aj patogény hostiteľov, ako aj interakcie medzi nimi a prejavíť sa zmenami v účinku choroby. Klimatická zmena v kombinácii s introdukciou patogénov a hostiteľov môže mať nečakané následky [8, 13]. Choroby, ktoré v minulosti nespôsobovali hostiteľom veľké poškodenia v súčasnosti vyvolávajú aj ich odumieranie. Hoci počet správ o odumieraní lesov, ich chradnutí a mortalite pripisovanej klimatickým vplyvom narastá, je ťažké vyhodnotiť či klíma „samotná“ spôsobuje odumieranie lesných drevín. Keďže vplyv klímy sa neprejavuje tak jednoznačne, ako sa prejavuje patogén, vedecká komunita sa musí spoliehať na nepriame dôkazy. Predpokladá sa, že sucho vedie k zvýšenému poškodzovaniu drevín patogénmi, hlavne v dôsledku jeho nepriameho vplyvu na fyziológiu hostiteľa [6]. Sucho zoslabuje hostiteľa a

môže aj priamo poškodzovať zdravie stromov a spôsobovať ich vysychanie. Takto môžu pôsobiť aj ďalšie abiotické faktory, ako sú nedostatok výživy, alebo znečistenie ovzdušia /3/.

Sturrok et al. /11/ delia choroby drevín a ich pôvodcov do troch skupín. Sú to choroby zapríčinené patogénmi, ktoré sú priamo ovplyvnené klímou, choroby vyvolané patogénmi, ktoré sú nepriamo ovplyvnené klímou a choroby chradnutia drevín spôsobené primárne abiotickými činiteľmi.

Patogény, ktorých fyziológia je priamo ovplyvnená klímou môžu vyvolať chorobu aj v prípade zdravých, životaschopných hostiteľov, ak sú splnené environmentálne požiadavky patogénov. Ich životný cyklus je priamo ovplyvňovaný teplotou a vlhkosťou. Napr. mnohé patogény spôsobujúce choroby ihličia sú citlivé na zrážky a vlhkosť, a rýchlosť ich reprodukcie, šírenia a rozsah infekcie sú väčšie pri vyššej vlhkosti /7/. V týchto prípadoch zmeny v teplote a vlhkosti viac ovplyvňujú patogéna, nezávisle od ich vplyvu na hostiteľa. Medzi týchto patogénov patrí aj pôdna huba *Phytophthora cinnamomi*, jedna s najdeštruktívnejších húb rodu *Phytophthora*, ktoré napádajú dreviny. Tento patogén sa vyskytuje väčšinou v miernych a subtropických oblastiach sveta a spôsobuje choroby viac ako 1000 hostiteľských druhov. Infekcia spôsobená druhom *P. cinnamomi* a niektorými príbuznými druhmi má za následok koreňovú hnilobu a rakovinu stromov. Táto rakovina sa prejavuje na báze kmeňa a pri druhoch rodu *Castanea* sa nazýva atramentová choroba, nakoľko poškodené podkôrne pletivá na báze kmeňa majú tmavofialovú až modrú farbu. Zápľavy a suchá sa všeobecne považujú ako spúšťače epidémie. Zmeny klimatických podmienok zaznamenané za posledných 60 rokov, ako sú zvyšovanie priemerných zimných teplôt, presun sezónnych zrážok z leta do zimy a častejší výskyt silných dažďov podporujú vznik infekcií spôsobovaných viacerými druhmi rodu *Phytophthora* v Strednej Európe.

Patogény, ktorých účinok je nepriamo ovplyvnený klímou majú tendenciu infikovať hostiteľov, ktoré môžu byť stresované aj environmentálnymi faktormi, alebo živočíšnymi škodcami. Takéto patogény môžu niekedy napadnúť zdravých hostiteľov a zostať latentné, až kým hostiteľ nebude v strese. Zatiaľ čo schopnosť patogénov sporulovať, šíriť sa a infikovať hostiteľov je ovplyvnená teplotou a vlhkosťou prostredia, faktory, ktoré stresujú ich hostiteľov sú často rozhodujúce o ich úspešnej invázii na hostiteľa. Do tejto skupiny patria aj rakovínovorné patogény, ktoré sú schopné infikovať životaschopné stromy. Rakovinu vyvolávajúce huby však s väčšou pravdepodobnosťou dosiahnu epidemickú úroveň a spôsobia závažné poškodenia tým stromom, ktoré sú zoslabené stresom z horúčav a sucha /9, 10/. Väčšina rakovínovorných chorôb je spôsobovaná fakultatívnymi parazitmi, ako sú druhy *Biscogniauxia* (*Hypoxylon*), *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Septoria* a *Valsa* /6/. Patrí sem aj rakovina kôry gaštanu spôsobená parazitickou hubou *Cryphonectria parasitica*. Zistilo sa, že kruté suchá v roku 1996 a extrémne suché a horúce leto roku 2003 zapríčinili v časti talianskych a švajčiarskych Álp uhynutie gaštanov napadnutých druhom *Cryphonectria parasitica* /12, 5/. V podmienkach Slovenska bola vysoká frekvencia výskytu nových rakovinových rán na gaštane jedlom a jeho hybridoch s japonským gaštanom pozorovaná po teplej zime a nižší výskyt rakovinových rán bol pozorovaný v rokoch s nadpriemernými zrážkami /2/.

Chradnutie lesov spôsobujú choroby vyvolané komplexom predispozičných, iniciačných a spolupôsobiacich faktorov. V dôsledku nahromadenia týchto komplikácií je strom postupne menej schopný vytvárať, uchovávať a mobilizovať uhľohydráty. Ich nedostatok vyvoláva symptómy „odumierania“ a keď sa situácia výrazne nezlepší, strom môže aj uhynúť. Známe je odumieranie troch druhov drevín: odumieranie dubov (*Quercus* spp.), cyprušteka nutkanského (*Chamaecyparis nootkatensis*) a topoľa osikovitého (*Populus tremuloides*). Odumieranie dubov je v celosvetovom meradle spôsobené interakciami medzi environmentálnymi stresormi (suchá, znečistenie, nízke zimné teploty a zápľavy), hmyzom a patogénmi (napr. *Armillaria* a *Phytophthora* sp.). Odumieranie cyprušteka nutkanského vyskytujúce sa najmä v lesoch Aljašky je spôsobené hmyzom (*Phloeosinus beetles*) a patogénmi (*Armillaria* sp. a iné huby), no

predispozičné faktory sú stanovištné a porastové podmienky, ako aj mrazy v predjarí, ktoré spôsobujú vymrzanie jemných koreňov stromov. Odumieranie topoľa osikovitého v niektorých oblastiach Severnej Ameriky sa deje bez účasti patogénov alebo hmyzu a je charakteristické pre celé oblasti, nielen porasty. Ukázalo sa, že veľké suchá a rekordne vysoké teploty v roku 2002 mohli byť spúšťačom tohto odumierania /11/.

Vzhľadom na prevažujúci vplyv sucha ako spúšťača chorôb spôsobených rôznymi kategóriami patogénov sa gaštan jedlý javí ako vhodná modelová drevina na sledovanie závislosti medzi vznikom rakoviny kôry a extrémami teploty vzduchu a zrážok. Túto závislosť sme sa pokúsili dokumentovať na príklade starých gaštanových sadov a porastoch napadnutých rakovinou kôry, nachádzajúcich sa na Slovensku.

## MATERIÁL A METÓDY

Do hodnotenia boli zahrnuté gaštanové sady a porasty z juhozápadného Slovenska a južnej časti stredného Slovenska tvorené viac ako 30 stromami staršími ako 50 rokov, ktoré boli do väčšej alebo menšej miery odumreté v dôsledku napadnutia rakovinou kôry gaštana. Z evidovaných 50 lokalít a stanovišť gaštana jedlého napadnutých rakovinou kôry (Adamčíková, K. et al. 2014) sa hodnotilo 18 stanovišť nachádzajúcich sa na 12 lokalitách, pričom na lokalite Bratislava to boli 4 stanovištia, na lokalite Modrý Kameň 3 a na lokalite Stredné Plachtince 2 stanovištia.

Základom hodnotenia bolo porovnanie prvého zaznamenaného výskytu rakoviny kôry, resp. prvého odumierania konárov alebo celých stromov na tom ktorom stanovišti s meteorologickými charakteristikami – teplotou vzduchu a zrážkami. Boli zvolené dve metódy hodnotenia. Prvá metóda bola založená na vypočítaní rozdielov medzi dvojročným priemerom (rok prvého výskytu rakoviny a rok predchádzajúci) a dlhodobým (40 – 50 ročným) priemerom oboch meteorologických prvkov pre všetky sledované lokality, resp. stanovištia. Pri druhej metóde sa hodnotili teplota vzduchu a zrážky na lokalitách gaštana, kde sa gaštan nachádza na viacerých stanovištiach, na ktorých bol prvý výskyt rakoviny zaznamenaný v rôznych rokoch (Bratislava, Modrý Kameň, Plachtince). Okrem rokov s prvým výskytom rakoviny sa hodnotili aj ostatné roky, spolu 28 rokov.

Pri oboch metódach boli hodnoty teploty vzduchu a sumy zrážok použité na výpočet klimatologického indexu nazývaného Langov dažďový faktor (LDf), ktorým sa charakterizuje stupeň suchosti určitého územia. Vypočíta sa ako pomer sumy ročných zrážok v mm a priemernej ročnej teploty vzduchu v °C. Pri druhej metóde sa použil modifikovaný LDf, vypočítaný pre určité obdobie roka.

Hodnoty teploty vzduchu a zrážok za obdobie posledných 50 rokov boli z klimatických staníc Bratislava – Koliba, Slovenský Grob, Veľké Ripňany, Topoľčany, Nitra, Tesárske Mlyňany, Bzovík, Dolné Plachtince a Lučenec poskytnuté Slovenským hydrometeorologickým ústavom v Bratislave. Ak bola k hodnotenej lokalite bližšie iná zrážkomerná stanica, použili sa údaje zrážok z tejto stanice.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Rozdiely medzi dlhodobými a dvojročnými priemerami teplôt vzduchu (vypočítanými za rok s prvým výskytom rakoviny gaštana na lokalite a jemu predchádzajúci rok) sa postupne zvyšovali, no zároveň sa zvyšovali aj obdobné rozdiely zrážok, čo znamená znižovanie ich deficitu. Najlepšie tento trend bol badateľný pri zoskupení rokov podľa predpokladaných „infekčných vln“.

Pri prvej infekčnej vlne a vôbec prvom výskyte rakoviny gaštana na Slovensku na lokalite Duchonka bola priemerná teplota za roky 1975 a 1976 o 0,2 °C vyššia a suma zrážok o 73 mm nižšia ako dlhodobé priemery oboch prvkov. Pomer zrážok a teploty (LDf) vypočítaný pre spomínané roky bol zo všetkých sledovaných rokov (1976 – 2009) najnižší, čiže išlo o kriticky suché dvojročné obdobie (tab. 1). Deficit zrážok bol zaznamenaný aj pri druhej vlne výskytu

rakoviny na Slovensku, v rokoch 1988 – 1992, s výnimkou uvažovaného obdobia rokov 1987-1988 pre Bratislavu. V priemere bol ročný deficit zrážok za roky 1988 – 1992 cca 30 mm a priemerná teplota bola vyššia len o 0,1 °C. Pri tretej infekčnej vlne už boli ročné zrážky vyššie oproti dlhodobému priemeru (+ 35mm), no vyššie boli aj priemerné ročné teploty (+ 0,51 °C). Pri štvrtej vlne infekcie (rakoviny kôry) bola priemerná ročná suma zrážok ešte vyššia (+ 70mm), no v porovnaní s dlhodobým normálom výrazne stúpli aj priemerné ročné teploty (+ 1,22 °C). Pri medziročnom porovnaní teplôt a zrážok sa ukázalo, že na sledovaných lokalitách sa za 10 rokov (1989 – 2009) zvýšila priemerná teplota vzduchu až o 0,8 °C. Osobitné postavenie v tomto ohľade má lokalita Prašice-Duchonka kde dlhodobý priemer teploty (9,8 °C) nameraný na klimatickej stanici v Topolčanoch (11 km na JJV) bol druhou najvyššou hodnotou po hodnote nameranej na klimatickej stanici v Slovenskom Grobe (10,1 °C). Dlhodobá ročná suma zrážok (619 mm) zaznamenaná na tejto lokalite bola v porovnaní s dlhodobými ročnými sumami zrážok na iných lokalitách priemerná. Teplý a suchý charakter lokality Prašice-Duchonka bol umocnený ešte južnou expozíciou svahu s gaštanovým sadom.

Prepuknutie choroby podmieňujú tak teplé a suché roky, ako aj kvalita konkrétnych stanovištných podmienok. Na lokalitách kde sa gaštan vyskytuje na viacerých stanovištiach sa choroba prejavila s odstupom aj viac ako 10 rokov napriek tomu, že stanovištia boli vystavené rovnakým meteorologickým podmienkam (teplota, zrážky). Napr. na lokalite Bratislava v gaštanovom sade na Jeséniovej ulici sa rakovina kôry prvý krát objavila až v roku 2007, teda necelých 20 rokov po výskyte rakoviny v starom gaštanovom sade na Vančurovej ulici (1988), ktorý je od sadu na Jeséniovej ulici vzdialený iba cca 500 m. Stanovištné podmienky tu pravdepodobne umožnili zachovanie vyššej pôdnej vlhkosti aj v suchých a teplých rokoch. V súlade s týmto faktom je aj zvýšené odumieranie gaštanov na južných svahoch Švajčiarskych Álp po suchom a teplom lete 2003, ktoré sa prejavilo najmä na stanovištiach s plytkou pôdou a na lesných okrajoch /5/.

Pri hodnotení príčin výskytu rakoviny kôry gaštana jedlého na 8 stanovištiach lokalít Bratislava, Modrý Kameň a Stredné Plachtince pomocou Langovho faktora sa nezistili výrazné rozdiely medzi sledovanými rokmi a indexy vypočítané pre vybrané suchšie, resp. teplejšie roky boli takmer rovnaké ako indexy vypočítané pre 50 až 60-ročné priemery teplôt a ročných súm zrážok pre danú klimatickú stanicu. Tento faktor totiž nezohľadňuje výkyvy zrážok a teplôt počas roka, a preto sme použili modifikovaný faktor, ktorý sa vypočítal na základe sumy zrážok a priemernej teploty za letné obdobie (jún, júl, august).

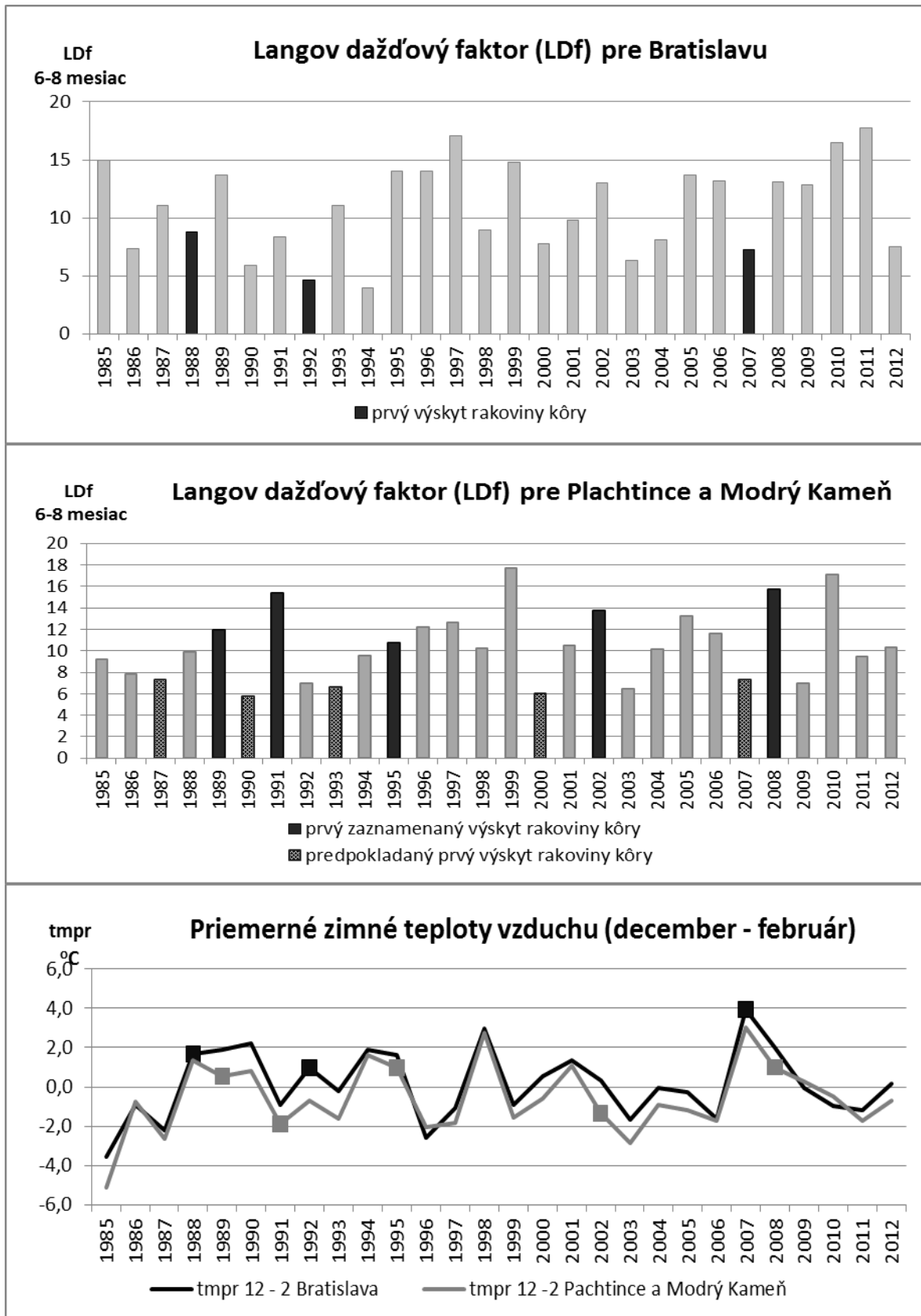
Hodnoty modifikovaného LDF vypočítané z údajov klimatickej stanice Bratislava-Koliba boli v rokoch prvého výskytu rakoviny kôry gaštana na jednotlivých stanovištiach gaštana v Bratislave výrazne nižšie, až polovičné, oproti predchádzajúcim rokom (graf 1). Pritom priebeh teplôt sa nijako zvlášť nelíšil od predchádzajúcich rokov, významný je však deficit zrážok, ktorý sa odráža na vypočítaných hodnotách modifikovaného LDF.

Hodnoty modifikovaného LDF vypočítané pre lokality Plachtince a Modrý Kameň z údajov teplôt a zrážok získaných z klimatickej stanice v Dolných Plachtinciach neboli však najnižšie v roku, keď bol prvý krát zaznamenaný výskyt rakoviny kôry na jednotlivých stanovištiach týchto lokalít. Výrazne nižšie hodnoty sa vyskytli o 1-2 roky skôr.

Podobne aj vyššie zimné teploty sa vyskytli o 1-2 roky skôr, ako v roku prvého zaznamenaného výskytu rakoviny kôry (graf 1). Môže to byť spôsobené tým, že na týchto lokalitách sa nerobil monitoring výskytu rakoviny kôry tak dôkladne ako v Bratislave a rok prvého zaznamenaného výskytu rakoviny kôry nemusí byť skutočným rokom výskytu tejto choroby na danom stanovišti.

Tab. 1 Rozdiely medzi 2-ročným priemerom (rok prvého výskytu rakoviny kôry a predchádzajúci rok) a dlhodobým priemerom v teplote vzduchu a sume zrážok a Langov dažd'ový faktor ( $LDf = \text{suma ročných zrážok/priemerná ročná teplota}$ ) pre sledované lokality resp. stanovišťa na lokalitách (so sivým pozadím sú označené stanovišťa lokalít Bratislava, Plachtince a Modrý Kameň hodnotené aj druhým spôsobom).

Lokalita resp. Lokalita - stanovište	Teplota vzduchu v °C			Suma zrážok v mm			LDf		Prvý výskyt rakoviny kôry
	2-ročný priemer	Dlhodobý priemer	Rozdiel	2-ročný priemer	Dlhodobý priemer	Rozdiel	2-ročný priemer	Dlhodobý priemer	rok
Prašice-Duchonka	10,0	9,8	<b>0,2</b>	546	619	<b>-73</b>	54,47	62,91	1976
Bratislava - Vančurova	10,0	9,7	0,3	700	659	41	70,35	67,94	1988
Stredné Plachtince-Chrb	9,7	9,6	0,1	561	605	-45	57,78	63,02	1989
Svätý Jur	10,3	10,1	0,2	644	659	-15	62,82	65,25	1991
Radošina	9,2	9,6	-0,3	595	619	-25	64,45	64,71	1991
Limbach	9,9	9,7	0,2	667	735	-68	67,32	75,75	1991
Modra	9,9	9,6	0,3	590	674	-84	59,63	70,23	1991
M. Kameň- Gaštanová	9,4	9,7	-0,3	601	605	-4	63,94	62,37	1991
Bratislava - Sliachka	10,1	9,6	0,5	614	659	-46	61,04	68,65	1992
<b>Priemer</b>	<b>9,80</b>	<b>9,70</b>	<b>0,10</b>	<b>621,29</b>	<b>651,87</b>	<b>-30,59</b>	<b>63,42</b>	<b>67,23</b>	
M. Kameň -Medvecka	10,1	9,6	0,5	658	605	53	65,47	63,02	1995
Horné Lefantovce	10,4	9,6	0,8	641	619	22	61,65	64,48	1995
S.Plachtince - Pavlovova	10,1	9,6	0,4	683	605	78	67,65	63,02	2002
Tlstý Vrch	9,5	9,1	0,4	585	597	-13	61,53	65,60	2003
<b>Priemer</b>	<b>10,01</b>	<b>9,48</b>	<b>0,51</b>	<b>641,74</b>	<b>606,50</b>	<b>35,24</b>	<b>64,09</b>	<b>64,01</b>	
Bratislava - Klenová	11,0	9,7	1,3	743	659	84	67,85	67,94	2007
Bratislava - Jeséniova	11,0	9,7	1,3	743	659	84	67,85	67,94	2007
Jelenec	9,9	9,0	0,9	647	619	28	65,30	68,78	2007
M. Kameň - Drieňová	11,0	9,6	1,4	671	605	66	60,96	63,02	2008
Krná	10,4	9,1	1,3	696	605	91	66,92	66,48	2009
<b>Priemer</b>	<b>10,64</b>	<b>9,42</b>	<b>1,22</b>	<b>699,85</b>	<b>629,40</b>	<b>70,45</b>	<b>65,77</b>	<b>66,82</b>	



Graf 1: Langov daždový faktor za mesiace júl - august a priemerné zimné teploty vzduchu za roky 1985 -2012 pre lokality Bratislava, Plachtince a Modrý Kameň. Štvorčekmi sú označené roky prvého zaznamenaného výskytu rakoviny kôry gašтана na jednotlivých stanovištiach uvedených lokalít



Ukazuje sa, že horúčavy a suchá v letnom období, keď sú stromy na vrchole vegetácie, pôsobia ako veľký stresujúci faktor. Už dávnejšie sa pozorovalo, že v uvedenom období rakovinu vyvolávajúce huby s väčšou pravdepodobnosťou dosiahnu epidemickú úroveň a spôsobujú závažné poškodenia stresom zoslabeným stromom /9, 10/. Najmä častejší výskyt letného sucha zvyšuje pravdepodobnosť infikovania stromov patogénom, ktorého aktivita je uľahčená stresom hostiteľa, ako je to pri koreňových patogénoch, kolonizátoroch rán a latentných kolonizátoroch beľového dreva /4, 8, 6/.

#### LITERATÚRA

- /1/ Adamčíková, K., Kobza, M., Juhásová, G., Ondrušková, E., Bolvanský, M., Kádasi-Horáková, M.: Gaštan jedlý na Slovensku a v Európe. Pestovanie, ochrana, variabilita a využitie. Nitra, 2014, 156 s. ISBN 978-80-89408-18-4
- /2/ Bolvanský, M., Kobza, M., Juhásová, G., Adamčíková, K., Ostrovský, R.: Spread of chestnut blight in a plantation of young *Castanea sativa* and *Castanea* hybrids. *Acta Hort.* 815, 2009: 261-270.
- /3/ Boyce J.,S.: *Forest Pathology*, 3rd edn. New York, USA: McGraw Hill Book Co. 1961
- /4/ Brasier C.,M., Scott J.,K., European oak declines and global warming: a theoretical assessment with special reference to the activity of *Phytophthora cinnamomi*. *EPPO Bulletin* 24, 1994:221–32.
- /5/ Conedera, M., Barthold, F., Torriani, D. and Pezzatti, G.B.: Drought sensitivity of *Castanea sativa*: Case study of summer 2003 in the Southern Alps. *Acta Hort.* 866, 2010: 297-302
- /6/ Desprez-Loustau, M.L., Marçais, B., Nageleisen L.M., Ouyim, D. and Vannini, A.: Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Annals of Forest Science* 63, 2006: 597–612.
- /7/ Harvell, C.,D., Mitchell C.E., Ward, J.R., Altizer, S., Dobson, A.P., Ostfeld, R.S. and Samuel, M.D.: Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* 296, 2002: 2158–62.
- /8/ Lonsdale, D., Gibbs, J. N.: Effects of climate change on fungal diseases of trees. In: Broadmeadow MSJ, ed. *Climate Change: Impacts on UK Forests*. Forestry Commission, Edinburgh, UK: Forestry Commission: *Bulletin* 125, 2002: 83–97.
- /9/ Schoeneweiss, D.F.: Predisposition, stress, and plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 13, 1975: 193–211.
- /10/ Schoeneweiss, D.F.: Infectious diseases of trees associated with water and freezing stress. *Journal of Arboriculture* 7, 1981: 3–8.
- /11/ Sturrock, R. N., Frankel, S. J., Brown A. V., Hennon, P. E., Kliejunas, J. T., Lewis, K. J, Worrall, J. J. and Woods, A. J.: Climate change and forest diseases, *Plant Pathology* 60, 2011: 133–149
- /12/ Waldboth, M. and Oberhuber, W.: Synergistic effect of drought and chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*) on growth decline of European chestnut (*Castanea sativa*). *For. Path.*39, 2009: 43–55.
- /13/ Wingfield, M. J., Slippers, B., and Wingfield, B. D.: Novel associations between pathogens, insects and tree species threaten world forests. *New Zealand Journal of Forestry Science* 40, 2010: 95–103.

#### Pod'akovanie

Uvedená práca vznikla za finančnej podpory projektu VEGA 2/0143/15.

## KOŘENOVÝ SYSTÉM MEZIPLODIN JAKO FAKTOR ELIMINACE ZTRÁT DUSÍKU VYPLAVOVÁNÍM

### *THE ROOT SYSTEM OF COVER CROPS AS A FACTOR OF NITROGEN LEACHING REDUCTION*

Jana Klimešová, Tomáš Středa, Martin Hajzler

Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství, Zemědělská 1, 613 00 Brno, jana.klimesova@mendelu.cz

#### *Summary*

A field trial with eight varieties of mustard (*Sinapis alba* L.) was established in 2011 and 2012 at Troubsko and Horní Třešňovec localities. The root system size (RSS) was assessed in three growth stages (stem elongation, flowering, ripening) by measuring its electrical capacity. After harvest, the concentration of ammonium and nitrate ions in the soil was determined. The relationship between RSS and nitrogen ions concentration was not statistically significant in 2011. The important but statistically insignificant negative correlation was found at both localities in 2012. The statistically significant effect of variety on the RSS in all environments was assessed. The varieties Medicus and Seco were characterized by the smallest root system, Sirte and Semper created the biggest one.

*Key words: mustard, Sinapis alba, root system size, nitrogen leaching, nitrate*

#### *Souhrn*

Polní pokus s osmi odrůdami hořčice bílé (*Sinapis alba* L.) byl veden v letech 2011 a 2012 na lokalitách Troubsko a Horní Třešňovec. Ve třech vegetačních fázích (prodlužovací růst, kvetení, zrání) byla hodnocena velikost kořenového systému (VKS) odrůd metodou měření jeho elektrické kapacity. Po sklizni plodiny byla stanovena koncentrace amonných a nitrátových iontů v půdě. Vztah VKS a koncentrace dusíkatých iontů v půdě v roce 2011 nebyl statisticky průkazný. V roce 2012 byla na obou lokalitách nalezena výrazná, ale statisticky neprůkazná negativní závislost. Byl zjištěn statisticky průkazný vliv odrůdy na velikost kořenového systému ve všech prostředích. Nejmenší kořenovým systémem se vyznačovaly odrůdy Medicus a Seco, nejvyšších hodnot VKS dosáhla odrůda Sirte a Semper.

*Klíčová slova: hořčice bílá, Sinapis alba, velikost kořenového systému, vyplavování dusíku, nitráty*

## ÚVOD

Kořenový systém je často opomíjenou částí rostlin, která je však pro jejich růst a vývoj nepostradatelná. Příjem vody a živin je primárně závislý na vlastnostech kořenového systému. Architektura a velikost kořenového systému mohou být v nepříznivých podmínkách prostředí klíčové pro přežití rostliny nebo dosažení uspokojivého výnosu. Meziplodiny mohou v meziorostním období čerpat živiny z půdy do fytomasy, a tím omezovat ztráty živin, především dusíku, vyplavováním z půdního profilu. Pro snížení ztrát dusíku, přítomného v půdě v nitrátové formě, a jeho uchování pro následnou plodinu, je tak doporučováno zařazení meziplodin do osevního postupu /1, 3/. Intenzivní fixace dusíku je značně rozdílnou druhovou záležitostí /6/. Rozložení kořenového systému je výrazně závislé na rozmístění živin v půdě a vlastnostech druhu či odrůdy. Například v půdě s nízkým obsahem fosforu může výběr genotypů s vhodnou architekturou zefektivnit příjem živin kořeny, a tím zvýšit výnos /4/. Pro efektivní příjem dusíku je nutné vybírat druhy a odrůdy meziplodin s vhodnou stavbou kořenového systému a potenciálem

pro vysoký výnos biomasy jako sinku poutaného dusíku a studovat rozdíly v růstu a schopnosti kořenů efektivně poutat živiny z půdy /5/.

## MATERIÁL A METODA

Dvouletý polní pokus byl veden v letech 2011 a 2012 v České republice na lokalitách Troubsko a Horní Třešňovec. Osm odrůd hořčice bílé (*Sinapis alba* L.) Medicus, Seco, Semper, Severka, Sirte, Sito, Veronika a Zlata bylo vyseto ve čtyřech opakováních v maloparcelovém pokusu. Ve fázi prodlužovacího růstu (BBCH 30), kvetení (BBCH 60) a zrání (BBCH 70) byla zjišťována velikost kořenového systému (VKS) pomocí metody měření jeho elektrické kapacity /2/. Tato nedestruktivní metoda je založena na měření elektrického náboje, akumulovaného na buněčných stěnách živých pletiv, a proto je schopna detekovat i jemné kořenové struktury, které nelze jinými metodami v polních podmínkách zaznamenat. Po sklizni porostu hořčice (BBCH 70) byly odebrány vzorky půdy pro stanovení obsahu anorganického dusíku. Analýzou variance a následným testováním Tukeyovým HSD testem ( $p \leq 0,05$ ) byly zjištěny rozdíly ve velikosti kořenového systému vybraných odrůd. Korelační analýza byla využita pro kvantifikaci závislosti VKS a koncentrace amonných a nitrátových iontů v půdě po sklizni plodiny. Data byla zpracována v programu Statistica 12.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

Velikost kořenového systému byla hodnocena ve třech termínech vegetace hořčice. Korelační analýzou byla zjištěna míra závislosti VKS a koncentrace amonných a nitrátových iontů v půdě v době sklizně porostu. Podrobný popis korelačních vztahů uvádí Tab. 1.

Tab. 1: Tabulka korelačních koeficientů závislosti VKS měřené ve třech vegetačních fázích a koncentrace amonných a nitrátových iontů v půdě.

		Troubsko				Horní Třešňovec			
		Prodlužovací růst	Kvetení	Zrání	Průměr	Prodlužovací růst	Kvetení	Zrání	Průměr
2011	N – NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,156	-0,162	-0,354	-0,128	0,512	0,070	-0,368	0,055
	N – NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-0,438	-0,259	-0,361	-0,452	-0,078	0,131	-0,139	-0,021
2012	N – NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-0,048	0,425	-0,110	0,148	-0,123	-0,527	-0,520	-0,453
	N – NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-0,231	-0,651	-0,389	-0,501	-0,237	-0,285	-0,245	-0,311

\*)  $n = 8$

V roce 2011 byl zaznamenán negativní vztah VKS a koncentrace iontů dusíku především na lokalitě Troubsko. Na lokalitě Horní Třešňovec neměla velikost kořenového systému vliv na zásobu dusíku v půdě, (avšak množství nitrátových aniontů v půdě po ukončení vegetace rostlin bylo výrazně nižší v porovnání s lokalitou Troubsko). Vliv VKS se zvyšoval s délkou vegetační doby na obou lokalitách. V době zralosti kořenový systém nejvíce ovlivní obsah dusíkatých iontů v půdě. Výrazný negativní vztah VKS a koncentrace amonných iontů byl zaznamenán ve fázi prodlužovacího růstu. Větší kořenový systém byl pravděpodobně účinnějším nástrojem pro příjem této živiny ve fázi intenzivní tvorby nadzemní biomasy.

V suchém roce 2012 byly kontrastně v porovnání s rokem 2011 zjištěny vyšší hodnoty korelačních koeficientů na lokalitě Horní Třešňovec. Tyto rozdílné tendence lze přisuzovat odlišným vláhovým poměrům lokalit a průběhu počasí v daném roce. Vliv VKS na zůstatek anorganického dusíku v půdě se v roce 2012 projevil silněji a již v průběhu vegetační fáze kvetení v porovnání se srážkově příznivějším rokem 2011. Kořenový systém hořčice se v roce 2012 efektivněji podílel na snížení koncentrace dusíku v půdě po sklizni porostu.

Na lokalitě Troubsko lze v obou letech pozorovat intenzivní (statisticky neprůkazné) čerpání především amonné formy dusíku ( $r = -0,651$ ). Koncentrace nitrátů nebyla ovlivněna velikostí kořenového systému hořčice. Po sklizni plodiny se v půdě nacházel v koncentraci 32,8 – 44,1  $\text{mg.kg}^{-1}$  v porovnání s obsahem iontů amonných (1,9 – 4  $\text{mg.kg}^{-1}$ ).

Horní Třešňovec je lokalita s méně úrodnými půdami, nižší průměrnou roční teplotou vzduchu a vyššími ročními srážkovými úhny. V roce 2012 zde byl zjištěn nejtěsnější, ale statisticky neprůkazný vztah mezi VKS a obsahem nitrátových iontů již ve fázi kvetení ( $r = -0,527$ ) a zrání ( $r = -0,520$ ). Nitrátový dusík byl na této lokalitě sorbován rostlinami významně více než dusík amonný. Čerpání dusíku jednotlivými odrůdami podléhá silnému vlivu prostředí.

Vztah velikosti kořenového systému a koncentrace dusíkatých iontů v půdě po sklizni plodiny nebyl statisticky průkazný. V roce 2011 se neprojevil vliv VKS. V roce 2012 byla na obou lokalitách nalezena významná ale statisticky neprůkazná negativní závislost.

Analýza variance potvrdila statisticky průkazný vliv odrůdy na velikost kořenového systému. Rozdíly byly zjištěny v roce 2011 i 2012 na obou lokalitách. Ve srážkově příznivém roce 2011 byla nalezena vyšší variabilita v tvorbě biomasy kořenů vybraných odrůd v porovnání s rokem 2012. Vliv odrůdy se statisticky významně projevoval v průběhu celé vegetační doby, především ve fázi zrání. Ačkoliv lze úrodnost pokusných lokalit považovat za kontrastní, nebyla VKS odrůd na jednotlivých stanovištích odlišná. Téměř ve všech vegetačních fázích disponovaly nejmenším kořenovým systémem odrůdy Medicus a Seco, následovány v roce 2011 odrůdou Severka v roce 2012 odrůdou Veronika. Ve všech ročnicích a na obou lokalitách se vyznačovaly největším kořenovým systémem odrůdy Sirte a Semper. Statisticky průkazné rozdíly průměrné VKS z obou lokalit odrůd hořčice uvádí Tab. 2.

Velikost kořenového systému hořčice bílé je znakem silně genotypově podmíněným a jen málo ovlivněn faktorem prostředí. Rostliny s vysokými hodnotami VKS ve vláhově příznivém prostředí (ročníku) mají potenciál tvořit velký kořenový systém i za stresu suchem. Této vlastnosti lze využít v procesu šlechtění odrůd pro screening genetického materiálu ve všech prostředích.

Tab. 2. Meziodrůdové rozdíly ve velikosti kořenového systému ( $nF$ ) hořčice seté ve třech vegetačních fázích v roce 2011 a 2012 (Průměrné hodnoty VKS z obou lokalit).

2011					
Prodlužovací růst		Kvetení		Zrání	
Medicus	0,852 a	Veronika	0,595 a	Medicus	0,456 a
Seco	0,939 a	Medicus	0,618 ab	Severka	0,493 ab
Severka	0,950 a	Seco	0,645 ab	Seco	0,501 ab
Zlata	0,962 a	Severka	0,646 ab	Veronika	0,518 ab
Semper	0,989 a	Sito	0,700 abc	Sito	0,519 ab
Veronika	1,038 a	Zlata	0,735 abc	Zlata	0,581 abc
Sito	1,051 a	Semper	0,784 bc	Sirte	0,639 bc
Sirte	1,152 a	Sirte	0,839 c	Semper	0,718 c
2012					
Prodlužovací růst		Kvetení		Zrání	
Medicus	0,800 a	Veronika	0,781 a	Medicus	0,255 a
Seco	0,817 a	Medicus	0,795 a	Zlata	0,283 ab
Zlata	0,834 a	Severka	0,817 a	Veronika	0,285 ab
Veronika	0,880 ab	Seco	0,867 a	Seco	0,292 ab
Severka	0,894 ab	Zlata	0,887 a	Sito	0,301 ab
Semper	0,947 ab	Sito	0,906 a	Severka	0,313 ab
Sito	1,017 ab	Sirte	0,939 a	Semper	0,333 ab
Sirte	1,070 b	Semper	0,953 a	Sirte	0,396 b

\*) Statisticky odlišné páry hodnot jsou označeny rozdílnými písmeny.

#### **LITERATURA**

- /1/ Christian, D. G., Goodlass, G., Powlson, D. S.: Nitrogen uptake by cover crops. *Aspects of Applied Biology* 30, Nitrate and Farming Systems, 1992: 291-300.
- /2/ Chloupek, O.: The relationship between electric capacitance and some other parameters of plant roots. *Biologia Plantarum*, 1972, 14: 227-230
- /3/ Jackson, L. E., Wyland, L. J., Stivers, L. J.: Winter cover crops to minimize nitrate losses in intensive lettuce production. *Journal of Agricultural Science* 121, 1993: 55-62.
- /4/ Lynch, J. P.: Root architecture and plant productivity. *Plant Physiology* 109, 1995: 7-13.
- /5/ Thorup-Kristensen, K.: Root development of nitrogen catch crops and of a succeeding crop of broccoli. *Acta Agriculturae Scandinavica., Section B, Soil & Plant Science* 43, 1993: 58-64.
- /6/ Vos, J. & Van Der Putten, P. E. L.: Nutrient cycling in a cropping system with potato, spring wheat, sugar beet, oats and nitrogen catch crops. II. Effect of catch crops on nitrate leaching in autumn and winter. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 70, 2004: 23-31.

#### **Poděkování**

Práce vznikla za finanční podpory výzkumného projektu NAZV QJ1510098.

**VITALITA SEMEN A KOŘENOVÉHO SYSTÉMU OBILNIN*****SEED VIGOUR AND ROOT SYSTEM GROWTH OF CEREALS***

Eva Vintrlíková, Jana Klimešová, Tomáš Středa

Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Zemědělská 1, 613 00, Brno – Černá pole,  
xvintr12@mendelu.cz

***Summary***

The aim of the study was to (i) assess the possibility of selection for greater seed vigour of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) in conditions of drought and cold, (ii) to quantify the relationship between seed vigour and root system size of plants. The seed vigour was evaluated in the laboratory stress conditions for drought stress of -0.5 MPa and 10 °C (stressed treatment), and for the control treatment without drought stress at 10 °C. The root system size was evaluated by measuring its electric capacity in field conditions. The 37 genotypes of winter wheat were evaluated. Heterogeneity and differences in seed vigour and root system size between varieties were quantified. The seed vigour was correlated with the root system size.

*Key words: seed vigour, root system size, electric capacity, stress conditions, PEG 6000*

***Souhrn***

Cílem této práce bylo (i) posoudit možnosti selekce na větší vitalitu semen u pšenice obecné (*Triticum aestivum* L.) v podmínkách sucha a chladu, (ii) kvantifikovat vazbu mezi velikostí kořenového systému rodičovských rostlin a vitalitou semen. Vitalita semen byla hodnocena v laboratoři ve stresových podmínkách za působení stresu suchem -0,5 MPa a chladu 10 °C a kontrola bez stresu suchem při teplotě 10 °C. Velikost kořenového systému byla hodnocena prostřednictvím měření jeho elektrické kapacity v polních podmínkách. Hodnoceno bylo 37 genotypů pšenice ozimé. Byla kvantifikována heterogenita a meziodrůdové rozdíly vitality semen a velikosti kořenového systému rostlin. Vitalita semen byla korelována s velikostí kořenového systému.

*Klíčová slova: vitalita semen, velikost kořenového systému, elektrická kapacita, stresové podmínky, PEG 6000*

**ÚVOD**

V minulosti stačilo farmářům pro získání kvalitního osiva vybrat nejlepší semena ze své sklizně. V současnosti se díky tlaku pěstitelů požadavky na kvalitu osiva neustále zvyšují. Rozvoj testování kvality semen je již po mnoho let diskutovaným tématem a má stále větší význam v důsledku globálních klimatických změn. Metody hodnocení klíčení jsou navrženy především do ideálních podmínek, reálné chování mimo laboratoř je však odlišné /8,2/. Kvalita osiva je často chápána jako vitalita a životaschopnost semen /3, 6, 15, 16/. Nejvíce využívanou metodou hodnocení a zjišťování vnitřních vlastností osiva, považovanou za hlavní veličinu definující kvalitu osiva, patří však klíčivost prováděná za optimálních laboratorních podmínek. Tato charakteristika osiva tak udává schopnost semen klíčit v ideálních podmínkách, tj. potenciál osiva z pohledu klíčení. To není v souladu s reálnými polními podmínkami, kdy je rostlina vystavena stresovým faktorům, jako jsou náhlé změny teplot, nedostatek vody či živin /8/. Vitalita, tj. schopnost semen vyklíčit a vytvořit základ pro novou rostlinu za stresových podmínek, se v rychle měnících podmínkách prostředí stává stále důležitější vlastností osiv /12/. Vztah vitality osiva a kvality porostu byl již v minulosti prokázán. Produkce vysoce vitálních semen je popisována jako schopnost rostlin přizpůsobit se vnějším podmínkám prostředí /4, 5, 13/. Vitální semena se mohou

v prvotní fázi růstu lépe odolávat stresovým podmínkám prostředí (např. tzv. „drought escape“). Zda je tato strategie v korelaci s rychlostí nárůstu a velikostí kořenového systému, je hodnocené u pšenice ozimé v rámci této práce.

Měření velikosti kořenového systému nebylo doposud hlavním cílem šlechtitelských programů a to především z důvodu nedostatku levných a rychlých metod měření velikosti kořenového systému. Kořenový systém je uváděn jako nejcitlivější orgán rostlin – díky fyziologickým i morfologickým vlastnostem reaguje podzemní část na vnější prostředí citlivěji, než část nadzemní. V období stresu suchem může být potlačen růst postranních kořenů, což mnohdy pozitivně ovlivňuje pronikání struktur kořene do nižších půdních vrstev /18/. V případě nedostatku vody také rostlina reaguje strategií tvorby kořenů o malém průměru, což vede ke zvětšení povrchu, tedy možnost zvýšené absorpce vody z půdy. Do jisté míry nesou kořeny funkci paměti /1/, což může být výhodou pro šlechtitelskou práci.

Cílem práce není hodnocení morfologických parametrů kořenového systému (vertikální či horizontální distribuce kořenového systému v půdním profilu apod.), nýbrž kvantifikace vazby mezi celkovou velikostí kořenového systému a vitalitou semen v polních podmínkách. Hodnocení schopnosti vytvořit základ pro novou rostlinu díky vysoké vitalitě, reagovat na sucho rychlejším a zvýšeným nárůstem biomasy kořenového systému, jako osvojovacího aparátu. Výsledky mohou být využity při šlechtění rostlin, kdy se lze zaměřit na šlechtění na vyšší vitalitu obilky pro eliminaci dopadů stresových podmínek. Hypotézou je, že úspěšnou selekcí na vyšší vitalitu dojde ke zvýšení tolerance potomstev k suchu. Vitálnější obilky jsou pak schopny vyhnout se případnému suchu v době zakládání porostů, rostliny vytvoří brzy dostatečně velký kořenový systém a budou tak více suchovzdorné, porosty budou lépe a vyrovnaně vzcházet.

## MATERIÁLY A METODY

Pro hodnocení bylo vybráno 37 ozimých genotypů pšenice seté (*Triticum aestivum* L.), u nichž byl založen test klíčivosti (kontrola) a vitality. Vitalita byla stanovena jako procento vyklíčených semen ve stresových podmínkách, tj. při chladu 10 °C a za fyziologického sucha -0,5 MPa ve vodním roztoku polyethylenglykolu (PEG 6000) při koncentraci 193 g PEG 6000 na 1000 ml vody s teplotou 20 °C. Paralelně byla založena kontrolní varianta působení stresu chladem s optimálním vodním režimem při teplotě 10 °C. Zkouška klíčivosti byla založena za standardních laboratorních podmínek, 22 °C, relativní vlhkost vzduchu 85 – 90 %, v klíčiřích na filtračním papíru. Každá varianta (vitalita, stresová varianta v chladu a klíčivost) byla založena s 50 obilkami vždy ve třech opakováních. Jako správně vyklíčená byla hodnocena semena s délkou klíčku minimálně poloviny délky obilky a s minimálně třemi kořínky. Procento vyklíčených semen bylo hodnoceno po 7 a 14 dnech.

Pro zjištění velikosti kořenového systému bylo použito měření elektrické kapacity /10/. Velikost kořenového systému byla měřena v nanofaradech (nF). Jedna svorka měřiče elektrické kapacity byla připojena ke všem bazálním částem rostliny, vždy ve stejné výšce nad povrchem půdy. Tato výška byla v blízkosti půdy, ale ne v kontaktu s ní. Druhý vodič, který vede měřicí proud do půdy, byl umístěn v meziřadí uprostřed mezi měřenými rostlinami. Byl použit impedanční můstek ESCORT ELC-131D LCR metr (Escort Instruments Corporation, Taiwan), který byl nastaven na paralelní měřenou kapacitu při frekvenci 1 kHz /9/. Měření velikosti kořenového systému bylo provedeno ve fázi sloupkování.

Výsledky byly hodnoceny metodou analýzy variance (ANOVA) a korelační analýzou v programu STATISTICA 10.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Výnos zrna ozimých odrůd pšenice v suchých letech pozitivně koreluje např. s velikostí kořenového systému. Bylo zjištěno, že v suchých letech odrůdy s největší velikostí kořenového systému, vykazují rozdíl výnosu až 860 kg.ha<sup>-1</sup>, což přibližně odpovídá dodatečnému využití 15

mm vody /14/. Selektce podle velikosti kořenového systému by mohla efektivně přispět ke zvýšení výnosu zrna /17/ a pozitivně ovlivnit příjem živin jako je P a K. Současně je třeba vycházet z faktu, že křížení pšenice během počátků zelené revoluce (odrůdy Norin 10 nebo Brevor) způsobilo naopak redukci kořenové biomasy. Proto má v rámci fenotypizace velký potenciál hodnocení parametrů kořenového systému. Toto je optimální provádět v průběhu růstových fází sloupkování a metání, kdy jsou nároky na živiny nejvyšší v důsledku rychlého nárůstu biomasy. Zrna takto vybraných rostlin by měla být sklizena a dále využita ve šlechtění odrůd. Proto zde nachází uplatnění nedestruktivní metoda hodnocení velikosti intaktního kořenového systému pomocí elektrické kapacity /10/. Kromě vlastností kořenového systému je důležitá i vitalita semen, hodnocena jako klíčivost za sucha a stresu chladem a mohla by také přispět k efektivnímu zvýšení výnosu zrna /19/. Testy vitality, které měří pouze jeden faktor, určují vitalitu semen nespolehlivě, neboť jen kombinace několika faktorů může dát dobrou předpověď polní vzcházivosti /7/. Existuje předpoklad, že u genotypů s vitálnějšími semeny, dojde ke zvýšení tolerance k suchu. Klíčenci z vitálnějších obiliek uniknou (drought escape) případnému suchu v počátečních fázích vegetace, vytvoří větší kořenový systém a budou tak suchovzdornější i v dalších fázích vegetace.

Tab. 1: Vitalita a klíčivost (%) vybraných genotypů.

Genotyp	Vitalita	Genotyp	Vitalita	Genotyp	Klíčivost	Genotyp	Klíčivost
13	68,7 a	35	88,0 ab	13	68,0 a	21	98,0 b
11	68,7 a	22	88,0 ab	29	95,3 b	16	98,0 b
9	78,0 ab	29	88,0 ab	18	95,3 b	17	98,0 b
33	80,0 ab	19	88,0 ab	19	95,3 b	26	98,0 b
26	83,3 ab	36	88,7 ab	1	96,0 b	24	98,0 b
27	83,3 ab	10	88,7 ab	10	96,0 b	33	98,0 b
17	84,0 ab	12	89,3 ab	8	96,0 b	23	98,7 b
21	84,0 ab	6	89,3 ab	12	96,7 b	4	98,7 b
28	84,0 ab	32	90,0 ab	3	96,7 b	15	98,7 b
5	84,0 ab	2	90,0 ab	27	96,7 b	14	98,7 b
18	84,7 ab	1	91,3 ab	11	96,7 b	30	98,7 b
37	85,3 ab	16	92,0 ab	9	97,3 b	34	98,7 b
14	86,7 ab	7	92,0 ab	2	97,3 b	32	98,7 b
4	86,7 ab	3	92,0 ab	28	97,3 b	25	98,7 b
31	86,7 ab	25	93,3 b	7	97,3 b	37	98,7 b
34	86,7 ab	8	94,0 b	20	97,3 b	36	100,0 b
20	87,3 ab	24	95,3 b	22	97,3 b	35	100,0 b
23	87,3 ab	30	96,7 b	5	98,0 b	31	100,0 b
15	88,0 ab			6	98,0 b		

\*) Statisticky odlišné páry hodnot jsou označeny rozdílnými písmeny.

Nejvyšší tedy 100% klíčivost byla zaznamenána u genotypů 31, 35 a 36. Nejnížší hodnoty klíčivosti (68 %) byly zjištěny u genotypu č. 13. Nejvitálnějším genotypem byl genotyp 30 s vitalitou 96,7 % a genotypy 24 resp. 25 s hodnotou vitality 95,3 % resp. 93,3 %. Nejméně vitální genotypy (11, 13) dosahovaly vitality 68,7 %. Při teplotě vzduchu 10 °C bez stresu suchem (kontrolní varianta) dosahovaly nejvyšších hodnot vitality (100 %) vzorky č. 6, 9, 10, 26 a 32. Nejnížší vitalita (73,3%) byla zaznamenána opět u vzorku č. 13. Statistické vyhodnocení metodou analýzy variance (ANOVA) taktéž poukazuje na statisticky průkaznou odlišnost genotypu 13 a 11 od genotypů 8, 24, 25 a 30 ve stanovení vitality. Hodnotami klíčivosti se genotyp 13 statisticky průkazně odlišuje od ostatních sledovaných genotypů (Tab. 1).



Ve fázi sloupkování nebyla zjištěna statisticky průkazná odlišnost v hodnotách VKS u sledovaných genotypů (Tab. 2).

Tab. 2: Velikost kořenového systému (VKS)(nF) vybraných genotypů ve fázi sloupkování na lokalitě Branišovice.

Genotyp	VKS - sloupkování	Genotyp	VKS - sloupkování
33	1,092 a	13	1,528 a
9	1,238 a	25	1,532 a
23	1,263 a	12	1,543 a
8	1,278 a	31	1,561 a
7	1,295 a	26	1,562 a
32	1,300 a	22	1,575 a
29	1,320 a	16	1,599 a
36	1,332 a	5	1,622 a
2	1,359 a	20	1,623 a
18	1,394 a	10	1,628 a
37	1,425 a	15	1,631 a
6	1,430 a	30	1,643 a
21	1,438 a	19	1,661 a
4	1,452 a	24	1,677 a
35	1,446 a	28	1,752 a
11	1,502 a	1	1,768 a
3	1,507 a	27	1,885 a
34	1,517 a	17	1,948 a
14	1,524 a		

\*) Statisticky odlišné páry hodnot jsou označeny rozdílnými písmeny.

Byly zjištěny statisticky vysoce průkazné ( $p \leq 0,01$ ) vztahy mezi klíčivostí a vitalitou ( $r = 0,522$ ), klíčivostí a působením stresu chladem ( $r = 0,942$ ) a vitalitou a působením stresu chladem ( $r = 0,450$ ). Genotypy byly odlišeny na základě dosažených průměrných hodnot vitality a VKS. Bylo identifikováno 13 genotypů se statisticky vysoce průkazným kladným vztahem vitalita  $\times$  VKS ( $r = 0,904$ ; vitalita = 86,8 %; VKS = 1,483 nF); 13 genotypů se statisticky vysoce průkazně negativním vztahem průměrné vitality klíčenců a jejich VKS ( $r = -0,916$ ; vitalita = 87,9 %; VKS = 1,528 nF) a 12 genotypů s indiferentním vztahem mezi vitalitou a VKS (vitalita 85,4 %; VKS = 1,516 nF). Možný je tak pozitivní efekt vitality na velikost kořenového systému v případě genotypů s menší VKS. U genotypů s větší VKS je pak efekt opačný. To bylo testováno seřazením genotypů dle VKS. Patrná je i tendence (statisticky neprůkazná), kdy 12 genotypů s nejmenší VKS vykazovalo pozitivní vztah ( $r = 0,404$ ) s vitalitou semen a 13 genotypů s největší VKS vykazovalo závislost negativní ( $r = -0,401$ ). Vztah třinácti genotypů s největší vitalitou s jejich VKS nebyl statisticky průkazný ( $r = 0,409$ ). Lze předpokládat významný vliv prostředí na hodnoty vitality semen a velikosti kořenového systému. Vztah bude testován v následujících letech i v rámci nádobového pokusu v prostředí s řízenou závlahou.

#### LITERATURA

- 1/ Bláha, L., Hnilička, F.: Význam vlastností kořenů semen pro odolnost rostlin vůči abiotickým stresorům. In: Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2006. Praha: Česká Zemědělská univerzita v Praze, 2006: 1-9.
- 2/ Botwright, T. L., Condon, A. G., Rebetzke, G. J., Richards, R. A.: Field evaluation of early vigour for genetic improvement of grain yield in wheat. Aust. J. Agric. Res., 2002, 53(10): 1137-1145.
- 3/ Farahani H. A., Maroufi K.: Effect of Hydropriming on Seedling Vigour in Basil (*Ocimum Basilicum* L.). Under Salinity Conditions Advances in Environmental Biology, 2011, 5 (5): 828-833.

- /4/ Galloway L. F.: Maternal effects provide phenotypic adaptation to local environmental conditions. *New Phytol*, 2005, Vol. 166: 93-99.
- /5/ Gutierrez-Marcos J. F., Dickinson H. G.: Epigenetic Reprogramming in Plant Reproductive Lineages. *Plant Cell Physiol.*, 2012, Vol. 53: 817–823.
- /6/ Hampton J. G.: Methods of viability and vigor testing: a critical appraisal. *Seed Quality. Basic Mechanisms and Agriculture Implementations*. Food Products Press. 1995: 81–118.
- /7/ Hampton, J. G., Coolbear, P. (1990): Potential versus actual seed performance – can vigour testing provide an answer? *Seed Science and Technology*, 18: 215-228.
- /8/ Hampton, J. G., Tekrony, D. M.: *Handbook of vigour test methods*. Zurich: ISTA, 1995: 117.
- /9/ Hampton, J. G., Tekrony, D. M.: *Handbook of vigour test methods*, 3rd edition. Zurich: ISTA, 1995.
- /10/ Heřmanská, A., Bláha, L., Hromádka, M.: Elektrická kapacita kořenů – perspektivní selekční kritérium. Příspěvek ve sborníku: Vliv abiotických abiotických stresorů na vlastnosti rostlin. Nakladatel Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha 2014, ISBN: 978-80-213-2475-6. 2014: 59-64.
- /11/ Chloupek, O.: The relationship between electric capacitance and some other parameters of plant roots. *Biologia Plantarum*, 1972, 14: 227-230
- /12/ Pazderů, K.: Vitalita jako základní vlastnost osiva pro založení optimálních porostů, článek ve sborníku *Soja 2013*, 2013, ISBN 978-80-87111-40-6: 5-6.
- /13/ Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C., Job, D., 2012. Seed germination and vigor. *Annual Review of Plant Biology*, 63: 507–533.
- /14/ Springer N. M.: Small RNAs: How Seeds Remember To Obey Their Mother. *Curr Biol.*, 2009, Vol. 19:R649-R651
- /15/ Středa T, Dostál V, Horáková V, Chloupek O (2012) Effective use of water by wheat varieties with different root system sizes in rain-fed experiments in Central Europe. *Agr Water Manage* 104: 203-209.
- /16/ Styler R. C., Cantliffe D. J., Hall C. B.: The relationship of ATP concentration to germination and seedling vigor of vegetable seeds stored under various conditions. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105, Quoted in AOSA. 1980: 295–303.
- /17/ Šťastný J., Pazderů K.: Evaluation of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) seed quality and seed quality stability in relation to varieties and environmental conditions. *Journal of Agrobiology*. 2008, 25 (2): 153–161.
- /18/ Svačina P, Středa T, Chloupek O. (2014) Uncommon selection by root system size increases barley yield. *Agronomy for Sustainable Development*. 34, 2: 545-551.
- /19/ Taiz L., Zeiger E. 2010. *Plant Physiology*. 782. ISBN:978-0-87893-866-7.
- /20/ Ullmannová, K., Středa, T., Chloupek, O. (2013): Use of barley seed vigour to discriminate drought and cold tolerance in crop years with high seed vigour and low trait variation. *Plant Breeding*, 132: 3: 295-298.

### Poděkování

Tato publikace vznikla na Mendelově univerzitě v Brně v rámci projektu IGA AF MENDELU č. TP 7/2015 podpořeného z prostředků účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum, kterou poskytlo MŠMT v roce 2015.

## ROSTLINY, SUCHO A OMICKÝ VĚK: JAKÁ JE INFORMAČNÍ HODNOTA PROTEOMICKÝCH ANALÝZ?

### *PLANTS, DROUGHT AND THE AGE OF OMICS: WHAT IS THE INFORMATION VALUE OF PROTEOMIC ANALYSES?*

Dana Holá

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra genetiky a mikrobiologie, Viničná 5, 128 43 Praha 2 – Nové Město, danahola@natur.cuni.cz

#### *Summary*

The number of publications dealing with the changes of plant proteome caused by drought has recently significantly increased. However, a detailed analysis of these studies shows us often contradictory results. This is mainly due to a large variability of the experimental designs used; moreover, the experiments have often been organized in such a way that the information value of the obtained results is necessarily rather limited. This paper analyzes the main features of such studies from various angles and tries to offer a critical view of some shortcomings and limitations currently associated with existing proteomic analyses made with drought-stressed plants.

*Key words: drought; plants; proteomics; water stress*

#### *Souhrn*

V posledních letech lze nalézt poměrně velké množství publikací, které se zabývají změnami ve složení rostlinného proteomu v důsledku stresu suchem. Pokud se ovšem pustíme do jejich podrobnějšího rozboru, zjistíme, že výsledky i jejich interpretace si často protirečí. Stojí za tím zejména nesmírná variabilita v uspořádání příslušných experimentů; ty jsou přitom často koncipovány takovým způsobem, že výpovědní hodnota získaných informací je nutně velmi omezená. Tento článek se snaží rozebrat z různých úhlů hlavní charakteristiky studií používajících proteomické analýzy při výzkumu toho, jak rostliny reagují na nedostatek vody, a upozornit na některé nedostatky a omezení, které stávající studie zatím mají.

*Klíčová slova: proteomika; rostliny; sucho; vodní stres*

#### **ÚVOD**

Nedostatek vody limituje růst rostlin na mnoha místech naší zeměkoule. Pro zemědělství už od pradávna znamenalo sucho závažný problém a s vývojem lidské společnosti a klimatickými změnami, k nimž v současné době dochází, tento problém ještě narostl. Není tedy divu, že reakce rostlin na nedostatek vody a příčiny toho, proč jsou některé rostliny odolnější k suchu než jiné, se staly objektem zájmu mnoha vědců. Jak postupně docházelo k vývoji nových technik, pomocí kterých bylo možné tuto tematiku studovat, množství získaných informací narostlo tak, že je obtížné je nejen shromáždit, ale především utřídit a kriticky zhodnotit. To se začalo projevovat hlavně na konci 20. a počátku 21. století, což je období, které je v biologii často označováno jako „omický věk“. Techniky vyvinuté v této době umožnily získávat ve velkém měřítku nejprve údaje o genové expresi na úrovni množství transkriptů. Aplikace těchto technik na rostliny stresované suchem nám poskytla první informace o tom, co se v rostlinách při vystavení tomuto stresovému faktoru může na molekulární úrovni odehrávat. Byly identifikovány různé skupiny genů, u nichž se předpokládala souvislost s odpovědí na nedostatek vody nebo přímo s odolností vůči suchu, a zdálo se, že od této identifikace je jen krůček k tomu, aby došlo k jejich využití v šlechtitelské praxi. Po počáteční euforii se ale záhy začaly ozývat hlasy, že změna v množství transkriptu ještě neznamená odpovídající změnu v množství příslušného proteinu (a už vůbec ne změnu, která se

projeví na vyšší úrovni – orgánu, pletiva, celé rostliny). To je dnes naštěstí snad již dostatečně obecně přijímáno. Dalším krokem, který logicky následoval, byly tedy analýzy celogenomové exprese na úrovni proteinů – proteomické studie.

První, zatím ještě sporadické články, v nichž byly publikovány výsledky proteomických analýz u rostlin vystavených nedostatku vody, se objevily těsně před koncem 20. století a od r. 2005 jejich počet začal postupně narůstat. K datu 30.6.2015 se mi v odborných časopisech podařilo najít téměř 180 článků zabývajících se rostlinnou proteomikou v souvislosti se suchem. Jejich autoři pocházejí většinou ze zemí, které mají s nedostatkem vody pro zemědělství největší problémy (Čína, Indie, Írán, Francie, Španělsko), případně z USA, Německa či Japonska. Časopisy, v nichž jsou tyto články publikované, jsou většinou považovány ve vědecké komunitě za kvalitní. Zdálo by se tedy, že soubor výsledků, ze kterého by mělo být možné získat ucelený obraz o tom, jak se v rostlinných buňkách množství konkrétních proteinů při suchu mění, je již dostatečně rozsáhlý a hodnověrný. Pokud se ovšem pustíme do podrobnějšího rozboru příslušných článků, s překvapením zjistíme, že spojit všechny získané informace není vůbec jednoduché a že výsledky i jejich interpretace si často protirečí. Situaci znesnadňují nejen přirozené rozdíly mezi rostlinnými druhy, ale také nesmírná variabilita v uspořádání pokusů, kterými se vědci snaží děje, k nimž v rostlinách při suchu dochází, zkoumat. V řadě případů byly přitom pokusy koncipovány takovým způsobem, že výpovědní hodnota získaných výsledků je nutně velmi omezená.

## HLAVNÍ CHARAKTERISTIKY STUDIÍ ZMĚN PROTEOMU VLIVEM SUCHA

Jaké jsou tedy hlavní charakteristiky studií, používajících proteomické analýzy při výzkumu toho, jak rostliny reagují na nedostatek vody? Z metodického hlediska, resp. z hlediska celkového provedení, se na ně lze podívat z různých úhlů. Začněme např. rostlinnými druhy, které jsou k výzkumu vlivu sucha na rostlinný proteom využívány. Jednoděložné a dvouděložné rostliny jsou v těchto pracích zdánlivě zastoupeny celkem rovnoměrně (54 % studií hodnotilo jednoděložné, 43 % dvouděložné), zatímco jehličnany, plavuně a mechy byly analyzovány zatím jen velmi vzácně (dohromady pouze 5 prací). Podíváme-li se ale na taxonomii hodnocených druhů detailněji, zjistíme, že zatímco v případě jednoděložných výrazně (67 %) převažují práce prováděné na pouhých 3 rostlinných druzích – rýži, pšenici a kukuřici, u dvouděložných je variabilita mnohem větší (celkem 48 druhů z 33 rodů, 22 čeledí a 16 řádů). Částečně to souvisí s tím, jaké druhy rostlin jsou jednak zemědělsky významné, jednak citlivé nebo naopak odolné k suchu (analyzovány jsou např. i některé vysloveně xerofytické druhy). Proteom modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* L. kupodivu příliš často analyzován v této souvislosti nebyl, byť většina transkriptomických studií zabývajících se suchem byla v minulosti udělána právě na tomto druhu.

Mezidruhovou variabilitu proteomických studií lze považovat za jev v podstatě pozitivní, protože se v biologii již mnohokrát ukázalo, že co platí pro jeden druh, nemusí nutně platit pro druh jiný, třeba i blízce příbuzný. Čím více informací z různých taxonomicky, ekologicky i jinak odlišných rostlinných druhů tedy získáme, tím ucelenější obraz si nakonec budeme moci utvořit. Co je však – zejména s ohledem na možné praktické uplatnění získaných informací – již poněkud méně potěšující, je poměrně malý důraz kladený na variabilitu vnitrodruhovou. To lze pochopit např. u výše zmíněných xerofytů (jejichž výzkum by v zemědělské praxi mohl najít uplatnění např. při tvorbě geneticky modifikovaných rostlin). Porovnání alespoň dvou genotypů s odlišnou odolností k suchu nalezneme ale jen u 23 % proteomických studií pracujících většinou s běžnými zemědělskými plodinami (tedy s materiálem, kde vnitrodruhová variabilita v odolnosti k tomuto stresovému faktoru existuje). Navíc většinou není zřejmé, v jakých podmínkách byla odolnost k suchu u studovaných genotypů určena, na jakém principu je založena a zda se jedná o skutečnou odolnost („drought tolerance“) nebo pouze o strategii zabránění stresu suchem („drought avoidance“). Proteomické analýzy jsou technicky do jisté míry omezeny počtem vzorků/variant, které lze zhodnotit, a také jejich finanční náročnost je vyšší než u analýz na úrovni RNA resp. DNA. I tak by srovnání odolných a citlivých genotypů v rámci určitého rostlinného druhu

(zejména pokud jde o druh hospodářsky významný) bylo u řady publikovaných studií nejen možné, ale pravděpodobně i užitečnější než to, jak tyto práce byly koncipovány. Téměř zcela také chybí studie porovnávací rodiče a jejich křížence (nalezla jsem pouze 2 takové články), což je z hlediska šlechtitelské praxe velmi významné. Poměrně zřídka (5 prací) byl dosud analyzován proteom mutantních rostlin, u nichž se předpokládala souvislost dané mutace s odpovědí na sucho. Také transgenní rostliny modifikované tak, aby vykazovaly vyšší odolnost k suchu, nejsou zatím z proteomického hlediska příliš prozkoumány (6 prací).

Do značné míry problematický bývá často i způsob simulace sucha. V přírodě se sucho vyskytuje podle toho, o jakou zeměpisnou/vegetační oblast se jedná, buď krátkodobě (následováno obdobím dostatečné závlahy, kdy rostliny mají šanci obnovit své normální fyziologické procesy), nebo dlouhodoběji. Často se také periody sucha cyklicky opakují nebo je nedostatek vody doprovázen působením jiných stresových faktorů. Mechanizmy, kterými rostliny reagují na tyto různé varianty stresu suchem, se nutně dosti liší a závisejí pochopitelně i na daném rostlinném druhu a na vývojovém stádiu, v němž na rostlinu sucho začalo působit. Pro správné pochopení toho, co se s rostlinnými proteiny během sucha v přírodě děje, by bylo samozřejmě nejlepší výzkum provádět v podmínkách, které co nejlépe odpovídají skutečné situaci v přírodě. To je dnes ovšem v molekulární biologii rostlin spíše výjimkou. Rostliny, u nichž byl proteom studován v souvislosti s působením sucha, bývají velmi často pěstovány v nepřírodných podmínkách růstových komor (téměř 53 % prací). Ty se navíc liší mezi jednotlivými studii i v rámci stejného rostlinného druhu (což se týká zejména intenzity světla – např. u rýže jsem se setkala s pěstováním při 80, 270, 600 a více než 700  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , což vše bylo považováno za normální světelný režim). V polních podmínkách (se simulací sucha např. pomocí krytů před deštěm) byly rostliny pěstovány pouze v 15 případech, tj. 8 % z celkového počtu studií. Rozumným kompromisem bývá využití skleníku, což umožňuje celkové podmínky prostředí přece jen lépe kontrolovat než při pěstování přímo v přírodě, a zároveň je bližší přirozenému stavu.

Potěšujícím zjištěním alespoň pro mne byla skutečnost, že v 79 % prací byly rostliny pěstovány v (relativně) přirozeném substrátu. I tak ale ne zcela zanedbatelný počet studií použil hydroponii a sucho simuloval přidáním polyetylglykolu (PEG; 31 prací), manitolu, sorbitolu či sacharózy (11 prací) do živného roztoku, nebo dokonce přidáním anorganické soli, odebráním rostlin z hydroponické kultury nebo odstřížením listů a jejich postupným vysycháním (7 prací). Netřeba říkat, že tyto způsoby simulace sucha jsou zcela nepřirozené a získané informace mají mnohem menší výpovědní hodnotu než informace ze studií, kde bylo sucho navozeno přerušením (nebo alespoň omezením) zalévání. Navíc se potvrdilo, že odlišné způsoby simulace sucha (např. aplikace PEG/manitolu vs přerušení zalévání; srovnáváno celkem v 5 studiích) skutečně dávají odlišné výsledky proteomických analýz.

Také z širšího pohledu na sucho trpí mnoho stávajících proteomických studií určitou jednoduchostí. 62 % autorů vystavilo své pokusné rostliny pouze jedné intenzitě/délce sucha a i ve zbylých případech se často jednalo jen o malé rozdíly např. v řádu jednoho či několika dalších dnů bez zalévání. Porovnání mírného (krátkodobého) a silného (dlouhodobějšího) sucha v jedné studii nebývá příliš časté. Změny v množství proteinů po skončení sucha (při obnově normálního režimu) sledovalo necelých 24 % prací, cyklicky se opakujícímu suchu byly věnovány pouze 2 články. Rozdíly a shody mezi rostlinami stresovanými suchem a jiným stresorem byly analyzovány ve 24 člancích; obvykle přitom šlo o porovnání se stresem zasolením (14 prací), vysokou teplotou (9 prací) nebo naopak chladem (6 prací). Pouze 9 studií se ale zabývalo tím, jak může být množství proteinů ovlivněno kombinací nedostatku vody a jiného stresového faktoru (až na jednu výjimku, kdy šlo o spolupůsobení ozónu, se vždy jednalo o působení vysoké teploty). Ve 14 případech také autoři studovali, co s proteomem rostlin stresovaných nedostatkem vody udělá aplikace určitých látek (většinou kyseliny abscisové, ABA) předtím, než sucho začne působit.

Co se týče vývojového stádia rostlin, v němž k navození sucha dochází, setkáváme se v proteomických studiích s velmi širokou škálou možností, a to opět i v rámci jediného rostlinného

druhu. Např. u pšenice existují studie, v nichž byly rostliny na počátku sucha staré 8-10 dnů, ve fázích odnožování, sloupkování, otvírání listové pochvy, metání i tvorby zrna. V případě kukuřice šlo nejčastěji o stáří 1 – 5 týdnů, ale i o zcela dospělé rostliny a obdobně tomu bylo i u rýže. Zde vidím hlavní omezení stávajících studií v tom, že se většinou pracuje s dosti mladými rostlinami (což souvisí s jejich pěstováním v růstových komorách nebo sklenících), zatímco v přírodě sucho na rostliny často začne působit (a výrazněji ovlivňovat např. výnosové parametry) až v pozdějších vývojových fázích.

Dalším nedostatkem dosud publikovaných proteomických studií u rostlin stresovaných nedostatkem vody je příliš velký důraz kladený na změny v nadzemních částech rostlin. Téměř 60 % prací se zabývalo pouze proteomem listů a dalších cca 10 % pracovalo s proteiny izolovanými z nadzemní části jako takové. Do jisté míry je to sice pochopitelné, protože s listy se z technického hlediska pracuje nejlépe, ale to neznamená, že by kořeny – orgány, kterými rostlina přijímá vodu z půdy – nebo stonek – důležitý pro transport vody do celé nadzemní části – měly být opomíjeny! Výlučně na proteom kořenů se zaměřilo 12 % z celkového množství studií, několik autorských kolektivů analyzovalo také semena, plody či jejich části, případně jiné orgány. V tomto případě bych rozhodně doporučila komplexnější přístup: měl by být analyzován vždy proteom více orgánů současně, aby se podchytily rozdíly v jejich reakci na suchu. Takových prací jsem však našla pouze 18 (tedy 10 % z celkového počtu), z toho 10 prací hodnotilo listy a kořeny, 3 studie byly zaměřeny na listy a stonek, u 2 studií byla hodnocena trojkombinace listy, kořeny a stonek a u zbylých studií šlo o jinou kombinaci různých orgánů. Informace získané z takových prací rozhodně pomohou lépe pochopit, co konkrétně se v různých částech rostliny v důsledku sucha s proteiny děje a jak by to mohlo souviset s celkovou odolností rostlin vůči tomuto stresoru.

V současné době je poměrně populární provádět „omické“ (tedy komplexní) analýzy, které jsou zároveň specializované (zaměřené pouze na určité součásti buněk). Tento přístup na jednu stranu umožňuje podívat se detailně na to, co se odehrává v jednotlivých buněčných kompartmentech, na druhou stranu však v živé buňce žádný kompartment nefunguje osamoceně a lokalizace proteinů se zejména v průběhu stresu velmi dynamicky mění. I zde by ideálním přístupem bylo analyzovat více buněčných kompartmentů souběžně a výsledky pak propojit, to se však zatím obvykle neprovádí. Důvodem jsou především rozdíly ve snadnosti, s jakou se jednotlivé části buněk dají izolovat */1/*. Přílišná specializace také může vést k tomu, že rostlina jako taková se vlastně ztrácí ze zřetele a získané informace pak v širších souvislostech nemají příliš velký význam. Proteomické studie u rostlin vystavených nedostatku vody se zatím konkrétním buněčným kompartmentům příliš nevěnovaly: 6 prací analyzovalo proteom jádra, 3 další se soustředily na proteiny extracelulární matrix, po jedné studii bylo věnováno analýze proteomu chloroplastů, mitochondrií, plazmatické membrány, buněčným membránám obecně, buněčné stěně a apoplastu. Také na další „žhavé téma“ dnešní proteomiky – posttranslační modifikace proteinů – se v souvislosti se suchem zaměřilo dosud jen 7 článků; ve všech byl přitom analyzován fosfoproteom a dalším typům modifikací (např. ubikvitylaci, která by mohla leccos naznačit o degradaci proteinů) se nikdo nevěnoval, i když techniky umožňující tyto analýzy existují */2/*.

Z hlediska technik používaných při proteomických analýzách u rostlin stresovaných suchem lze stávající studie rozdělit také do několika skupin podle toho, jakou základní metodu/techniku autoři použili pro extrakci a purifikaci proteinů, jejich separaci, identifikaci a kvantifikaci. Co se týče separace proteinů, jednoznačně převažují přístupy založené na gelové elektroforéze (89 % z celkového počtu studií, přičemž 137 prací využilo dvourozměrnou gelovou elektroforézu – 2DGE, 8 prací jednorozměrnou elektroforézu a 21 prací tzv. diferenční gelovou elektroforézu – DIGE). S tím souvisejí i nejčastější metody používané pro přípravu vzorků a extrakci proteinů – běžně se lze setkat jak s precipitací pomocí kyseliny trichloroctové a acetonu, tak s fenolovou extrakcí a precipitací metanolem, případně i s jinými modifikacemi těchto základních metod */3/*. Přístupy nezávislé na gelové separaci byly zatím v této oblasti výzkumu aplikovány méně často;

pravidelněji se s nimi lze setkat až od r. 2012. Jedná se jak o metody používající značení (především iTRAQ – tato metoda byla použita celkem v 9 studiích), tak o tzv. metody bez značení (10 prací) založené na separaci peptidů pouze pomocí kapalinové chromatografie.

Všechny uvedené přístupy mají své výhody a nevýhody. 2DGE a DIGE umožňují přímo rozlišit různé izoformy proteinů související např. s posttranslačními modifikacemi a DIGE navíc minimalizuje nesrovnalosti vedoucí k chybám při porovnání vzorků rozdělených na různých gelech. Nevýhodou gelových technik ale je relativně malé množství proteinů, které lze separovat a posléze identifikovat, a také omezený počet vzorků/variant, které je pomocí těchto technik možné analyzovat. Negelové přístupy bez značení peptidů nebo proteinů nabízejí srovnání mnohem většího počtu vzorků a díky automatizaci jsou dnes poměrně snadno proveditelné, kvantifikace proteinů ale u nich není tak přesná a chybovost je větší. Přístupy založené na chemickém nebo metabolickém značení jsou v tomto ohledu mnohem přesnější a spolehlivější, podobně jako u gelových metod však umožňují srovnání opět pouze omezeného počtu vzorků a jejich provedení je dražší /4, 5/. Ideální by bylo neomezit se pouze na jednu separační techniku, ale souběžným použitím více přístupů získat vzájemně se doplňující informace, které by umožnily ucelenější pohled na studovanou problematiku. Při vyhledávání prací věnujících se proteomickým analýzám u rostlin vystavených nedostatku vody jsem ale narazila pouze na 2 články, jejichž autoři použili jak gelovou, tak negelovou separaci proteinů a výsledky porovnali (přičemž zjistili, že jsou velmi odlišné).

Jak u gelových, tak u negelových přístupů následuje většinou analýza pomocí hmotnostní spektrometrie (MS), která je nezbytná pro identifikaci jednotlivých proteinů. Podstatou MS je detekce iontů, které vznikají z molekul vzorku při ionizaci; ionizačních technik a iontových separátorů ale existuje mnoho typů /6/. V proteomických studiích zaměřených na rostliny vystavené nedostatku vody se nejčastěji můžeme setkat s ionizační technikou MALDI (105 prací) spojenou v naprosté většině případů s průletovým analyzátozem (TOF). Méně častěji je používána ionizační technika ESI (68 prací; v některých studiích navíc k MALDI-TOF); zde bývá variabilita iontových separátorů větší (TOF, iontová past, lineární kvadrupol, Orbitrap i jejich různé kombinace). I v tomto případě mají různé techniky své výhody a nevýhody, i když rozdíly mezi nimi se v poslední době stírají. Spíše dříve se pro identifikaci proteinů používalo i Edmanovo sekvenování N-koncových nebo vnitřních aminokyselin (8 prací) a v 5 studiích (včetně několika recentních) byly sice proteiny kvantifikovány, ale nebyly identifikovány (sic!). Co se týče postupů při kvantifikaci proteinů, i zde existuje značná variabilita související především s překotným vývojem různých počítačových programů, které jsou k tomu využívány, a samozřejmě s použitou proteomickou technikou (gelové/negelové přístupy). Zajímavé je, jak různě přísná, resp. méně přísná kritéria si autoři proteomických studií nastavují pro to, aby pozorovanou změnu v množství určitého proteinu považovali za významnou (ne vždy jsou dodržovány standardy doporučované v instrukcích pro autory proteomických časopisů).

Jako velmi závažný nedostatek stávajících proteomických studií vidím také fakt, že v mnoha případech zcela nebo z větší části chybí charakterizace pokusného materiálu z morfologického nebo fyziologického hlediska. Z celkového počtu 177 článků jich 30 bylo věnováno opravdu jen analýze proteomu a dalších 10 k této analýze přidalo pouze analýzu RNA (a to ještě většinou omezenou pouze na několik specifických transkriptů). Téměř v polovině prací se autoři neobtěžovali ani s tím nejzákladnějším popisem vodního stavu analyzovaných rostlin například pomocí relativního obsahu vody. Pouze ve třetině studií najdeme nějakou zmínku o vzhledu/morfologii rostlin (většinou se přitom jedná o jednu či dvě morfologické charakteristiky související často s výškou či délkou). Fotosyntéza byla měřena asi ve třetině prací, charakteristiky spojené s činností průduchů (včetně obsahu ABA) přibližně u 24 %, poškození buněčných membrán nebo obsah reaktivních forem kyslíku cca u 20 % studií, obsah různých osmolytů cca u 15 %, parametry spojené s antioxidantní obranou cca u 10 % studií. Další parametry (jiné charakteristiky spojené s buněčnou ochranou, metabolismem dusíku, dýcháním, výnosem aj.)

bývají hodnoceny ještě vzácněji. Velmi chybí komplexní pohled na rostlinu z různých hledisek (tj. kromě proteomiky bývá analyzováno jen několik málo dalších parametrů patřících obvykle fyziologicky do stejné skupiny): pouze u 7 článků autoři např. popsali svůj pokusný materiál po stránce morfologie, vodního režimu, účinnosti fotosyntézy, stupně buněčného poškození a proteomu zároveň.

Vezmeme-li v úvahu všechny výše zmíněné faktory, nedostatky a omezení, se kterými se v případě analýz rostlinného proteomu v souvislosti se suchem ve dosud existujících studiích setkáváme, není divu, že jejich výsledky si často protirečí. Snad pouze jediná skupina proteinů – dehydriny – ve všech studiích konstantně vykazovala stejné chování (nárůst množství) v důsledku sucha. U všech dalších skupin (transkripční a translační faktory, histony, proteiny interagující s RNA, ribozomální proteiny, chaperony/HSP proteiny, proteázy a další složky protein-degradačních systémů, různé proteiny účastníci se buněčné signalizace, enzymy metabolismu aminokyselin a lipidů, enzymy glykolýzy a glukoneogeneze, fotosyntetické proteiny, akvaporiny, antioxidantní proteiny, PR proteiny, proteiny cytoskeletu aj.) někteří autoři pozorovali nárůst, jiní pokles jejich množství vlivem nedostatku vody. Lišila se u nich odezva genotypů citlivých a odolných k suchu (ale ne vždy stejným způsobem) a obecně nebylo možné najít nějaký jednotný trend. Vyvodit závěry s „obecnou“ platností je ve vědě samozřejmě vždy obtížné, v tomto případě se však nerozpakují tvrdit, že je to dokonce téměř nemožné – alespoň na základě studií, které zatím máme k dispozici. Využití proteomických (i dalších „omických“) analýz při výzkumu reakce rostlin na suchu tedy zatím rozhodně nepřineslo takový pokrok, jaký se od těchto technik původně očekával.

#### LITERATURA

Vzhledem k velkému množství původních prací, na nichž je tento článek založen, nejsou v textu ani v tomto seznamu jmenovitě uvedeny; jejich soupis je k dispozici u autorky článku. Citováno je pouze několik přehledových článků, které mohou čtenáři pomoci lépe se orientovat v problematice proteomických analýz u rostlin především z metodického hlediska:

- /1/ Millar, A.H., Taylor, N.L.: Subcellular proteomics – where cell biology meets protein chemistry. *Front. Plant Sci.*, 5, 2014: Article 5.
- /2/ Remmerie, N., de Vijlder, T., Laukens, K., Dang, T.H., Lemiére, F., Mertens, I., Valkenburg, D., Blust, R., Witters, E.: Next generation functional proteomics in non-model plants: a survey on techniques and applications for the analysis of protein complexes and post-translational modifications. *Phytochemistry*, 72, 2011: 1192-1218.
- /3/ Wu, X., Gong, F., Weng, W.: Protein extraction from plant tissues for 2DE and its application in proteomic analysis. *Proteomics*, 14, 2014: 645-658.
- /4/ Binschedler, L.V., Cramer, R.: Quantitative plant proteomics. *Proteomics*, 11, 2011: 756-775.
- /5/ Abdallah, C., Dumas-Gaudot, E., Renaut, J., Sergeant, K.: Gel-based and gel-free quantitative proteomics approaches at a glance. *Int. J. Plant Genomics*, 2012: Article 494572.
- /6/ El-Aneed, A., Cohen, A., Banoub, J.: Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Appl. Spectr. Rev.* 44, 2009: 210-230.



## **KOMPLEXNÍ ANALÝZA PROTEOMU A FYTOHORMONŮ U PŠENICE SETÉ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) OZIMÉ ODRŮDY SAMANTA A JARNÍ ODRŮDY SANDRA VYSTAVENÝCH CHLADOVÉMU OTUŽENÍ**

### ***COMPLEX ANALYSIS OF PROTEOME AND PHYTOHORMONES IN COMMON WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) WINTER CULTIVAR SAMANTA AND SPRING CULTIVAR SANDRA EXPOSED TO COLD ACCLIMATION***

Klára Kosová<sup>1</sup>, Pavel Vítámvás<sup>1</sup>, Radomíra Vaňková<sup>2</sup>, Sébastien Planchon<sup>3</sup>, Jenny Renaut<sup>3</sup>, Ilja Tom Prášil<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoř biologie stresu a biotechnologie ve šlechtění, Odbor rostlinné genetiky a šlechtění, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně, Česká republika, kosova@vurv.cz

<sup>2</sup>Laboratoř hormonálních regulací u rostlin, Ústav experimentální botaniky Akademie věd České republiky, Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 - Lysolaje, Česká republika

<sup>3</sup>Proteomic Platform, Centre de Recherche Public, Gabriel Lippmann, 41 Rue du Brill, 4422 Belvaux, Luxembourg

#### ***Summary***

Cold response (3 °C) was studied in common wheat winter cv. Samanta and spring cv. Sandra crowns as acquired frost tolerance (expressed as lethal temperature LT50), levels of several phytohormones (abscisic acid, bioactive cytokinins and gibberellins, auxin, jasmonic acid, salicylic acid, aminocyclopropanecarboxylic acid) and total proteome analysis by two-dimensional differential gel electrophoresis (2D-DIGE) approach. Proteome analysis led to a detection of total 1,800 protein spots, out of which 58 protein spots revealing significant differences between the varieties and treatments were selected for MALDI-TOF/TOF protein identification and 36 spots were identified. Cluster analysis has revealed analogous as well as differential patterns in LT50, phytohormone and protein levels between the growth habits. Under cold, both spring and winter cultivars increased levels of enzymes involved in energy metabolism (glycolysis, ATP biosynthesis) and protective proteins (chaperones, WCS120, HSP70, thioredoxin-dependent peroxidase, thaumatin-like). At 21 days of cold, differences were found in regulatory proteins and bioactive cytokinins and gibberellins indicating an enhanced cold acclimation in the winter cultivar while a progression in development in the spring one.

*Key words: proteomics; cold; wheat growth habits; phytohormones; frost tolerance*

#### ***Souhrn***

Byla studována odezva na chlad (3 °C) u odnožovacích uzlů ozimé pšenice cv. Samanta a jarní pšenice cv. Sandra na úrovni dosažené mrazuvzdornosti (vyjádřené jako letální teplota pro 50% vzorků - LT50), obsahu fytohormonů a změn proteomu pomocí dvourozměrné diferenční gelové elektroforézy (2D-DIGE) u rostlin vystavených 0 dnů (kontrola; 20 °C), 3 a 21 dnů otužení. Analýza totálního proteomu vedla k detekci cca 1800 proteinových spotů, z čehož bylo vybráno 58 spotů pro identifikaci pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF/TOF, přičemž 36 spotů bylo identifikováno. Identifikované proteiny vykazující významné změny mezi odběry anebo genotypy patří do funkčních kategorií zahrnujících energetický metabolismus, ochranné proteiny, proteinový metabolismus, a proteiny podílející se na regulaci růstu a vývoje. V odezvě na chlad oba růstové typy vykazovaly změny v abundanci proteinů sacharidového metabolismu (nárůst abundance enzymů spojených s katabolismem - glykolýza), redoxního metabolismu (thioredoxin-dependentní peroxidasa) a ochranných proteinů (chaperony, dehydrin WCS120, HSP70, thaumatin-like). Po 21 dnech otužení byly zjištěny rozdíly mezi ozimem a jařinou v proteinech podílejících se na regulaci růstu a vývoje rostlin, přičemž ozim vykázal zpomalení

růstu a vývoje, zatímco u jařiny již došlo k nárůstu proteinů a fytohormonů spojených se stimulací růstu a vývoje.

*Klíčová slova: proteomika; chlad; růstový typ pšenice; fytohormony; mrazuvzdornost*

## ÚVOD

Nízké teploty nad bodem mrazu (chlad) významně ovlivňují dynamiku vývoje pšenice. Ozimé a jarní růstové typy pšenice se liší schopností indukovat zvýšenou mrazuvzdornost, stejně tak se liší i svou odezvou na chlad na úrovni dynamiky růstu a vývoje rostlin. Vývoj ozimých odrůd je zpomalen vernalizačním požadavkem, tj. požadavkem určité minimální doby otužení, která vede ke zkrácení doby pro přechod z odolné vegetativní fáze rostlin do citlivé reprodukční fáze, a která se vyvinula jako evoluční adaptace na pravidelné zimní období v průběhu roku. Jarní růstový typ díky ztrátové mutaci (*loss-of-function mutation*) obdobný požadavek nemá a chlad u něho nevede ke zpomalení vývoje /1/. Odnožovací uzел je část rostliny obilnin, z níž vyrůstají základy listů i kořenů, a kde se rovněž v raných vývojových fázích nachází vzrostný vrchol. Tato část rostliny je kritická pro přezimování celé rostliny /2/, proto byla vybrána pro naše analýzy.

Cílem autorů Kosová *et al.* /3, 4/ bylo porovnání chladové odezvy odnožovacích uzlů dvou růstových typů pšenice seté (*Triticum aestivum*), ozimé odrůdy Samanta a jarní odrůdy Sandra, na úrovni dosažené mrazuvzdornosti, odezvy vybraných fytohormonů (kyselina abscisová (ABA), biologicky aktivní auxin (IAA), biologicky aktivní cytokininy (CKs) a gibereliny (GAs), kyselina jasmonová (JA), kyselina salicylová (SA), prekurzor ethylenu kyselina aminocyklopropankarboxylová (ACC)) a odezvy totálního proteomu rostlin vystavených 0 (kontrola; 20 °C), 3 a 21 dnům otužení (3 °C). Porovnání odezvy obou růstových typů a mnohorozměrná statistická analýza dat nám pomohla odhalit společné i odlišné znaky odezvy ozimého a jarního růstového typu na dlouhodobější chladové otužení vedoucí k plné chladové aklimaci rostlin.

## MATERIÁL A METODY

### ROSTLINNÝ MATERIÁL A USPOŘÁDÁNÍ EXPERIMENTU

Osivo obou kultivarů pšenice seté (*Triticum aestivum* L.), ozimého kultivaru Samanta a jarního kultivaru Sandra, bylo získáno od šlechtitelské firmy Selgen, a.s. (Stupice, ČR). Semena se nechala vyklíčit 2 dny ve tmě při 20 °C (termostat) a pak byla vysazena do hlíny a pěstována v růstové komoře (Tyler, T-16/4, Budapešť, Maďarsko) v kontrolních podmínkách (20 °C; 12-h fotoperioda, ozáření 350  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) do stadia 3. listu, kdy byl proveden odběr kontrolních vzorků. Poté byla teplota jednorázově snížena na 3 °C (chlad) a následně byly po 1, 3, 7 a 21 dnech chladu provedeny odběry odnožovacích uzlů pro stanovení dosažené mrazuvzdornosti, obsahu fytohormonů a analýzu totálního proteomu.

### DOSAŽENÁ MRAZUVZDORNOST

Dosažená mrazuvzdornost rostlin byla stanovena na 1 cm dlouhých segmentech odnožovacích uzlů metodou přímých mrazových testů dle /5/. Segmenty byly vystaveny souboru teplot od -1,5 °C do -30 °C s regulovanou mírou mrznutí a tání (2 °C h<sup>-1</sup>), poškození segmentů mrazem bylo stanoveno konduktometricky dle /5/. Poškození segmentů bylo vyjádřeno jako hodnoty LT50, tj. letální teplota pro 50% vzorků, dle /6/.

### ANALÝZA OBSAHU FYTOHORMONŮ

Analýza obsahu vybraných fytohormonů (kys. abscisová, auxin, biologicky aktivní cytokininy a gibereliny, ethylen, kys. jasmonová, kys. salicylová, kys. aminocyklopropankarboxylová) byla provedena dle /3/.

## PROTEOMICKÁ ANALÝZA

Vzorky pro analýzu totálního proteomu byly odebrány po 0 (kontrola), 3 a 21 dnech otužení. Analýza totálního proteomu byla provedena pomocí dvourozměrné diferenciální gelové elektroforézy (2D-DIGE) a následné identifikace vybraných proteinových spotů pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF/TOF. Proteiny byly extrahovány dle /7/. Vysrážené proteiny byly rozpuštěny v lyzačním pufru dle manuálu GE Healthcare a jejich koncentrace byla stanovena pomocí 2D Quant Kit (Bio-Rad, Hercules, California, USA). Vzorky (30 µg proteinů; celkem 6 experimentálních variant, 4 biologická opakování) byly označeny fluorescenčními barvivou CyDyes Fluorescent Dyes, minimální barvení (GE Healthcare) společně se směsným vzorkem obsahující shodná molární množství proteinů z jednotlivých vzorků, který byl použit jako interní standard /8/. Isoelektrická fokusace byla provedena na lineárních stripech IPG, 24 cm, pH 5-8 (Bio-Rad) v IEF Cell (Bio-Rad) dle manuálu (10 000 Vh). Druhý rozměr (SDS-PAGE) byl dělán v Ettan DALTsix (GE Healthcare). Proteinové spoty v 2D-DIGE gelech byly vizualizovány pomocí laserového scanneru PharosFX Fluorescent Imager (Bio-Rad) a byly analyzovány pomocí softwaru PDQuest Advanced, verze 8.0.1, multichannel application (Bio-Rad). Na základě statistických kritérií (minimálně 2násobná změna v abundanci minimálně v jednom z biologicky relevantních poměrů,  $p < 0.05$  (T-test); max. 50% variabilita abundance mezi biologickými opakováními) bylo vybráno 58 spotů pro identifikaci pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF/TOF. Byl připraven preparativní gel (1 mg proteinů) obarvený Coomassie Brilliant Blue G-250, spoty byly vyřezány pomocí ExQuest Spot Cutter (Bio-Rad) a odeslány k identifikaci pomocí MALDI-TOF/TOF /4/. Identifikované spoty byly prohledány pomocí databáze NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) a byly zařazeny do funkčních kategorií s využitím proteinových databází UNIPROT ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)), Gene Ontology ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)), PFAM ([www.pfam.sanger.ac.uk](http://www.pfam.sanger.ac.uk)).

## STATISTICKÁ ANALÝZA DAT

Soubory dat obsahující 4 biologická opakování ( $n = 4$ ) odpovídající jednotlivým parametrům byly hodnoceny pomocí ANOVA, T-test (STATISTICA, verze 10, StatSoft Inc.). Soubory dat obsahujících všechny parametry (LT50, fytohormony, 58 proteinových spotů) vyjádřené jako Z-skóre byly analyzovány pomocí klastrové analýzy v programu PermutMatrix /9/.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

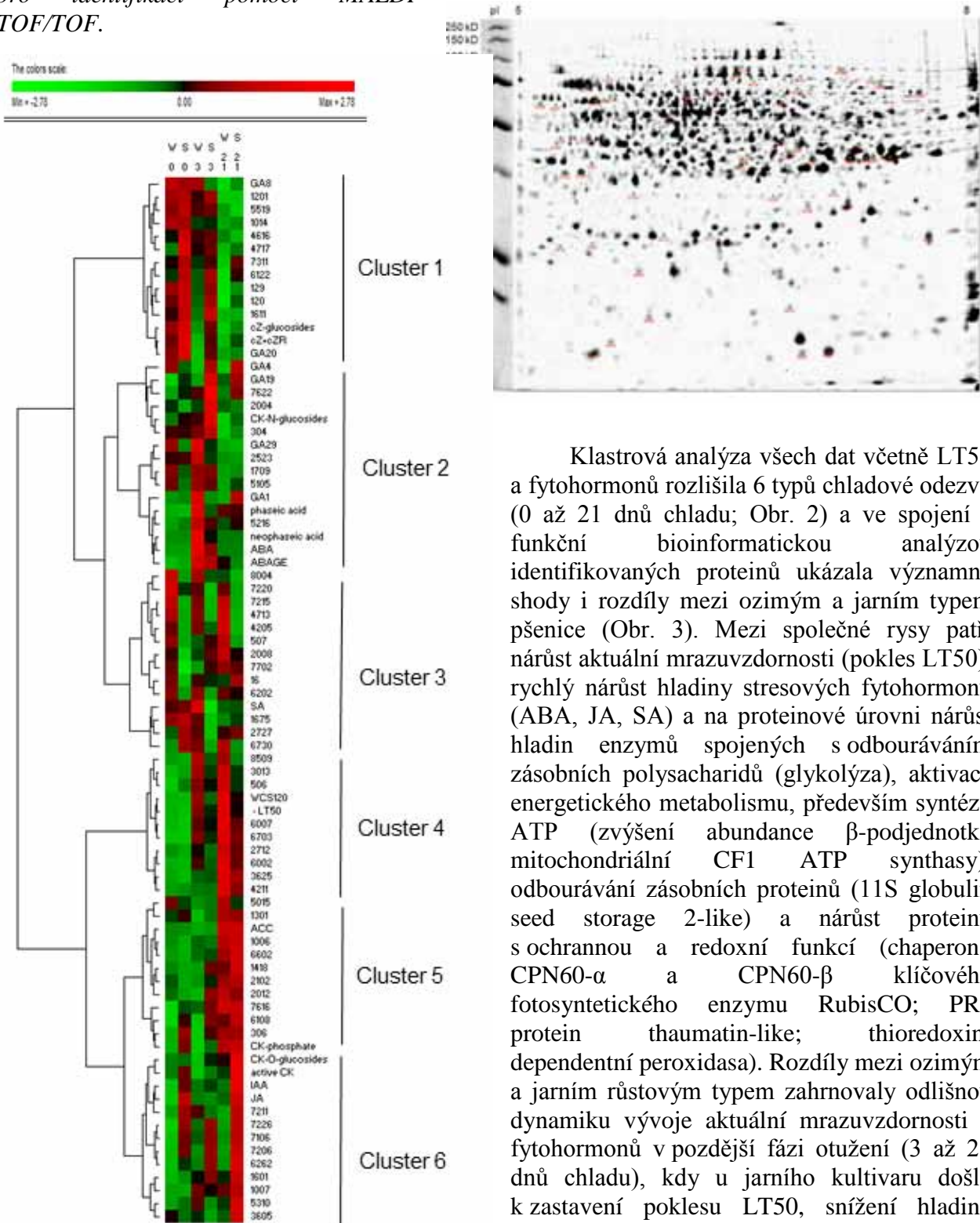
Byl zjištěn nárůst aktuální mrazuvzdornosti (pokles LT50) u obou kultivarů v průběhu prvních 3 dnů otužení; poté se pokles LT50 u jařiny zastavil na cca  $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , zatímco u ozimu hodnoty LT50 klesly až na cca  $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$  během 21 dnů otužení.

Hladiny fytohormonů vykazovaly odlišnou dynamiku v závislosti na druhu sledovaného fytohormonu. Bylo možno odlišit tři typy dynamiky: 1/ stresem-indukované fytohormony, které vykazovaly prudký počáteční nárůst během 1 dne stresu následovaný poklesem u obou růstových typů - ABA; 2/ hormony spojené se stresovou odezvou, které vykazovaly počáteční nárůst následovaný poklesem, a v pozdějších fázích otužení opětovný nárůst u ozimu - JA, SA; 3/ hormony spojené se stimulací aktivního růstu a vývoje, které po aplikaci stresu vykazovaly prudký pokles, avšak v pozdějších fázích otužení došlo u jařiny k jejich opětovnému nárůstu, zatímco u ozimu nikoliv - bioaktivní CKs a GBs.

Analýza totálního proteomu vedla k detekci cca 1800 proteinových spotů, z čehož 386 spotů vykazovalo významné rozdíly mezi experimentálními variantami (rozdíly mezi jednotlivými odběry anebo mezi ozimem a jařinou). Identifikace proteinů zahrnovala 58 spotů vykazujících statisticky významné rozdíly mezi kultivary anebo odběry, z nichž 36 spotů bylo jednoznačně identifikováno (Obr. 1). Identifikované spoty byly rozděleny do 8 funkčních kategorií (dle kritéria biologický proces databáze Gene Ontology): biosyntéza aminokyselin, ATP metabolismus,

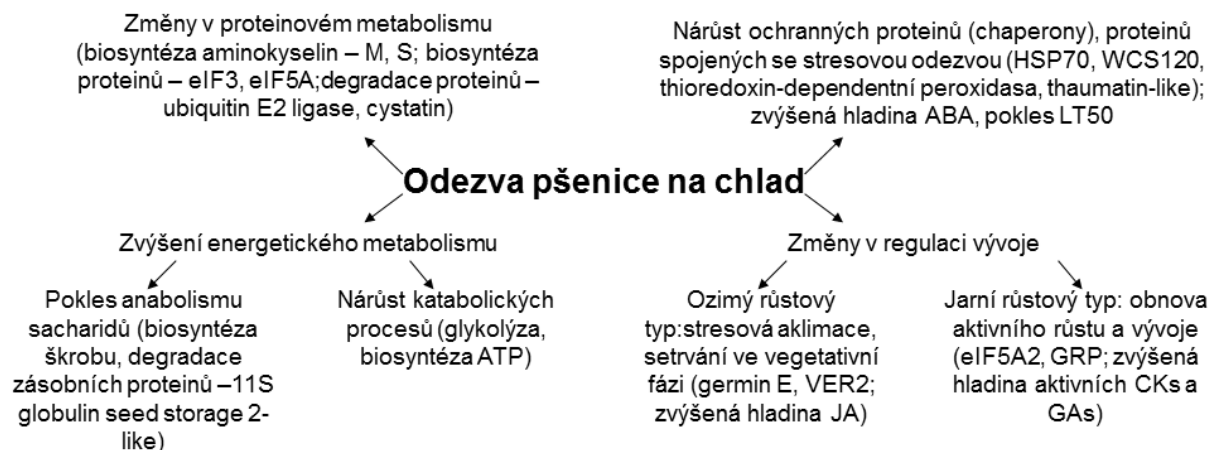
sacharidový metabolismus, proteinový metabolismus, chaperony, stresové a ochranné proteiny, zásobní proteiny a regulační proteiny.

Obr. 1. Reprezentativní 2D-DIGE gel obsahující rozdělený směsný vzorek (interní standard) označený fluorescenčním barvivem Cy2 s vyznačenými pozicemi 58 proteinových spotů vybraných pro identifikaci pomocí MALDI-TOF/TOF.



Klastrová analýza všech dat včetně LT50 a fytohormonů rozlišila 6 typů chladové odezvy (0 až 21 dnů chladu; Obr. 2) a ve spojení s funkční bioinformatickou analýzou identifikovaných proteinů ukázala významné shody i rozdíly mezi ozimým a jarním typem pšenice (Obr. 3). Mezi společné rysy patří nárůst aktuální mrazuvzdornosti (pokles LT50), rychlý nárůst hladiny stresových fytohormonů (ABA, JA, SA) a na proteinové úrovni nárůst hladin enzymů spojených s odbouráváním zásobních polysacharidů (glykolýza), aktivace energetického metabolismu, především syntézy ATP (zvýšení abundance  $\beta$ -podjednotky mitochondriální CF1 ATP synthasy), odbourávání zásobních proteinů (11S globulin seed storage 2-like) a nárůst proteinů s ochrannou a redoxní funkcí (chaperony CPN60- $\alpha$  a CPN60- $\beta$  klíčového fotosyntetického enzymu RubisCO; PR5 protein thaumatin-like; thioredoxin-dependentní peroxidasa). Rozdíly mezi ozimým a jarním růstovým typem zahrnovaly odlišnou dynamiku vývoje aktuální mrazuvzdornosti a fytohormonů v pozdější fázi otužení (3 až 21 dnů chladu), kdy u jarního kultivaru došlo k zastavení poklesu LT50, snížení hladiny stresových fytohormonů (JA, SA) a naopak k nárůstu aktivních cytokininů a giberelinů.

Naopak u ozimu došlo k dalšímu poklesu LT50, přičemž hladiny stresových fytohormonů zůstaly zvýšené a hladiny prorrůstových fytohormonů snižené. Ozim vykazoval nárůst ochranných proteinů spojených s vegetativní fází vývoje (germin E, lektin VER2 spojený s JA regulací), zatímco jařina vykazovala nárůst proteinů spojených s aktivací růstu a vývoje (eIF5A3, malý glycine-rich protein; adeninfosforibosyltransferasa spojená s biosyntézou CK).



Obr. 3. Shrnutí odezvy jarního a ozimého kultivaru pšenice na chlad.

## LITERATURA

- /1/ Szücs, P., Skinner, J.S., Karsai, I., Cuesta-Marcos, A., Haggard, K.G., Corey, A.E., Chen, T.H.H., Hayes, P.: Validation of the *VRN-H2/VRN-H1* epistatic model in barley reveals that intron length variation in *VRN-H1* may account for a continuum of vernalization sensitivity. *Molecular and General Genetics*, 277, 2007: 249–261
- /2/ Houde, M., Daniel, C., Lachapelle, M., Allard, F., Laliberté, S., Sarhan, F.: Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *The Plant Journal*, 8, 1995: 583–593
- /3/ Kosová, K., Prášil, I.T., Vítámvás, P., Dobrev, P., Motyka, V., Floková, K., Novák, O., Turečková, V., Rolčík, J., Pešek, B., Trávníčková, A., Gaudinová, A., Galiba, G., Janda, T., Vlasáková, E., Prášilová, P., Vaňková, R.: Complex phytohormone responses during the cold acclimation in two wheat cultivars differing in cold tolerance, winter Samanta and spring Sandra. *Journal of Plant Physiology*, 169, 2012: 567–576
- /4/ Kosová, K., Vítámvás, P., Planchon, S., Renaut, J., Vaňková, R., Prášil, I.T.: Proteome analysis of cold response in spring and winter wheat (*Triticum aestivum*) crowns reveals similarities in stress adaptation and differences in regulatory processes between the growth habits. *Journal of Proteome Research*, 12, 2013: 4830–4845
- /5/ Prášil, I., Zámečník, J.: The use of a conductivity measurement method for assessing freezing injury. I. Influence of leakage time, segment number, size and shape in a sample on evaluation of the degree of injury. *Environmental and Experimental Botany*, 40, 1998: 1–10
- /6/ Janáček, J., Prášil, I.: Quantification of plant frost injury by nonlinear fitting of an S-shaped function. *Cryo-Letters*, 12, 1991: 47–52
- /7/ Wang, W., Vignani, R., Scali, M., Cresti, M.: A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*, 27, 2006: 2782–2786
- /8/ Vítámvás, P., Kosová, K., Škodáček, Z., Prášil, I.T.: Metoda dvourozměrné diferenční gelové elektroforézy a její využití v proteomice. *Chemické Listy*, 104, 2010: 671–676
- /9/ Caraux, G., Pinloche, S.: Permutmatrix: a graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order. *Bioinformatics*, 21, 2005: 1280–1281

## Poděkování

Práce byla podpořena institucionálním projektem VÚRV, v.v.i., RO0415 uděleným Ministerstvem zemědělství České republiky (MZe ČR) a dále projekty udělenými Grantovou agenturou České republiky (GA ČR) P501/11/P637 a 522/09/2058.

## KOVOVÉ NANOČASTICE V RASTLINÁCH – TVORBA, FUNKCIA, ÚČINKY, VYUŽITIE

### *METAL NANOPARTICLES IN PLANTS – FORMATION, FUNCTION, EFFECTS, USE*

Elena Masarovičová<sup>1</sup>, Katarína Kráľová<sup>1</sup>, Smita Sachin Zinjarde<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Mlynská dolina, SK-842 15 Bratislava, Slovenská republika; e-mail: masarovicova@fns.uniba.sk

<sup>2</sup> Institute of Bioinformatics and Biotechnology, University of Pune, Ganeshkhind, 411007 Pune, Maharashtra, India

#### *Summary*

Paper is aimed at comprehensive characteristic of nanoparticles with respect to metal nanoparticles (MNPs) and their large practical application. Fundamental information of gold, silver and palladium nanoparticles were reported. Methods for determination and characterisation of MNPs, procedures of preparation as well as effects of MNPs on different live organisms (algae, vascular plants) were presented. Special attention was devoted to possibilities of MNPs use in phytoremediation technology.

*Key words: algae, effects, metal nanoparticles, methods, nanoparticles, vascular plants, phytoremediation technology, use*

#### *Súhrn*

V práci sa venujeme všeobecnej charakteristike nanočastíc so zreteľom na kovové nanočastice (MNPs) a ich širokospektrálnemu praktickému využitiu. Uviedli sme základné informácie o nanočasticiach zlata, striebra a paládia. Prezentovali sme metódy na stanovenie a charakterizáciu MNPs, postupy ich prípravy a účinky MNPs na rôzne formy živých organizmov (riasy, cievnaté rastliny). Osobitnú pozornosť sme venovali možnostiam využitia MNPs vo fytoimediačných technológiách.

*Kľúčové slová: cievnaté rastliny, fytoimediačné technológie, nanočastice, nanočastice kovov, riasy, účinky, využitie*

#### **ÚVOD**

Nanomateriály, vrátane nanočastíc (NPs, angl. nanoparticles), možno charakterizovať ako látky o veľkosti 1-100 nm s vlastnosťami odlišnými od častíc s väčším (makroskopické objekty) alebo menším rozmerom (atómy a molekuly). Mimoriadny záujem o NPs z hľadiska teoretického aj aplikačného vyplýva z ich zaujímavých optických, elektronických a chemických vlastností, závislých od štruktúry, veľkosti, tvaru a povrchovej modifikácie. V dôsledku extrémne malej veľkosti NPs majú tiež vysoké hodnoty pomeru medzi ich povrchom a objemom /1 a 2/. Tieto látky majú veľký aplikačný potenciál vo vývoji nových katalyzátorov, nanosenzorov, optoelektronických a nanozariadení, ako aj vo fotonike, informačných technológiách, medicíne a v neposlednom rade aj pri štúdiu biologických materiálov a ovplyvňovaní ich vlastností. V poslednom období sa nanomateriály a NPs stali stredobodom záujmu v oblasti výskumu a možnosti aplikácie v rôznych oblastiach, a to od materiálových vied až po biotechnológie /3/ a environmentálne technológie.

Za posledné dve dekády sa zvýšil záujem vedeckej aj priemyselnej komunity o kovové nanočastice (MNPs), ako jedného typu NPs, vďaka ich jedinečným fyzikálno-chemickým vlastnostiam a potenciálnemu využitiu v selektívnej katalýze, ako citlivých senzorov a aj dokonalejšej zobrazovacej technológii /4/. Nedávno sa dokonca špecifikovali a upúťali pozornosť

nanočastice drahých kovov (angl. noble metal nanoparticles) pre ich optické vlastnosti v povrchovej plazmónovej rezonancii (angl. surface plasmon resonance, SPR). V dôsledku nízkej toxicity, ľahkého transportu, silnej a optimalizovateľnej SPR sa nanočastice drahých kovov používajú vo fototerminálnej ablatívnej liečbe nádorových ochorení /5/.

Najvýznamnejšou funkciou rastlín je nepochybne tvorba organických látok vo fotosyntéze za súčasnej spotreby oxidu uhličitého a tvorby kyslíka (kyslíková fotosyntéza). V súčasnosti sa však upozorňuje aj na využitie rastlín v zelenej biosyntéze kovových nanočastíc (angl. green biosynthesis of MNPs), ktoré nielenže neohrozujú zdravie človeka, ale sú tiež priateľské k životnému prostrediu. Z tohto aspektu možno využiť tak cievnaté rastliny, ako aj riasy, baktérie a huby /prehľadne 6 /. Hovoríme o rastlinami sprostredkovanvej syntéze MNPs.

## **METÓDY NA PRÍPRAVU, STANOVENIE A CHARAKTERIZÁCIU NANOČASTÍC KOVOV**

Nanočastice kovov možno pripraviť dvomi hlavnými metódami (1) mechanickým delením kovových agregátov a (2) rastom „zárodkov“. Fyzikálne metódy (napr. redukcia kovových iónov pomocou ultrazvuku) však vedú nielen k tvorbe častíc s veľkou variabilitou ich veľkosti, ale syntéza takýchto MNPs nie je reprodukovateľná. Preto sa na syntézu MNPs častejšie používa metóda chemická, elektrochemická redukcia solí kovov alebo kontrolovaný rozklad organometalických zlúčenín (termálny rozklad alebo rozklad ultrazvukom). Medzi najpoužívanjšie metódy prípravy MNPs patria tie metodické postupy, keď pomocou vhodných podmienok možno pripraviť nanočastice požadovaných tvarov a veľkosti.

Na sledovanie vzniku MNPs a na ich charakterizáciu možno využiť viaceré experimentálne techniky, ako sú: UV-Vis spektroskopia, Fourierova transformačná infračervená spektroskopia (FTIR), skenovacia elektrónová mikroskopia (SEM), transmisná elektrónová mikroskopia (TEM), vysoko-rozlišovacia TEM (HRTEM), skenovacia TEM (STEM) a röntgenová fotoelektrónová spektroskopia /napr. 7/. Výber metód vhodných na stanovenie a charakterizáciu NPs a MNPs závisí od druhu NPs, veľkosti, tvaru a fyzikálno-chemických vlastností NPs. Osobitná pozornosť by sa mala venovať rozlišovacej schopnosti používaného meracieho prístroja.

## **ZELENÁ SYNTÉZA („green synthesis“) KOVOVÝCH NANOČASTÍC**

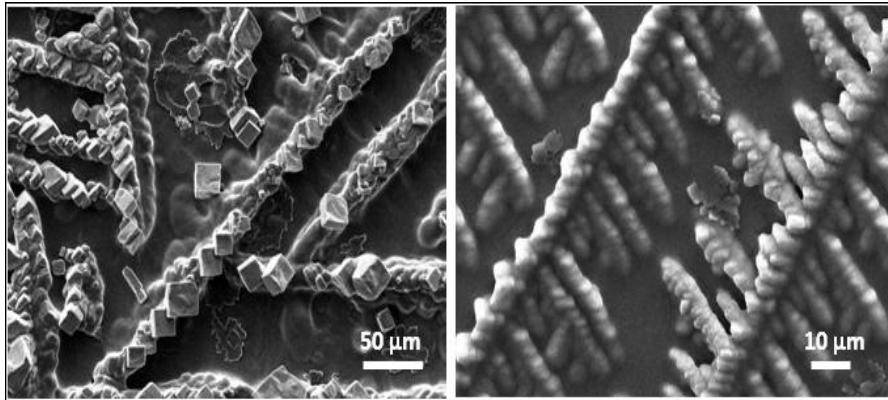
Na prípravu rôznych MNPs formou zelenej syntézy (angl. „green synthesis“) sa často ako redukčné činidlo používajú extrakty z listov. Pritom sa na dosiahnutie požadovanej veľkosti a tvaru nanočastíc používajú rôzne experimentálne techniky /prehľadne 8/. V našom príspevku sa zameriame iba na nanočastice Au, Ag a Pd, pretože pre tieto kovy ponúkame vlastné výsledky prof. Smita Sachin Zinjarde, ako spoluautorky nielen nášho príspevku, ale aj prehľadnej práce /9/.

### **Nanočastice zlata (AuNPs)**

Nanočastice zlata patria medzi najintenzívnejšie študované NPs, pretože majú široké využitie v medicíne (diagnostika a terapia rôznych závažných ochorení), v biologických a chemických snímacích technikách, v katalýze, v zobrazovacích, optických, elektronických a mikroelektronických technológiách. AuNPs možno nielen relatívne ľahko pripraviť, ale majú intenzívnu povrchovú plazmónovú rezonanciu a sú chemicky a teplotne stabilné /10/. AuNPs s veľmi rozmanitými tvarmi (sférický, trojuholníkový, hexagonálny, kubický alebo tyčinkový) možno syntetizovať pomocou fyzikálnych, chemických alebo biologických techník /prehľadne 11/. Avšak podľa niektorých autorov /napr.12/ fyzikálne a chemické metódy prípravy MNPs sú zložité a finančne náročné. Preto sa v súčasnosti uprednostňuje zelená syntéza MNPs, keď sa využíva rôznyi biologický materiál, často aj biologický odpad. V súčasnosti sú veľmi populárnymi šupky z banánov, ktoré sú k dispozícii nielen v značnom množstve, ale je to materiál prírodný („green“), dostupný, jednoduchý, netoxický a ekologicky priateľský. AuNPs sa syntetizujú z prášku pripraveného z banánových šupiek a HAuCl<sub>4</sub> rozpustenej v destilovanej vode, slúžiacej ako zdroj



Au. Úpravou reakčných podmienok (množstvo prášku z banánových šupiek, koncentrácia  $\text{HAuCl}_4$ , hodnota pH a teploty, dĺžka inkubácie) možno dosiahnuť požadovaný tvar a veľkosť nanočastíc. Fotografie AuNPs, ktoré syntetizovala vyššie uvedeným postupom prof. S. S. Zinjarde /9/ sú na Obr. 1.

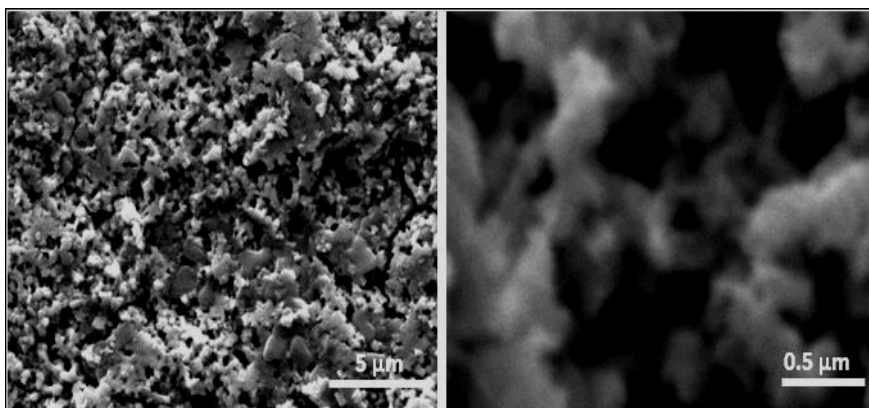


Obr. 1 Fotografie SEM, zobrazujúce nanočastice zlata pripravené z extraktu banánových šupiek, ktoré sú zoskupené v tvare mikrokociek (vľavo) a siete (vpravo) (Autor Smita Sachin Zinjarde).

### Nanočastice striebra (AgNPs)

AgNPs tiež vykazujú unikátne elektrické, optické a biologické vlastnosti a možno ich použiť v katalýze, medicíne (transport liečiv v ľudskom organizme), v snímacích a zobrazovacích technikách /prehľadne 13/, vykazujú antimikrobiálne účinky a považujú sa za novú generáciu antimikrobiálnych agens /14/. AgNPs možno syntetizovať fyzikálnymi /15/, chemickými /16/ a biologickými metódami /17/. Doteraz sa ako biologické systémy využili baktérie, huby, riasy a tiež prášok z banánových šupiek, ktorý sa použil aj ako biosorbent na odstránenie ťažkých kovov z kontaminovaného prostredia /prehľadne 18/.

Na Obr. 2 sú fotografie SEM koloidných nanoštruktúr Ag, pripravené z extraktu banánových šupiek, ktoré syntetizovala prof. S. S. Zinjarde /9/.



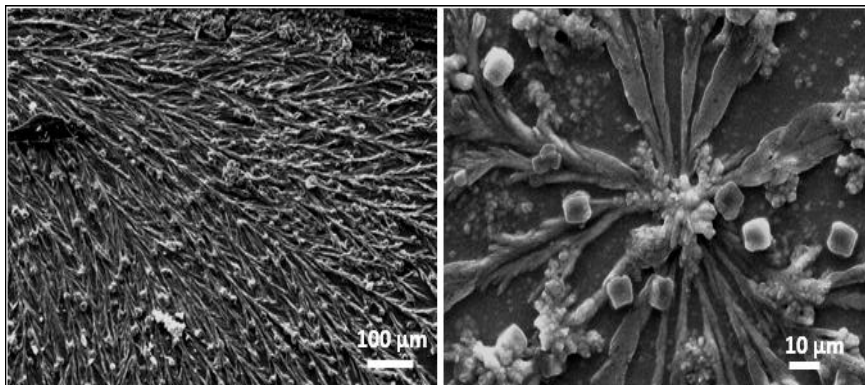
Obr. 2 Fotografie SEM nanoštruktúr Ag, pripravené z extraktu banánových šupiek (Autor Smita Sachin Zinjarde).

### Nanočastice paládia (PdNPs)

V porovnaní s AuNPs a AgNPs sa PdNPs sa využívajú menej frekventovane. Určité uplatnenie PdNPs našli v katalýze, vo výrobe senzorov a príprave aktívnych membrán /19/. Avšak z vedeckého aspektu sú PdNPs zaujímavé hlavne pre pozoruhodnú variabilitu ich tvaru /20/. Možno ich pripraviť chemickými /21/, elektrochemickými /22/ alebo sonochemickými spôsobmi /23/. Z biologického materiálu sa doteraz na syntézu PdNPs použili extrakty z rastlín druhov



*Annona squamosa*, *Cinnamomum zeylanicum* alebo banánovníka *Musa paradisiaca* (hybrid medzi *Musa acuminata* a *Musa balbisiana*). Na Obr. 3 sú fotografie SEM, zobrazujúce rôzne tvary PdNPs pripravených z extraktu banánových šupiek, ktoré syntetizovala prof. S.S. Zinjarde /9/.



Obr. 3. Fotografie SEM, zobrazujúce nanočastice paládia pripravené z extraktu banánových šupiek, ktoré sú zoskupené do dendritov (vľavo) a do mikrokociek (vpravo) (Autor Smita Sachin Zinjarde).

### FUNKCIA NANOČASTÍC KOVOV V RASTLINÁCH

Napriek tomu, že doteraz nebola publikovaná práca, ktorá by analyzovala príčiny syntézy a plnenie funkcie MNPs kovov v rastlinách, je nepochybné, že ich tvorba a účinky na štruktúru, funkčné charakteristiky a biológiu rastlín (metabolické, biochemické a fyziologické procesy) musia mať svoje opodstatnenie. Vyplýva to aj z doteraz zistených účinkov MNPs na rôzne životné formy organizmov vrátane nižších (riasy) a vyšších (cievnatých) rastlín, ktoré sme okrem našej prehľadnej práce /9/ stručne vyhodnotili aj v nasledujúcom texte tohto príspevku. Vychádzajúc z tejto skutočnosti možno konštatovať, že štúdium MNPs v rastlinách perspektívne predstavuje silnú motiváciu tak pre vedeckú komunitu, ako aj pre aplikačnú sféru.

### ÚČINKY NANOČASTÍC KOVOV NA RASTLINY

Biogénne prvky (bioelementy) sú nevyhnutné pre zabezpečenie všetkých fyziologických procesov a funkcií rastlín (vrátane funkčných charakteristík), prebiehajúcich v stonke aj koreňoch rastlín. Iónová forma aj nanočastice týchto prvkov majú pozitívny a tiež negatívny účinok na nižšie aj cievnaté rastliny. V nasledujúcom texte stručne prezentujeme účinky niektorých nanočastíc kovov na najdôležitejšie procesy rastlín.

#### Pozitívne účinky

Nanočastice oxidu železnatého (FeO NPs) v koncentrácii  $0.75 \text{ g L}^{-1}$  aplikované v poľných podmienkach vo forme spreju na rastliny sóje zvýšili nielen celkovú suchú hmotnosť rastlín, ale spôsobili aj o 48% vyššiu úrodu plodov /24/. Tieto NPs tiež stimulovali transport asimilátov a iónov železa do listov hrachu /25/. U kukurice zase stimulovali veľkosť rastlín aj syntézu chlorofylov a nukleových kyselín /26/. Pozitívne účinky na klíčenie a rast rastlín špenátu sa zaznamenali aj v prípade nanočastíc  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , ZnO alebo  $\text{TiO}_2$  /27/. Po aplikovaní  $\text{TiO}_2$  NPs na špenát sa zistila vyššia koncentrácia RuBISCO, bielkovín, mRNA aj vyššia rýchlosť fotosyntézy v porovnaní s kompaktnou formou (angl. bulk)  $\text{TiO}_2$  /28/. U hydroponicky pestovanej kukurice v prípade rovnakého porovnávajúceho experimentu /29/ po aplikácii NPs pozorovali zase intenzívnejší (o 300% väčší) predĺžovací rast koreňov. Po pôsobení  $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs sa zvýšila akumulácia biomasy v rastlinách lekna, čo bolo spojené so zvýšením fotosyntetickej účinnosti, predovšetkým svetelných reakcií fotosyntézy /30/. Tieto nanočastice v prípade arábkovky thalovej spôsobili predĺžovanie koreňov. Ukázalo sa, že  $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs majú v rastlinách podobnú funkciu

ako perlit v pôde, ktorý zvyšuje transport plynov, chráni pred stratou vody a zabraňuje zhutňovaniu pôdy /31/.

### Negatívne účinky

V súvislosti s rýchlym vývojom nových materiálov, najmä syntetických NPs (angl. engineered NPs) je však potrebné zdôrazniť, že je nevyhnutné sledovať ich možný ekotoxikologický dopad. Bunky rastlín majú bunkové steny, ktoré tvoria primárnu bariéru pre vstup MNPs do buniek a následne do pletív a rastlinných orgánov. Podľa niektorých autorov /napr. 32/ NPs môžu indukovať tvorbu nových pórov a iných ciest pre prechod NPs do buniek, kde môžu priamo ovplyvňovať membránový systém a iné bunkové štruktúry a biomolekuly, čo môže negatívne pôsobiť na rastliny.

S ohľadom na obmedzený rozsah príspevku uvedieme iba niekoľko príkladov negatívneho vplyvu nanočastíc striebra, keďže tieto nanočastice boli aj predmetom nášho záujmu. Napr. /33/ zistili, že AgNPs v porovnaní s kompaktným striebrom redukovali o 66-84 % biomasu a rýchlosť transpirácie rastlín tekvice obyčajnej, pričom koncentrácia striebra bola v AgNPs 4,4-10 krát vyššia. V pokusoch s koreňovými bunkami cesnaku /34/ sledovali cytotoxický a genotoxický vplyv AgNPs a zaznamenali, že so stúpajúcou koncentráciou AgNPs (0-100 ppm) mitotický index klesal a dochádzalo k dezintegrácii buniek. Po aplikácii AgNPs na rastliny mätonoha sa síce inhiboval ich rast, ale obsah striebra v stonke aj koreni stúpil s dĺžkou expozície AgNPs /35/. Avšak /36/ upozornili na skutočnosť, že inhibíciu rastu a poškodenie buniek možno prisúdiť buď vplyvu samotných AgNPs alebo schopnosti AgNPs dopraviť ióny striebra k príslušným receptorom.

### **VYUŽITIE NANOČASTÍC KOVOV VO FYTOREMEDIÁČNYCH TECHNO-LÓGIÁCH**

V práci /37/ sa prvýkrát prezentoval nový spôsob recyklovania kovov z rastlinného materiálu pomocou zelenej syntézy nanočastíc oxidu kovu (angl. green metallic oxide NP synthesis). V experimentoch s divo rastúcim druhom *Physalis alkekengi*, klasifikovaným ako hyperakumulátor zinku, sa potvrdila syntéza nanočastíc ZnO o priemernej veľkosti 72,5 nm, ktoré boli polydisperzné, mali kryštalický charakter a trojuholníkový tvar. Rastliny *P. alkekengi* rástli bez poškodenia v pôde s koncentráciou Zn od 50 do 5000 mg kg<sup>-1</sup> pôdy, pričom po dobu 12 týždňov sa v stonke akumulovalo 235-10980 mg Zn kg<sup>-1</sup> pôdy. Pre rozsiahle praktické využitie NPs vo fytořemediačných technológiách je však potrebný ďalší výskum /prehľadne 9 a 38/.

### **LITERATÚRA**

- /1/ El-Sayed, M. A.: Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes. *Accounts of Chemical Research* 34, 2001: 257-264.
- /2/ Kraynov, A. and Müller, T. E.: Concepts for the stabilization of metal nanoparticles in ionic liquids. In: Handy S. (ed.): Application of ionic liquids in science and technology. *InTechOpen*, 2011, p. 235-260.
- /3/ Huang, C. C., Yang, Z., Lee, K. H. et al.: Synthesis of highly fluorescent gold nanoparticles for sensing mercury(II). *Angewandte Chemie International Edition* 46, 2007: 6824-6828.
- /4/ Sun, Y. and Xia, Y.: Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science, New Series*, 298, 2002: 176-2179.
- /5/ Zhang, J. Z.: Biomedical application of shape-controlled plasmonic nanostructures: A case study of hollow gold nanospheres for photothermal ablation therapy of cancer. *Journal of Physical Chemistry Letters*. 1, 2010: 686-695.
- /6/ Masarovičová, E. and Kráľová, K.: Metal nanoparticles and plants. *Ecological Chemistry and Engineering* 20, 2013: 9-22.
- /7/ Ghatak, K. L.: *Techniques and Methods in Biology*. New Delhi: PHI Learning, 2011.
- /8/ Narayanan, K. B. and Sakthivel, N.: Extracellular synthesis of silver nanoparticles using the leaf extract of *Coleus amboinicus* Lour. *Materials Research Bulletin* 45, 2011: 1708-1713.
- /9/ Masarovičová E., Kráľová K. Zinjarde S.S.: Metal nanoparticles in plants – formation and action. In: Handbook of Plant and Crop Physiology, M. Pessarakli (ed.). CRC Press, Taylor and Francis Group, LLC, Boca Raton, 2014, p. 683-731.

- /10/ Jennings, T. and Strouse, G.: Past, present, and future of gold nanoparticles. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 620, 2007: 34-47.
- /11/ Gates, B. D., Xu, Q., Stewart, M. et al.: New approaches to nanofabrication: molding, printing, and other techniques. *Chemical Reviews* 105, 2005: 1171-1196.
- /12/ Daniel, M. C. and Astruc, D.: Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis and nanotechnology. *Chemical Reviews* 104, 2004: 293-294.
- /13/ Jain, P. K., Huang, X., El-Sayed, I. H. et al.: Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some application in imaging, sensing, biology, and medicine. *Accounts of Chemical Research* 41, 2008: 1578-1586.
- /14/ Rai, M., Yadav, A., Gade, A.: Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* 27, 2009: 76-83.
- /15/ Nair, L. S. and Laurencin, C. T.: Silver nanoparticles: synthesis and therapeutic applications. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 3, 2007: 301-316.
- /16/ Zhang, Y., Peng, H., Huang, W. et al.: Facile preparation and characterization of highly antimicrobial colloid Ag or Au nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* 325, 2008: 371-376.
- /17/ Sharma, V. K., Yngard, R. A., Lin, Y.: Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science* 145, 2009: 83-96.
- /18/ Bankar, A., Joshi, B., Kumar, A. R. et al.: Banana peel extract mediated novel route for the synthesis of silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 368, 2010: 58-63.
- /19/ Mubeen, S., Zhang, T., You, B. et al.: Palladium nanoparticles decorated single-walled carbon nanotube hydrogen sensor. *Journal of Physical Chemistry* 111, 2007: 6321-6327.
- /20/ Bankar, A., Joshi, B., Kumar, A. R. et al.: Banana peel extract mediated novel route for the synthesis of palladium nanoparticles. *Materials Letters* 64, 2010: 1951-1953.
- /21/ Schmid, G.: Large clusters and colloids-metals in the embryonic state. *Chemical Reviews* 92, 1992: 1709-1727.
- /22/ Li, F., Zhang, B., Dong, S. et al.: A novel method of electrodepositing highly dispersed nano palladium particles on glassy carbon electrode. *Electrochimica Acta* 42, 1997 : 2563-2568.
- /23/ Nemamcha, A., Pehsprinter, J. L., Khatmi, D.: Synthesis of palladium nanoparticles by sonochemical reduction of palladium(II) nitrate in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry B*, 110, 2006: 383-387.
- /24/ Sheykhbaglou, R., Sedghi, M., Tajbakhsh, S. et al.: Effects of nano-iron oxide particles on agronomic traits of soybean. *Notulae Scientia Biologicae* 2, 2010: 112-113.
- /25/ Liu, X. M., Zhang, F. D., Zhang, S. Q. et al.: Effects of nano-ferric oxide on the growth and nutrients absorption of peanut. *Plant Nutrition and Fertilizer Science* 11, 2005: 14-18.
- /26/ Racuciu, M. and Creanga, D. E.: TMA-OH coated magnetic nanoparticles internalized in vegetal tissues. *Romanian Journal of Physics* 52, 2007.: 395-402.
- /27/ Yang, F., Hong, F., You, W. et al.: Influences of nano-anatase TiO<sub>2</sub> on the nitrogen metabolism of growing spinach. *Biological Trace Element Research* 110, 2006: 179-190.
- /28/ Wang, X. M., Gao, F. Q., Ma, L. L. et al.: Effects of nano-anatase on ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase mRNA expression in spinach. *Biological Trace Element Research* 126, 2008: 280-289.
- /29/ Servin, A. D., Castillo-Michel, H., Hernandez-Viezcas, J. A. et al.: Synchrotron micro-XRF and micro-XANES confirmation of the uptake and translocation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Environmental Science & Technology* 46, 2012.: 7637-7643.
- /30/ Juhel, G., Batisse, E., Hugues, Q. et al.: Alumina nanoparticles enhance growth of *Lemna minor*. *Aquatic Toxicology* 105, 2011: 328-336.
- /31/ Lee, C. W., Mahendra, S., Zodrow, K. et al.: Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 2010: 669-675.
- /32/ Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B. et al.: Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology* 42, 2008.: 8959-8964.
- /33/ Musante, C. and White, J. C.: Toxicity of silver and copper to *Cucurbita pepo*: Differential effects of nano and bulk-size particles. *Environmental Toxicology* 27, 2012: 510-517.
- /34/ Kumari, M., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N.: Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of the Total Environment* 407, 2009: 5243-5246.
- /35/ Yin, L.Y., Cheng, Y. W., Espinasse, B., et al.: More than the ions: The effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental Science & Technology* 45, .2011: 2360-2367.

- /36/ Mazumdar, H. and Ahmed, G. U.: Synthesis of silver nanoparticles and its adverse effect on seed germinations in *Oryza sativa*, *Vigna radiata* and *Brassica campestris*. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research* 2, 2011: 404-413.
- /37/ Qu, J., Yuan, X., Wang, X. H. et al.: Zinc accumulation and synthesis of ZnO nanoparticles using *Physalis alkekengi* L. *Environmental Pollution* 159, 2011: 1783-1788.
- /38/ Masarovičová E., Kráľová K. Plant-heavy metal interaction: Phytoremediation, biofortification and nanoparticles *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*. - Rijeka : InTech, 2012, p. 75-102.

### **Pod'akovanie**

Tento článok vznikol vďaka finančnej podpore grantovej agentúry VEGA – grant č. 1/0218/14.

## KVALITA A ZDRAVIE PÔDY V RÔZNE VYUŽÍVANÝCH A ZATAŽENÝCH ÚZEMIACH

### QUALITY AND SOIL HEALTH IN DIFFERENTLY USED AND DETERIORATED AREAS

Danica Fazekašová<sup>1</sup>, Juraj Fazekaš<sup>1</sup>, Lenka Angelovičová<sup>2</sup>, Eva Michaeli<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Prešovská univerzita v Prešove, FM, Katedra environmentálneho manažmentu, Ul. 17. Novembra č. 1, 08116 Prešov, Slovenská republika – danica.fazekasova@unipo.sk

<sup>2</sup> Prešovská univerzita v Prešove, FHPV, Katedra ekológie, Ul. 17. Novembra č. 1, 08116 Prešov, Slovenská republika

<sup>3</sup> Prešovská univerzita v Prešove, FHPV, Katedra geografie a aplikovanej geoinformatiky, Ul. 17. Novembra č. 1, 08116 Prešov, Slovenská republika

#### Summary

The work focuses on the analysis of scientific knowledge on soil quality in differently used and deteriorated areas of northeastern Slovakia. To assess the quality of soil, the quantified spatial and temporal variability of physical, chemical and biological soil properties was conducted, as well as their correlation in terms of the ecological system of farming in marginal areas of the north-eastern Slovakia, specifically in the territory of Liptovská Teplička. Using similar methodological procedures, decrease of soil quality in metallic polluted and the unhealthy region of Middle Spiš was observed. Useful in monitoring of environmental pollution of soil are seen microbial parameters, which quickly respond to environmental stress causing changes in physical and chemical characteristics, which leads to early detection of soil degradation. This study highlights the importance of long-term monitoring of soil in determining changes in soil ecosystem.

*Key words: soil ecosystem, soil parameters, soil enzymes, heavy metals*

#### Zhrnutie

Práca je zameraná na analýzu vedeckých poznatkov o kvalite pôdy v rôzne využívaných a zaťažených územiach severovýchodného Slovenska. Pre posúdenie kvality pôdy bola kvantifikovaná priestorová a časová variabilita fyzikálnych, chemických a biologických vlastností pôdy a ich vzájomné korelácie v podmienkach s ekologickým systémom hospodárenia v marginálnych oblastiach severovýchodného Slovenska na území Liptovská Teplička. Podobnými metodickými postupmi bolo sledované znižovanie kvality pôdy v metalicky zaťaženom a hygienicky závadnom regióne stredného Spiša. Užitočnými v monitorovaní environmentálneho znečistenia pôdy sa javia mikrobiálne parametre, ktoré rýchlo odpovedajú na environmentálne stresy a môžu viesť k zmenám fyzikálnych a chemických vlastností, čo vedie k skorému odhaleniu degradácie pôdy. Táto štúdia podčiarkuje význam dlhodobého monitorovania pôdy pri určovaní zmien v pôdnom ekosystéme.

*Kľúčové slová: pôdny ekosystém, pôdne parametre, pôdne enzýmy, ťažké kovy*

## ÚVOD

Kvalita pôdy vyjadruje schopnosť pôdy zabezpečovať environmentálne funkcie pri jej konkrétnom spôsobe využitia. V odbornej literatúre sa kvalita pôdy nahrádza pojmom zdravie pôdy, ktoré v širšom slova zmysle vyjadruje ochranu a zvyšovanie biologickej produktivity, environmentálnej kvality a podporu zdravia všetkých žijúcich foriem, vrátane človeka. V tomto ponímaní môže byť zdravie pôdy synonymom udržateľnosti. Kvalitu pôdy nemôžeme stanoviť priamo, ale môžeme ju odvodiť zo zmien jej parametrov. Pôdne parametre vyjadrujú stav vlastností pôdneho ekosystému, ktoré odrážajú najmä produkčnú, pufračnú, filtračnú a iné funkcie

pôdy. V tomto zmysle sa ako najdôležitejšie javia stavba pôdneho profilu (pôdny typ), pôdny druh, hĺbka pôdy, skeletovitosť, obsah a kvalita humusových látok, prístupná zásoba živín, pôdna reakcia, obsah cudzorodých látok v pôde, pôdny edafón. Hodnoty parametrov môžu mať povahu dolného limitu (napr. obsah živín), horného limitu (obsah znečisťujúcich látok), interval vhodnosti (fyzikálne parametre pôdy), a interval nevhodnosti (pH v niektorých prípadoch, pôdny typ). Kvalitu pôdy vo významnej miere ovplyvňujú fyzikálne, chemické, biologické a biochemické vlastnosti. Enzymatickú aktivitu možno použiť ako mikrobiálny indikátor kvality pôdy, pretože aktivita pôdnych enzýmov je v úzkom vzťahu k dôležitým pôdnym charakteristikám a môže vykazovať zmeny skôr než iné pôdne vlastnosti. Znižovanie kvality pôdy môžeme odvodzovať od hodnôt kritického zaťaženia rizikovými látkami /4, 5, 12/.

Cieľom práce je analyzovať a zhodnotiť vybrané pôdne parametre ako indikátory kvality a zdravia pôdy v rôzne využívaných a zaťažených územiach severovýchodného Slovenska.

## MATERIÁL A METODA

Pre posúdenie kvality pôdy sme kvantifikovali priestorovú a časovú variabilitu fyzikálnych, chemických a biologických vlastností pôdy a ich vzájomné korelácie v podmienkach s ekologickým systémom hospodárenia v marginálnych oblastiach severovýchodného Slovenska na území Liptovská Teplička, ktorá patrí do NP Nízke Tatry. Podobnými metodickými postupmi sme sledovali znižovanie kvality pôdy v metalicky zaťaženom a hygienicky závadnom regióne stredného Spiša, kde sa dlhodobo ťažila a spracovávala Cu a Hg. Výskum sme uskutočnili v štyroch k.ú. Krompachy, Slovinky, Rudňany a Poráč (Obr. 1).

Z biologických vlastností pôdy sme sledovali aktivitu ureázy podľa Galstjana /10/, aktivitu kyslej a alkalickéj fosfatázy podľa Chazijeva modifikovanou metódou Grejtovského /8/. Z fyzikálnych vlastností sme sledovali a hodnotili objemovú hmotnosť [ $t \cdot m^{-3}$ ], celkovú pórovitosť [%] v Kopeckého fyzikálnych valčekoch. Z chemických vlastností sme sledovali výmenné pH (pH/CaCl<sub>2</sub>) potenciometricky, obsah organického uhlíka (C<sub>ox</sub>) podľa Ťurina, obsah anorganického dusíka (N<sub>anorg</sub>) metódou Jodlbauera, obsah prístupných živín (P, K, Mg) podľa Mehlicha III. a obsah vybraných ťažkých kovov (Pb, Cd, Ni, Zn, Cu) metódou atómovej adsorpčnej spektroskopie /6/.

Výsledky analýz boli vyhodnotené matematicko-štatistickými metódami s využitím štatistického programu Statistica 10.0.



Obrázok 1: Skúmané lokality na území severovýchodného Slovenska

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výskum ukázal, že fyzikálne, chemické a biologické vlastnosti pôdy boli v podmienkach udržateľného hospodárenia na pôde stabilné a dosahovali porovnateľné hodnoty pre daný pôdny typ a druh. Vysoké dávky organických hnojív mali pozitívny vplyv na úrodnosť pôdy, a tým nepriamo na udržanie pH pôdy, obsah prístupných živín a hromadenie humusu v pôde. Analýzou variancie bol potvrdený štatisticky významný vplyv roka a lokality na všetky sledované parametre pôdy s výnimkou pH/CaCl<sub>2</sub>, C<sub>ox</sub> (tab. 1).

Enzymatická aktivita pôdy je považovaná za kritický indikátor pôdnej kvality, pretože kontroluje uvoľňovanie živín pre rastliny a rast mikroorganizmov. V našom výskume sme sledovali aktivitu pôdnej ureázy, ktorá sa podieľa na zániku a pretváraní močoviny a aktivitu kyslej a alkalickéj fosfatázy, ako významné aktívatory sprístupňovania organického fosforu pre rastliny. Namerané hodnoty aktivít pôdnych enzýmov odpovedajú hodnotám pre pôdy s riedkou vegetáciou /5/.

V nadväznosti na uvedené zistenia sme sledovali aj obsah rizikových prvkov olova, kadmia a niklu. Z hodnotenia vyplynulo, že obsah rizikových prvkov v pôde nedosiahol maximálne prípustné hodnoty pre SR /13/ a namerané hodnoty odpovedali prirodzeným obsahom sledovaných prvkov v pôde a materských horninách. Zároveň v ekologických systémoch nedochádza k antropogénnemu znečisťovaniu aplikáciou chemických látok a kalov do pôdy /1/.

Tab. 1: Vybrané pôdne parametre a ťažké kovy v pôde v podmienkach udržateľného využívania pôdy

parameter	min.	max.	priemer	smerodajná odchýlka	P	zdroje variability
objemová hmotnosť [t.m <sup>-3</sup> ]	1,04	1,35	1,18	0,016347	++	rok lokalita
porovitosť [%]	49,15	60,56	55,52	0,617864	++	rok lokalita
pH/CaCl <sub>2</sub>	5,77	7,13	6,41	0,083124	-	rok lokalita
C <sub>ox</sub> [%]	2,25	3,61	3,03	0,084802	-	rok lokalita
N <sub>anorg</sub> [mg.kg <sup>-1</sup> ]	16,76	40,50	27,52	1,698623	++	rok lokalita
P <sub>avail</sub> [mg.kg <sup>-1</sup> ]	19,97	127,88	64,63	3,494827	++	rok lokalita
K <sub>avail</sub> [mg.kg <sup>-1</sup> ]	168,59	427,98	290,91	12,5772	++	rok lokalita
Mg <sub>avail</sub> [mg.kg <sup>-1</sup> ]	215,98	301,43	265,0	4,918103	++	rok lokalita
Pb 2M HNO <sub>3</sub> [mg.kg <sup>-1</sup> ]	7,77	22,18	14,11	0,823555	++	rok lokalita
Cd 2M HNO <sub>3</sub> [mg.kg <sup>-1</sup> ]	0,129	0,697	0,343	0,037233	++	rok lokalita
Ni 2M HNO <sub>3</sub> [mg.kg <sup>-1</sup> ]	0,934	3,436	2,392	0,140375	++	rok lokalita
ureáza [mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> - N.g <sup>-1</sup> .24hour <sup>-1</sup> ]	0,454	0,674	0,551	0,007954	++	rok lokalita
kyslá fosfatáza [μg P.g <sup>-1</sup> .3hour <sup>-1</sup> ]	271,23	306,77	294,91	2,65001	++	rok lokalita
alkalická fosfatáza [μg P.g <sup>-1</sup> .3hour <sup>-1</sup> ]	264,35	329,33	291,97	1,96567	++	rok lokalita

++P<0,01 +P<0,05

Tab. 1: Vybrané pôdne parametre a ťažké kovy v pôde v podmienkach udržateľného využívania pôdy

parameter	min.	max.	priemer	smerodajná odchýlka	P	zdroje variability
objemová hmotnosť [t.m <sup>-3</sup> ]	1,04	1,35	1,18	0,016347	++	rok lokalita
porovitosť [%]	49,15	60,56	55,52	0,617864	++	rok lokalita
pH/CaCl <sub>2</sub>	5,77	7,13	6,41	0,083124	-	rok lokalita
C <sub>ox</sub> [%]	2,25	3,61	3,03	0,084802	-	rok lokalita
N <sub>anorg</sub> [mg.kg <sup>-1</sup> ]	16,76	40,50	27,52	1,698623	++	rok lokalita
P <sub>avail</sub> [mg.kg <sup>-1</sup> ]	19,97	127,88	64,63	3,494827	++	rok lokalita
K <sub>avail</sub> [mg.kg <sup>-1</sup> ]	168,59	427,98	290,91	12,5772	++	rok lokalita
Mg <sub>avail</sub> [mg.kg <sup>-1</sup> ]	215,98	301,43	265,0	4,918103	++	rok lokalita
Pb 2M HNO <sub>3</sub> [mg.kg <sup>-1</sup> ]	7,77	22,18	14,11	0,823555	++	rok lokalita
Cd 2M HNO <sub>3</sub> [mg.kg <sup>-1</sup> ]	0,129	0,697	0,343	0,037233	++	rok lokalita
Ni 2M HNO <sub>3</sub> [mg.kg <sup>-1</sup> ]	0,934	3,436	2,392	0,140375	++	rok lokalita
ureáza [mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> - N.g <sup>-1</sup> .24hour <sup>-1</sup> ]	0,454	0,674	0,551	0,007954	++	rok lokalita
kyslá fosfatáza [μg P.g <sup>-1</sup> .3hour <sup>-1</sup> ]	271,23	306,77	294,91	2,65001	++	rok lokalita
alkalická fosfatáza [μg P.g <sup>-1</sup> .3hour <sup>-1</sup> ]	264,35	329,33	291,97	1,96567	++	rok lokalita

++P&lt;0,01 +P&lt;0,05

Tab. 2: Korelačné závislosti medzi vybranými pôdnymi parametrami v podmienkach udržateľného využívania pôdy

parameter	ureáza	kyslá fosfatáza	alkalická fosfatáza
objemová hmotnosť	-0.088	-0.036	-0.032
porovitosť	0.089	0.036	0.033
pH/CaCl <sub>2</sub>	0.255	-0.207	-0.164
C <sub>ox</sub>	0.176	0.086	0.022
N <sub>anorg</sub>	0.012	0.119	0.066
P <sub>avail</sub>	0.297	-0.173	-0.125
K <sub>avail</sub>	<b>0.378<sup>+</sup></b>	<b>-0.322<sup>+</sup></b>	-0.099
Mg <sub>avail</sub>	-0.285	-0.281	-0.280
Pb	-0.057	<b>0.441<sup>+</sup></b>	<b>0.378<sup>+</sup></b>
Cd	-0.039	0.220	0.258
Ni	-0.293	<b>0.492<sup>+</sup></b>	<b>0.354<sup>+</sup></b>

++P&lt;0,01 +P&lt;0,05

Na základe výskumu pôdných ekosystémov, ktoré sa využívajú ako trvalé trávne porasty a nachádzajú sa v imisnom poli hald a odkalísk banského materiálu na území stredného Spiša, sme zistili závažné znečistenie ťažkými kovmi extrémne vysokými hodnotami medi, zinku,



arzenu, kadmia, olova a ortuti (tab. 3). So zvyšujícím sa obsahom ťažkých kovov v pôde sme zaznamenali zníženie aktivity pôdnych enzýmov, ktoré sú považované za vhodný indikátor pôdnej kontaminácie /2, 14/. Z výsledkov štatistického spracovania vyplynulo (tab. 4), že aktivita pôdnej ureázy reaguje na pôdne znečistenie oveľa citlivejšie v porovnaní s fosfatázami, na čo poukazujú vo svojich prácach viacerí autori /7, 11/. Užitočnými v monitorovaní environmentálneho znečistenia pôdy, resp. hodnotenia jej kvality sa javia mikrobiálne parametre (aktivita pôdnych enzýmov), ktoré rýchlo odpovedajú na environmentálne stresy a môžu viesť k zmenám fyzikálnych a chemických vlastností, čo vedie k skorému odhaleniu degradácie pôdy. Pôdna reakcia predstavuje základnú pôdnu vlastnosť, ktorá ovplyvňuje biochemické procesy v pôde /9/. Na hodnotených lokalitách stredného Spiša bola pôdna reakcia v kategóriách extrémne kyslá až slabo kyslá. Táto skutočnosť môže byť ovplyvnená vysokým obsahom ťažkých kovov v pôdnom prostredí, ktoré môžu spôsobiť zmeny pôdnej reakcie z alkalickéj na kyslú /3/.

Tab. 3: Vybrané pôdne parametre a ťažké kovy v pôde na území stredného Spiša

parameter	min	max	priemer	smerodajná odchýlka
objemová hmotnosť [t.m <sup>-3</sup> ]	1,01	1,66	1,26	0,0910894007
pórovitosť [%]	37,49	62,06	52,44	3,44574044
pH/CaCl <sub>2</sub>	4,5	6,2	5,33	0,2081666
Cox [%]	2,05	5,49	3,51	0,492630129
P [mg kg <sup>-1</sup> ]	20	179	71,67	24,708523
K [mg kg <sup>-1</sup> ]	50	374	156,33	50,3094866
Mg [mg kg <sup>-1</sup> ]	122	266	206	30,9865562
Cu [mg.kg <sup>-1</sup> ]	35	1271	271,92	359,3
As [mg.kg <sup>-1</sup> ]	36	170	104,8	51,6
Cd [mg.kg <sup>-1</sup> ]	0	4	1,38	1,45
Pb [mg.kg <sup>-1</sup> ]	10	380	82,33	107,83
Zn [mg.kg <sup>-1</sup> ]	49	1333	316,25	377,05
Hg [mg.kg <sup>-1</sup> ]	0,35	32,7	9,37	8,95
ureáza [mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> - N.g <sup>-1</sup> .24hour <sup>-1</sup> ]	0,15	0,45	0,24	0,11
kyslá fosfatáza [μg P.g <sup>-1</sup> .3hour <sup>-1</sup> ]	50,02	250,4	126,52	55,39
alkalická fosfatáza [μg P.g <sup>-1</sup> .3hour <sup>-1</sup> ]	29,95	198,9	105,93	47,08

Tab. 4: Korelačné závislosti medzi celkovým obsahom ťažkých kovov a vybranými pôdnymi charakteristikami na území stredného Spiša

	pH	Cu	As	Cd	Pb	Zn	Hg
ureáza	-0,173	-0,283	-0,437	-	-0,589 <sup>+</sup>	-0,569 <sup>+</sup>	-0,471 <sup>+</sup>
kyslá fosfatáza	-0,568 <sup>+</sup>	-0,328	-0,301	-	-0,104	0,123	-0,096
alkalická fosfatáza	-0,476 <sup>+</sup>	-0,201	-0,216	-	0,029	0,325	-0,161

<sup>++</sup>P<0,01 <sup>+</sup>P<0,05

## LITERATÚRA

- /1/ Barančíková, G.: The Proposal of Special Classification of Agricultural Soils of Slovakia from Viewpoint of their Sensibility to Contamination by Heavy Metals. Plant Production, 44, 1998: 117-122.  
 /2/ Barton, L., Schipper, L.A., Smith, C.T., Mclay, C.D.A.: Denitrification enzyme activity is limited by soil reaction in a wastewater-irrigated soil. Biology and fertility of soils, 32, 2000: 385-389.

- /3/ Brehuv, J., Bobro, M., Hančulák, J., Špaldon, T., Slančo, P. 2005. Vplyv starých environmentálnych záťaží na kontamináciu tokov ústiacich do nádrže vodného diela „Ružín I“ vybranými prvkami v roku 2004. *Acta Montanistica Slovaca*, 10, 2005: 322-328.
- /4/ Bujnovský, R., Juráni, B.: Kvalita pôdy – jej vymedzenie a hodnotenie. Bratislava: VÚPOP, 1999: 42.
- /5/ Fazekašová, D.: Evaluation of Soil Quality Parametres Development in Terms of Sustainable Land Use. In: Curkovic, S. (ed). *Sustainable Development – Autoritative and Leading Edge Content for Environmental Management*, 2012: 435-458.
- /6/ Fiala, K., Barančíková, G., Brečková, V., Búrik, V., Houšková, B., Chomaničová, A., Kobza, J., Litavec, T., Makovníková, L., Pechová, B., Váradiová, D.: *Partial Monitoring System – Soil, Binding methods*, 1st ed., (in slovak), Soil Science and Conservation Research Institute, 1999: 138.
- /7/ Gao, Y., Zhou, P., Mao, L., Zhi, Y., Shi, W.: Assessment of effects of heavy metals combined pollution on soil enzyme activities and microbial community structure: modified ecological dose-response model and PCR-RAPD. *Environmental Earth Science*, 60, 2010: 603-612.
- /8/ Grejtovský, A.: Influence of soil improvers on enzymatic activity of heavy alluvial soil (in slovak). *Plant Production*, 37, 1991: 289-295.
- /9/ Hohl, H., Varma, A.: Soil: The living matrix. 1-18. Sherameti, I, Varma, A (eds.) *Soil heavy metals*. London: Springer-Verlag, 2010.
- /10/ Chaziev, F. Kh.: Soil enzyme activity (in russian). *Nauka, Moskva*, 1976: 106-120.
- /11/ Qu, J., Ren, G., Chen, B, Fan, J.: Effects of lead and zinc mining contamination on bacterial community, diversity and enzyme activities of vicinal cropland. *Environmental Monitoring and Assessment*, 182, 2011: 597-606.
- /12/ Wick, B., Kuhne, R. F., Vielhauer, K.: Temporal variability of selected soil microbiological and biochemical indicators under different soil quality conditions in south-western Nigeria. *Biology and Fertility of Soils*, 35, 2002: 115-121.
- /13/ Zákon NR SR č. 220/2004 Z. z. o ochrane a využívaní poľnohospodárskej pôdy a o zmene zákona č. 245/2006 Z.z. o integrovanej prevencii a kontrole znečisťovania životného prostredia a o zmene a doplnení niektorých zákonov.
- /14/ Zhang, Y.M., Dai, J.L., Wang, R.Q., Zhang, J.: Effects of long-term sewage irrigation on agricultural soil microbial structural and functional characterizations in Shandong, China. *European Journal of Soil Biology*, 44, 2008: 84-91.

### Pod'akovanie

Uvedená práca vznikla za finančnej podpory VEGA 1/0627/12, KEGA 012 PU-4/2012 a APVV 0163-11.

## PRÍČINY ZVÝŠENIA VÝSKYTU ŠKODLIVÝCH ČINITELŤOV NA DREVINÁCH

### THE REASONS OF INCREASED OCCURUENCE OF HARMFUL AGENTS IN WOODY PLANTS

Gabriela Juhásová, Marek Kobza, Radovan Ostrovský, Emília Ondrušková  
Ústav ekológie lesa SAV Zvolen, Pobočka biológie drevín, Akademická 2, 949 01 Nitra,  
gabriela.juhasova@savzv.sk, ondruskov@savzv.sk, marek.kobza@savzv.sk, radovan.ostrovsky@savzv.sk

#### Summary

There are the results of increased occurrence of diseases and damages causative agents of woody plants at important dendrological collections and in urban environment. Expansion of agents will be compared by location, growing method and climate. The woody plants from genus *Castanea*, *Platanus*, *Mahonia*.

*Key words: woody plant, diseases and damages causative agents*

#### Súhrn

V práci sú uvedené výsledky zvýšeného výskytu rozšírenia pôvodcov ochorenia a poškodenia drevín vo významných dendrologických objektoch a vo verejnej zeleni v urbanizovanom prostredí. Porovná sa ich rozšírenie v závislosti od stanovišťa, spôsobu pestovania a klimatických podmienok. Zastúpené sú dreviny rodov *Castanea*, *Platanus*, *Mahonia*.

*Kľúčové slová: dreviny, pôvodcovia ochorenia a poškodenia*

## ÚVOD

Výskyt škodlivých činiteľov na drevinách často predstavuje vážny problém, ktorý treba urýchlene riešiť. Súčasťou komplexného výskumu drevín na našom pracovisku je štúdium vplyvu biotických škodlivých činiteľov. Výskyt a stupeň poškodenia drevín v zmenených ekologických podmienkach je ovplyvnené pôvodcami ochorenia a poškodenia. Cieľom nášho výskumu bolo na základe hodnotenia zdravotného stavu drevín vo významných dendrologických objektoch zaznamenať rozšírenie parazitických húb. V prvej etape ústrednou témou nášho výskumu boli introdukované dreviny /4, 5, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 23/. Významné poznatky o rozšírení a škodlivosti húb sa zaznamenali v urbanizovanom prostredí /13, 12/. Na huby, ktoré najčastejšie poškodzujú dreviny upozorňujú /3, 19, 20, 21, 22, 21, 26/. Nové druhy, ktoré sa na drevinách na Slovensku vyskytli prvý raz upozorňujú /20, 25/.

V predložennom príspevku uvidíme výsledky hodnotenia výskytu škodlivých činiteľov, ktoré sme zaznamenali od roku 1965 doteraz.

## MATERIÁL A METÓDA

Základnou metódou výskumu bola priebežná inventarizácia parazitických mikroskopických húb a živočíšnych škodcov priamo v teréne. Na poškodených drevinách sme zaznamenali symptómy ochorenia, odobrali sme vzorky na ďalšie laboratórne hodnotenie. Vzorky z poškodených drevín sme spracovali bežnými fytopatologickými metódami. Zisťovali sme prítomnosť vegetatívnych a generatívnych orgánov húb. Na izoláciu a kultiváciu sme používali

médiá na báze agaru s rôznymi prísadami (sladina, zemiaky, kukurica, ryža, pšenica, jačmeň, hrach, fazuľa, glukóza, fruktóza, sacharóza, listy a kôra z hostiteľských drevín).

Pôvodcov ochorenia, parazitické mikroskopické huby sme diagnostikovali podľa autorov /1, 2/. Názvy húb uvádzame podľa /30/.

Prehľad pôvodcov poškodenia a symptómy ochorenia hostiteľských drevín sme spracovali do tabuliek. V tabuľke 1 je časť zo záznamov z mykologického herbára ÚEL SAV. Herbárové položky sú číslované od 1 do 5057, ďalšie sa spracovávajú.

Tab.1: Zoznam drevín a pôvodcov poškodenia na lokalitách Slovenska

Por. čís.	Hostiteľská drevina	Názov huby	Dátum zberu	Lokalita
2	<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	<i>Guignardia aesculi</i> (Peck) V.B. Stewart	17.10.1991	Zvolen
449	<i>Mahonia aquifolium</i> (Pursh) Nutt.	<i>Cumminsella sanguinea</i> (Peck) Arth.	20.06.1994	Vieska nad Žitavou
1466	<i>Rhus typhina</i> L.	<i>Botryosphaeria ribis</i> Gross. & Duggar	01.07.1984	Žilina

Vzhľadom na rozsah publikácie uvádzame len ukážku - výber z mykologického herbára SAV Zvolen. Hostiteľské dreviny a pôvodcovia ochorenia sú označené nami vytvoreným číselníkom.

Porovnali sme vplyv lokalít, stanovištných podmienok na výskyt húb a stupeň poškodenia hostiteľských drevín. Modelovými drevinami pre túto publikáciu sú *Mahonia aquifolium* (Pursh) na 48 lokalitách, poškodené hubou *Cumminsella sanguinea* (Peck) Arth., *Platanus occidentalis* L. na 152 lokalitách poškodené hubami *Gloeosporium platani* (Mont.) Oud., (*Discula platani* (Pesk.) Sacc. a *Mycosphaerella circumdans* (Pass.) Tomilin. Podrobne sme hodnotili tretiu modelovú drevinu, *Castanea sativa*, poškodenú karanténnou hubou *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr, ktorú sme prvýkrát izolovali v roku 1976. (Z objektívnych príčin sa výskyt tejto karanténnej huby publikoval až v roku 1990 /6, 7, 8/.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom nášho výskumu je zazmenat' výskyt a rozšírenie parazitických húb vo významných dendrologických objektoch a vo verejnej zeleni. Od roku 1965 doteraz sme odobrali vzorky a diagnostikovali pôvodcov poškodenia zo 163 lokalít. Z poškodených častí hostiteľských drevín sme založili mykologický herbár, ktorý obsahuje 5057 položiek zo 153 rodov drevín (141 listnatých a 12 ihličnatých). Údaje sa elektronicky spracovali jednotným číselníkom pre 3561 hostiteľských drevín a 1804 pôvodcov poškodenia z 2920 stanovišť. Výsledky sú sprístupnené na webe [www.savzv.sk](http://www.savzv.sk) s odkazom na link „Škodlivé činitele na drevinách" <http://147.213.209.17/herbar/map.phtml>.

Zistili, sme že najčastejšie sú poškodené asimilačné orgány (na 310 taxónoch 280 druhov húb). Početnú skupinu tvoria pôvodcovia hubových chorôb (huby rodov *Phyllosticta*, *Ascochyta*, *Septoria*, *Marssonina*, *Cercospora*, *Lophodermium*, *Cylindrosporium*, *Gnomonia*, *Gloeosporium*, *Guignardia*, *Keithia*, *Venturia*, *Ochropsora*, *Spilocaea*, *Rhytisma*, *Coryneum*, *Puccinia*, *Phragmidium*, *Melampsora*, *Cumminsella*, *Microsphaera*, *Uncinula*, *Erysiphe*, *Sphaerotheca*, *Phyllactinia*, *Phacidium*, *Lophodermium*, *Cenangium*, *Trochila*).

Na konároch na 386 txónoch sme našli 226 druhov húb rodov *Cytospora*, *Phomopsis*, *Phoma*, *Coniothyrium*, *Discula*, *Cryphonectria*, *Camarosporium*, *Verticillium*, *Puccinia*, *Gymnosporangium*, *Cronartium*, *Botryosphaeria*, *Thyronectria*, *Diplodia*, *Phoma*. Na koreňoch sme diagnostikovali huby rodov *Armillaria*, *Heterobasidion*, *Phytophthora*.

Z hostiteľských drevín, ktorými sme sa v priebehu nášho výskumu zaoberali sme vybrali tri modelové dreviny: *Mahonia aquifolium* a *Platanus occidentalis* a *Castanea sativa*.

Hrdzu krvavú (*Cumminsella sanguinea*) sme na Slovenku prvý raz zaznamenali v roku 1965. Výsledky hodnotenia stupňa poškodenia listov v rokoch 1976 a 1979 /5/ uvádzame v tabuľke 2. K primárnej infekcii listov dochádza jarnými spórmi, sekundárnu infekciu zabezpečujú letné a zimné spóry. K rýchlemu rozšíreniu hrdze krvavej prispieva aj prenos rastlín s ložiskami aecídiospór, urediospór a teleutospór v okrasných škôlkach. Je to jedna zo všeobecne rozšírených húb v rôznych typoch funkčnej zeleni sídiel aj v súkromnej zeleni. Prvý výskyt tejto huby sme zaznamenali v Arboréte Mlyňany v roku 1965 /4/. V kolekcii drevín sú aj *M. aquifolium* 'Juglandifolia', *M. Japonica* (Thunb.) DC., var. *bealei*, *M. repens* (Lindl.) G. Don., *M. repens* 'Rotundifolia'. Hubu *C. sanguinea* sme doteraz zaznamenali len na *M. aquifolium*. V rokoch 1980 – 2015 sa táto huba na Slovensku vyskytuje všade tam, kde sa mahonia pestuje.

Tab 2 Stupeň poškodenia listov *Mahonia aquifolium* hubou *Cumminsella sanguinea* v rokoch 1976 a 1979 na 48 lokalitách Slovenska

Stupne poškodenia						
z	1	2	3	4	5	Spolu
10	14	16	8			48

Výsledky hodnotenia stupňa poškodenia *Platanus occidentalis* L. na 152 lokalitách, ktoré boli poškodené hubami *Gloeosporium platani* (Mont.) Oud., *Discula platani* (Peck.) Sacc. a *Mycosphaerella circumdans* (Pass.) Tomilin a jej konídiové štádium *Sphaerella circumdans* Pass. uvádzame v tabuľke 3. Vysokým stupňom poškodenia je *P. occidentalis* znehodnotený aj na 57 stromoch v Hlohovci /29/.

Na Slovensku sú zachované platanové aleje napríklad v Komárne, v parku úradu vlády SR v Rusovciach s vyše storočnými exemplármi. Sú zaradené medzi chránené prírodné útvary. Aby sa zachovali aj pre budúce generácie mala by sa im venovať maximálna pozornosť.

Medzinárodne karanténnu hubu *C. parasitica* sme prvý raz na Slovensku našli v roku 1976 na lokalite Prašice Duchonka /6,7, 8/. Doteraz sa našla na 47 lokalitách a v rámci nich na 167 stanovištiach /10,11/. Doteraz sa nevysvetlil fakt, prečo sa prvé infikované stromy našli na pomerne izolovanom mieste uprostred dubového porastu.

Tab. 3 Výsledky porovnania stupňa poškodenia listov *Platanus occidentalis* na Slovensku mikroskopických hubami

Názov huby	Stupne poškodenia					
	0	1	2	3	4	Spolu
<i>Gloeosporium platani</i>		41	66	45		152
<i>Discula platani</i>		67	58	24	3	152
<i>Sphaerella circumdans</i>	26	57	44	25		152

V rokoch 2007 až 2009 na 8 lokalitách sa porovnal Index zdravotného stavu gaštanu ( $I_{zs}$ ) jedlého s ekologickými faktormi, ktoré môžu mať vplyv na šírenie huby *C. parasitica*. Z klimatických faktorov to boli priemerná ročná teplota, zrážky, vlhkosť vzduchu, smer prevládajúcich vetrov, priemerná ročná rýchlosť vetra a vývoj znečisteného ovzdušia, ozón /24/. Z dosiahnutých výsledkov prezentujeme výsledky porovnania Indexu zdravotného stavu s vybranými klimatickými faktormi na lokalite Bratislava – Sliacska /24,31/. Výsledky uvádzame v tabuľkách 4 a 5.

Podobné výsledky sa dosiahli aj na ďalších hodnotených lokalitách gaštanu jedlého. Čo je príčinou výskytu huby *C. parasitica* na lokalite Bratislava – Jeséniová ulica až v roku 2002, napriek tomu, že na susednej lokalite (vzdušnou čiarou vzdalenej cca 250 m) sa prvý výskyt zaznamenal už v roku 1988 a na Sliacskej v roku 1989 /10, 11/. Z doterajších výsledkov výskumu výskytu a rozšírenia huby *C. parasitica* konštatujeme, že symptómy ochorenia sa prejavujú, ak je

dostatok infekčného materiálu, náchylná hostiteľská drevina a sú vhodné podmienky na vniknutie hýf mycélia pôvodcu ochorenia do pletív hostiteľskej dreviny. Huba *C. parasitica* je ranový parazit, k infekcii dochádza cez rany, ktoré sú spôsobené zniknú klimatickými faktormi (mráz, krúpy, vtáci pri vyberaní potravy, človekom pri obíjaní plodov, neošetrené rezné plochy po odpílených konároch a pod.). Primárnu infekciu spôsobujú pyknospóry *Endothiella parasitica* (Murrill.) Roan. /10, 11/. Výskum huby *C. parasitica* dhadobo riešime s kolegami z Maďarska /27, 28/. Je reálny prepoklad, že gaštany jedlé na lokalitách Bratislava, Modrý Kameň, Stredné Plachtince, Horné Plachtince sa nakazili spórmi z Maďarska. Hodnotenie vplyvu klimatických faktorov na výskyt a rozšírenie tejto huby nesledovali /27, 28/.

Tab. 4 Výsledky porovnania Indexu zdravotného stavu s vybranými klimatickými faktormi na lokalite Bratislava Sliachska ulica

	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
<b>I<sub>zs</sub></b>	0,59	1,00	1,43	1,67	1,90	2,14	2,61	2,55	2,19	2,44	2,38
<b>teplota vzduchu °C</b>	9,54	11,31	9,95	10,90	10,76	9,97	9,81	10,38	11,48	11,28	10,77
<b>relatívna vlhkosť vzduchu (%) /10/</b>	7,36	7,06	7,27	7,21	6,73	7,20	7,20	7,27	6,94	7,33	7,41
<b>7,41atmosférické zrážky mm/s</b>	6,55	6,38	6,03	7,59	4,29	6,81	6,87	7,56	7,30	7,07	8,15
<b>rýchlosť vetra (m/s)</b>	4,46	4,41	4,45	4,23	4,07	4,11	4,06	3,84	4,28	4,04	3,99
<b>ročná hodnota ozónu – µg.m<sup>-3</sup>/10</b>	4,18	5,14	5,40	5,56	7,13	6,34	6,89	6,67	5,91	5,95	6,06

Tab. 5 Výsledky porovnania Indexu zdravotného stavu s vybranými klimatickými faktormi na lokalite Bratislava – Jeséniová

rok	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
<b>I<sub>zs</sub></b>	0,00	0,00	0,00	0,25	0,25	0,25	0,22	0,85	1,48	2,11	2,75
<b>teplota vzduchu °C</b>	9,54	11,31	9,95	10,90	10,76	9,97	9,81	10,38	11,48	11,28	10,77
<b>relatívna vlhkosť vzduchu (%) /10/</b>	7,36	7,06	7,27	7,21	6,73	7,20	7,20	7,27	6,94	7,33	7,41
<b>atmosférické zrážky mm/s</b>	6,55	6,38	6,03	7,59	4,29	6,81	6,87	7,56	7,30	7,07	8,15
<b>rýchlosť vetra (m/s)</b>	4,46	4,41	4,45	4,23	4,07	4,11	4,06	3,84	4,28	4,04	3,99
<b>ročná hodnota ozónu – µg.m<sup>-3</sup>/10</b>	4,18	5,14	5,40	5,56	7,13	6,34	6,89	6,67	5,91	5,95	6,06

## LITERATURA

- /1/ Bánhegyi, J. Magyarország mikroszkópikus gombáinak határozókönyve. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1985: 1316 p.
- /2/ Branderburger, W.: Parasitische Pilze an gefässpflanzen in Európa. New York: Gustav Fischer Verlag Stuttgart : 1985: 1248 p.
- /3/ Juhásová, G.: Predčasné opadávanie listov lipy malolistej. Les: 28, 1972: 455–456
- /4/ Juhásová, G.: Parasitic fungi on verdure in urban area. Česká mykologie, 37, 1983: 112
- /5/ Juhásová, G.: Rozšírenie a výskyt hrdzí na mahónii ostrolistej (*Mahonia aquifolium*) a na dráči obyčajnom (*Berberis vulgaris*). Ochrana rastlin, 1983a: 77–78
- /6/ Juhásová, G.: Nová choroba na gaštane jedlom. Novosti ved a techniky, 19, 1990a: 11

- /7/ / Juhásová, G.: Výskyt a rozšírenie huby *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr v Československu. Novosti vedy a techniky, 4, 1990b: 23
- /8/ Juhásová, G.: Výskyt a rozšírenie rakoviny kôry gaštanu jedlého na Slovensku. Záhradníctvo, 6, 1990b: 252–253
- /9/ Juhásová, G.: Parazitická mikoflora v dendroparke “Arboretum Mlyňany”, Folia dendrologica, 19, 1992: 419–440
- /10/ Juhásová, G.: Hubové choroby gaštanu jedlého (*Castanea sativa* Mill.). VEDA Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied. 1999: 191
- 11/ Juhásová, G., Adamčíková, K., Kobza, M., Ondrušková, E.: Gaštan jedlý na Slovensku, Perspektívy jeho ochrany a pestovania. Ústav ekológie lesa SAV Zvolen, 2012:160
- /12/ Juhásová, G., Adamčíková, K., Kobza, M., Čerevková, A.: Cause of Withering of Staghorn sumach (*Rhus typhina* L.) in selected localities in Slovakia. Acta societatis botanocorum Poloniae, 74, 2005:29–33
- /13/ Juhásová, G., Adamčíková, K., Kobza, M., Hanzel, E.: Journal of of Agricultural Sciences, Debrecen, 38, 2009: 33–38
- /14/ Juhásová, G., Hrubík, P.: Príčiny usychania borievok (*Juniperus*) na Slovensku. Lesníctví, 21, 1975: 1019–1029
- /15/ Juhásová, G., Hrubík, P.: Choroby a škodcovia cudzokrajných drevín na Slovensku. Acta dendrobiologica, 1984: 164 s.
- /16/ Juhásová, G., Ivanová, E.: Importance of the Fungus *Cytospora rubescens* Fr. In Relation to Dieback of *Sorbus aucuparia* L. Plant protection Science, 37, 1999: 5–9
- /17/ Juhásová, G., Ivanová, E.: Hubové choroby druhov rodu *Platanus* L. 26, 1999a:183–194
- /18/ Juhásová, G., Ivanová, E.: Parasitic mycoflora of the genus *Acer*. Hort. Sci (Prague), 28, 2001a: 71 – 79
- /19/ Juhásová, G., Ivanová, E., Spišák, J.: Occurrence and spread oif the parasitic mucroscopicis fungi walnut (*Juglans regia* L.) on various localities of Slovakia. Trakya Univ. J. sci. 6, 2005: 20–27
- /20/ Juhásová, G., Ivanová, E., Adamčíková, K., Kobza, M., Čerevková, A.: Scab Disease of Firethorn at Selected Localities in Slovakia. Plant. Protect. Sci, 40, 2004: 42–48
- /21/ Juhásová, G., Kulcsárová, (Adamčíková), K.: A boglárfa (Platanus) betegsései Szlovákiában. (Choroby platanov na Slovensku). Növényvédelmi tudományos napok 1998: 103
- /22/ Juhásová, G., Praslička, J.: Occurrence and Harmful Effects od *Gymnosporangium sabiniae* (Dicks.) Winter in Slovak Republik, Plant Protection Science, 38, 2002: 89–93
- 23 Juhásová, G., Tkáčová, S., Kobza, M.: The results of phytopathological and mykological research of the trees on Sun lakes in Senec. Mitt- Biol. Bundesanst Land-Forstwirtschaft 394, 2003: 35 – 41.
- /24/ Knetigová, Z.: Vplyv ekologických podmienok na poškodenie gaštanu jedlého hubou *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. Dizertačná práca. 2010: 99s.
- /25/ Pastirčáková, K., Pastirčák, M., Juhásová, G. : The Catalpa powdery mildew *Erysiphe elevata* in Slovakia, Cryptogamie Mycologie, 27, 2006: 31–34
- /26/ Pastirčáková, K., Bernadovičová, S., Ivanová, H.: Antraknóza – časté ochorenie platanov. Rostlinolékař, 2008 :18–19
- /27/ Radócz, L.: A Nagymarosi szelídgesztenyések története, ápolása, védelme. A magyarországi-Szlovákia Határon Egütműködése keretében megjelknt kiadvány. 2010:151
- /28/ Radócz, L.: A héjasok növényvédelme. Szaktudás Kiadó Ház, Budapest, 2002:256
- /29/ Režná, N.: Sadovnícke a fytopatologické hodnotenie drevín a návrh ochranných opatrení, Dizertačná práca. SPU. 2009: 72 s.
- /30/ <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>
- /31/ Dáta Slovenského hydrometeorologického ústavu v Bratislave

## Pod'akovanie

Uvedená práce vznikla za finančnej podpory projektu VEGA 2/0069/14 a 2/0071/14.

## HODNOCENÍ FENOTYPOVÉ A GENETICKÉ VARIABILITY V SOUBORU ČÍNSKÝCH ODRŮD OZIMÉ PŠENICE

### *EVALUATION OF PHENOTYPIC AND GENETIC VARIABILITY IN COLECTION OF CHINESE WINTER WHEAT CULTIVARS*

Jiří Hermuth<sup>1</sup>, Ladislav Dotlačil<sup>1</sup>, Y. Xi<sup>2</sup>, Zdeněk Nesvadba, Leona Leišová-Svobodová<sup>1</sup>, Václav Dvořáček<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, Praha 6–Ruzyně, 161 06, hermuth@vurv.cz

<sup>2</sup> Northwest A&F University Yangling, Shaanxi, China

#### Summary

Chinese cultivars of winter wheat (42 genotypes including 2 Czech standard cultivars) were cultivated in the field conditions of Crop Research Institute Prague-Ruzyně. The evaluation included morphological and phenological parameters, further spike productivity, classification of powdery mildew resistance and lodging as well as grain analyses of crude protein, wet gluten and starch content detected using NIR spectrometry. The characterization of genetic diversity was carried out using selected SSR-markers. The Chinese genotypes generally showed a short time of heading and flowering. Nevertheless, some genotypes (e.g. Zhengmai 9405, Xinong 1043, Xiaoyan 986, and Dengfenfeng 168) confirmed a longer period between time of flowering and grain filling which is significant for grain production. Most of Chinese genotypes showed a short straw as well. Significant differences were found in the spike productivity among tested genotypes. We even identified some Chinese genotypes comparable with productive Czech wheat cultivars. Some other Chinese genotypes showed valuable grain parameters involving high contents of crude protein, wet gluten (Xinong 2000, Changwu 134) and starch (Dong Ying 3 a Dong Ying 4). The obtained Chinese genotypes also confirmed wide genetic variability and their specific properties can bring a positive benefit for wheat breeding programs in the Czech Republic.

*Key Words: Triticum aestivum L., Chinese cultivars, genetic diversity, SSR markers, cluster analysis*

#### Souhrn

Byly vedeny a hodnoceny pokusy s čínskými odrůdami ozimé pšenice, (celkem 42 kultivarů spolu se dvěma českými odrůdami jako kontrolou). V polním experimentu byly sledovány fenologické údaje (metání, kvetení, zralost), výška porostu, odolnost k poléhání a padlí travnímu, prvky produktivity klasu. Technologické rozborů zrna zahrnovaly stanovení obsahu hrubých bílkovin (NL) a obsah mokrého lepku (ML) a škrobu pomocí NIR spektrometrie. Pro posouzení genetické diverzity čínských odrůd byly využity SSR markéry. Čínské kultivary se vyznačovaly raností v době kvetení a metání, některé z nich i delší dobou kvetení-zralosti, významnou pro tvorbu zrna - Zhengmai 9405, Xinong 1043, Xiaoyan 986 a Dengfenfeng 168. Většina kultivarů měla rovněž velmi krátké stéblo. V produktivitě klasu byly mezi zkoušenými kultivary velké rozdíly; bylo možné nalézt materiály, které se hmotností zrna na klas vyrovnaly výkonným domácím odrůdám. Mezi čínskými kultivary byly rovněž materiály s některými cennými charakteristikami kvality zrna pšenice, především s vysokým obsahem proteinu, mokrého lepku Xinong 2000, Changwu 134 a škrobu Dong Ying 3 a Dong Ying 4. Získané výsledky potvrdily významnou genetickou odlišnost čínských kultivarů oproti českým materiálům a některé specifické znaky, které mohou být přínosem při šlechtitelském využití v ČR.

*Klíčová slova: Triticum aestivum L., čínské odrůdy, genetická diverzita, SSR markéry, shluková analýza*



## ÚVOD

Pšenice setá je celosvětově velmi významnou plodinou, u které se projevuje potřeba rozšířit její genetický základ u nově šlechtěných odrůd o geny, které umožní další šlechtitelský pokrok v produktivitě, kvalitě a adaptaci k podmínkám prostředí. Právě pro rozšíření genetické diverzity jsou doporučovány a využívány genetické zdroje z geograficky vzdálených oblastí, u nichž lze předpokládat značnou genetickou rozdílnost, kterou je možné experimentálně ověřit, charakterizovat a následně i šlechtitelsky využít /1, 2/.

Čínská lidová republika je největším producentem a spotřebitelem pšenice na světě. Tato plodina je po rýži a kukuřici třetí hlavní plodinou pěstovanou v této zemi. Po zemědělské reformě, která v Číně proběhla počátkem 80. let 20. století, došlo k nárůstu produkce pšenice a nejvyššího vrcholu bylo dosaženo v roce 1997. Toho roku byla zaznamenána rekordní sklizeň o objemu 123 milionu tun zrna. V současné době je cca 80 % pšenice využíváno k potravinářským účelům, 10 % na krmení, 5 % jako osivo a zbytek k průmyslovému využití. Šlechtění pšenice prodělalo výrazný pokrok po roce 1949. Došlo ke zlepšení výnosového potenciálu, redukci výšky rostlin, zkrácení vegetační doby a zvýšila se adaptabilita odrůd. V současné době je velmi důležitou prioritou šlechtění na rezistenci k chorobám, především ke rzi plevové, rzi pšeničné, padlí travnímu a fusariovému vadnutí klasů. Významným faktorem při pěstování pšenice jsou rovněž abiotické stresy, které zahrnují sucho, vysoké teploty, špatnou půdní úrodnost, alkalické a podmáčené půdy, porůstání zrna před sklizní /6/. V roce 2014 byla pšenice v Číně pěstována na ploše 24,1 milionu hektarů, s průměrným výnosem 5,23 t/ha a celkovou produkcí 126,2 milionu tun zrna /3/. Cílem této práce je vyhledávání a charakterizace nové genetické diverzity v genofondech pšenice, které byly získány z ČLR.

## MATERIÁL A METODY

Ve vegetačním roce 2013/2014 byly vedeny a hodnoceny pokusy s čínskými odrůdami ozimé pšenice, vysetými ve VÚRV Praha na parcelkách o velikosti 2 m<sup>2</sup> s výsevkem 400 zrn na m<sup>2</sup>. Celkem bylo vyseto 42 kultivarů spolu se dvěma českými odrůdami (Bohemia, Bodyček) jako kontrolou. Genetické zdroje byly získány v rámci spolupráce s čínským partnerem z Northwest University of Agriculture and Forestry (NWUAF), 3 Taicheng Road, Yangling, Shaanxi, 712100 China.

Pokusné pozemky VÚRV Praha se nacházejí v řepařské výrobní oblasti, klimatický region – T2 (teplá, mírně suchá oblast), půdní typ - degradovaná černozem, půdní druh – jílovitohlinitá půda, nadmořská výška 340 m, průměrná roční teplota 7,9 °C, průměrný roční úhrn srážek 525,9 mm. Průběh počasí od podzimu, tj. od zasetí pokusů do začátku zimy 2013 lze charakterizovat z hlediska dlouhodobého normálu jako teplotně nadprůměrný a srážkově velmi podprůměrný. V průběhu jarních měsíců pokračoval nastolený teplotní i srážkový trend. V měsíci květnu byly porosty obilnin velmi významně ovlivněny vysokým úhrnem srážek (110 mm), které pozitivně ovlivnily konečný počet produktivních odnoží a tím i výnos. Červen byl teplotně nadprůměrný s deficitem vodních srážek. V období žní (červenec) byl naopak nadprůměrný úhrn srážek (107,7 mm), který ve svém důsledku ovlivnil negativně kvalitativní parametry bílkovinného komplexu zrna. Celkový úhrn srážek za sledované období tj. 9/2013 – 8/2014 byl z dlouhodobého normálu podprůměrný.

Polní pokusy probíhaly dle standardní interní metodiky Genové banky. Předplodinou byl hrách setý. Pokusný pozemek pro pšenici byl před podzimním výsevem vyhnojen na základě půdních rozborů zásobní dávkou fosforu - superfosfát (18 % P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) v dávce 200 kg/ha a drasla – draselná sůl (60 % K<sub>2</sub>O) v dávce 150 kg/ha. V průběhu měsíce března 2014 byly porosty ozimů přihnojeny LAV v dávce 100 kg/ha, tj. 27 kg N/ha. Ve fázi dvou pravých lístků byla provedena herbicidní aplikace přípravků Maraton (4 l/ha) + Glean (8 g/ha) k potlačení plevelného spektra. K ošetření proti potencionálním přenašečům byl aplikován insekticid Perfekthion v dávce 1 l/ha.

Během vegetačního období (2013/2014) byly v polním experimentu sledovány fenologické údaje (metání, kvetení, zralost – počítáno vždy od 1.1.), výška porostu, bonitačně odolnost k poléhání a padlí travnímu (1: vysoce náchylné, 9: rezistentní). Po sklizni byly hodnoceny prvky produktivity klasu. Technologické rozborů zrna zahrnovaly stanovení obsahu hrubých bílkovin (NL) a obsah mokrého lepku (ML) a škrobu pomocí NIR spektrometrie.

Pro posouzení genetické diverzity čínských odrůd bylo použito analýzy 42 SSR lokusů. DNA byla izolována pomocí detergentu CTAB podle protokolu Saghai-Maroo M.A. et al. (1984). PCR reakce s fluorescenčně značenými (6-fam, vic, ned, pet) primery pro jednotlivé mikrosatelitní lokusy byly prováděny dle protokolu v reakčním objemu 15  $\mu$ l obsahujícím 0,5  $\mu$ M příslušné dvojice primerů, 0,2 mM dNTP, 1x pufr,  $MgCl_2$ , 1U Tth polymerázy Biotools a 100 ng vzorku DNA. Reakce byly prováděny v cykleru fy Biometra. Produkty PCR byly prováděny metodou kapilární elektroforézy v přístroji ABI PRISM 3130 (Life Technologies). Ke každému multiplexu byl přidán interní velikostní standard LIZ500. Součástí každé analýzy byly rovněž standardy alel. Výsledkem analýzy elektroforetogramů programem GeneMapper bylo zařazení PCR produktů do kategorií podle velikosti v bp. Ze získaného souboru alel pro každý genotyp byly vypočteny genetické vzdálenosti mezi genotypy pomocí simple matching koeficientů a sestaven dendrogram pomocí programu Darwin /4/. K validaci dendrogramu byla použita metoda bootstrappingu (24000 opakovaných vzorkování).

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Dosažené výsledky jsou shrnuty v tabulce 1. Vysoká fenotypová variabilita v testovaném souboru byla zjištěna zejména v počtu zrn v klásku a klasu ( $V_k = 25 - 32 \%$ ). Značnou variabilitu vykázaly dále znaky výška porostu, délka klasu a HI ( $V_k = 14 - 24 \%$ ). Oproti českým kontrolním odrůdám byly čínské materiály nižší (průměr 69 cm), většina čínských materiálů byla ranější ve všech fenologických fázích a některé z nich měly až o 4 dny delší období tvorby zrna. Zpravidla nízká byla odolnost k padlí travnímu.



V průměru měly čínské odrůdy nižší hmotnost zrna na klas (1,49 g) a ve většině případů rovněž nižší sklizňový index (HI = 0,39). Čínské materiály vynikaly naopak výrazně vyšším obsahem hrubého proteinu a mokrého lepku (15,5 %, resp. 33,9 %). V souboru bylo možné nalézt odrůdy s hospodářsky cennými znaky, potenciálně využitelnými ve výzkumu a šlechtění. Z pohledu ranosti a doby tvorby zrna jsou zajímavé čínské odrůdy Zhengmai 9405, Xinong 1043, Xiaoyan 986 a Dengfenfeng 168 (doba do zralosti 181 dnů, doba tvorby zrna 41 až 42 dnů), které v těchto znacích překonávají kontrolní odrůdy. Dobrou produktivitu klasu vykazují odrůdy Dong Ying 3, Dong Ying 4 a Dong Ying 8. Jedná se o geneticky podobné krátkostébelné odrůdy (60-65 cm) s delším klasem, hmotností zrna na klas přes 2 g, vysokým počtem zrn v klásku (až 2,13) a klasu (až 45 zrn na klas) a spíše nižší HTS. Bylo možné nalézt odrůdy s extrémně vysokou hmotností 1000 semen (Xinong 1043 - 69,8 g, Dengfeng 168 - 64,7g). Řada čínských materiálů je zajímavá znaky kvality zrna, zejména vysokým obsahem hrubého proteinu. Vysoký obsah hrubého proteinu a mokrého lepku (ovšem při nízké produktivitě klasu) měla odrůda Xinong 2000 (16,8 %

a 41,7 %) a dále odrůda Changwu 134 (19,3 % proteinu a 49,6 % mokrého lepku). Za potenciální donor kvality zrna lze považovat odrůdu Xiaoyan 216 (16,2 % hrubého proteinu, 38,5 % mokrého lepku, s průměrnou produktivitou klasu). Vysokým obsahem škrobu (přes 64 %) při dobré produktivitě klasu (přes 2 g) se vyznačovaly odrůdy Dong Ying 3 a Dong Ying 4.

Tab. 1: Statistické vyhodnocení sledovaných znaků u ozimých odrůd pšenice seté čínské provenience (lokalita Praha-Ruzyně, ročník 2014).

Hodnocené znaky	Kontrolní odrůdy (CZE) (naměřené hodnoty znaků)		Soubor čínských odrůd (n = 40)				
	Bohemia	Bodyček	Průměr	Max.	Min.	Sm. odch.	Var. koef. (%)
Metání (dny)*	142	137	131	136	126	3,5	2,7
Kvetení (dny)*	149	143	141	144	137	2,2	1,5
Zralost (dny)*	187	181	179	183	177	2,1	1,2
Kvetení-Zralost (dny)*	38	38	38	42	36	1,4	3,8
Přezimování (1-9 b) <sup>1)</sup>	9	8	8,3	9	6	0,8	9,2
Poléhání porostu (1-9 b) <sup>1)</sup>	9	9	8,9	9	8	0,2	2,7
Padlí travní (1-9 b) <sup>1)</sup>	7	7	5,1	7	3	1,1	21,0
Výška porostu (cm)	115	85	68,5	90	50	12,7	18,2
Délka klasu (cm)	11,5	7,6	7,9	9,9	6,2	1,1	14,2
Počet klásků na klas	21,9	20,0	18,8	21,9	14,5	1,7	8,9
Počet zrn v klasu	41,5	32,1	29,2	45,4	13,8	9,2	31,7
Počet zrn na klásek	1,89	1,61	1,55	2,13	0,88	0,4	25,4
Hmotnost zrn z klasu (g)	2,23	1,72	1,49	2,08	0,69	0,4	28,4
HTS (g)	53,6	53,4	51,2	69,8	42,5	5,9	11,4
Sklizňový index	0,41	0,55	0,39	0,49	0,19	0,1	23,8
Obsah NL (%)	13,6	13,1	15,5	19,3	11,9	1,5	9,9
Obsah ML (%)	26,5	28,1	33,9	49,6	23,0	5,2	15,7
Obsah škrobu (%)	62,4	63,6	61,7	64,3	57,6	1,8	2,9

\* dny (počítáno od 1.1.)

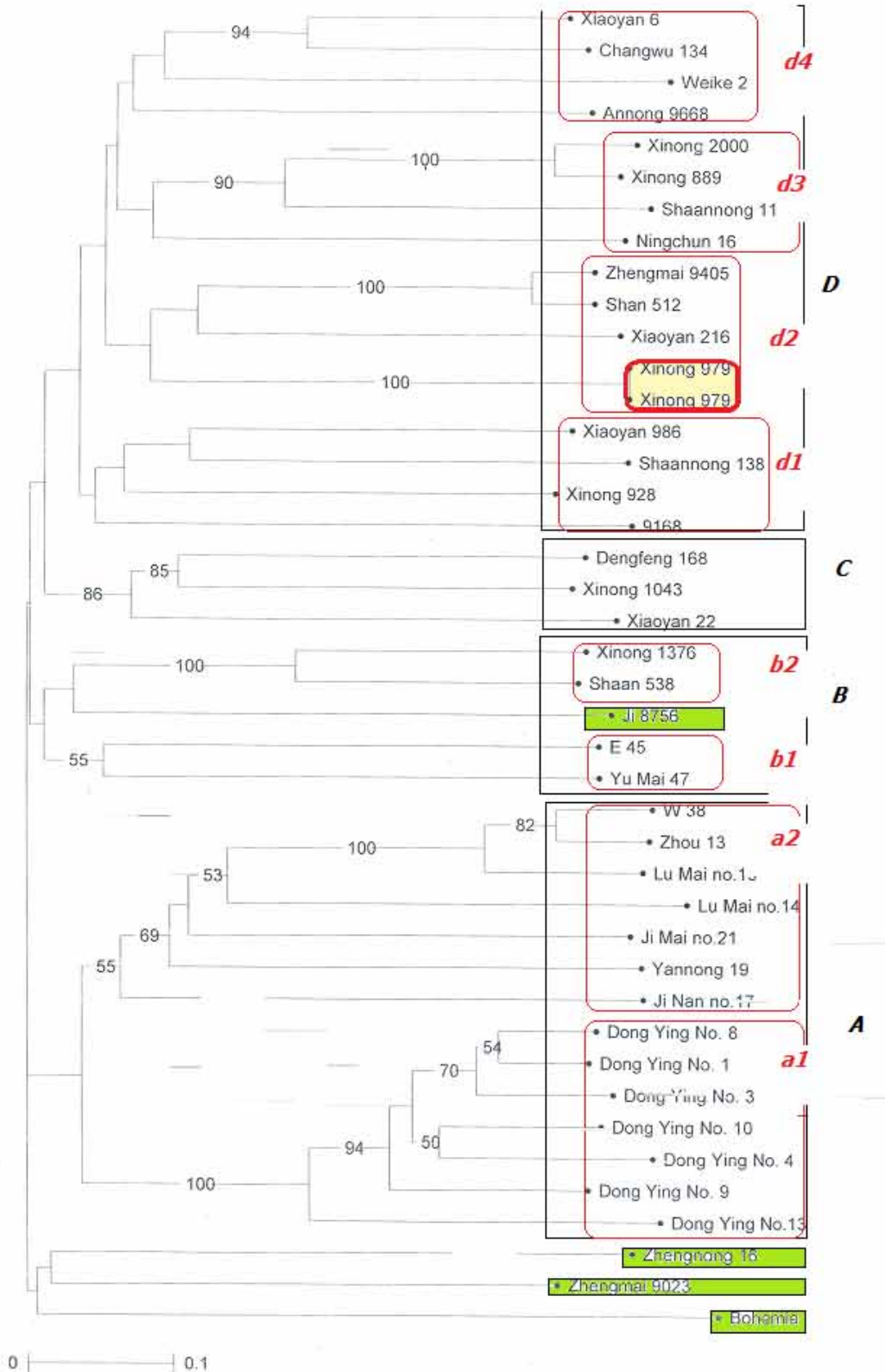
1) údaje byly zjišťovány podle klasifikátoru genus *Triticum* L. (Bareš et al. 1985)

Jak ukazuje dendrogram - obrázek 1 a tabulka 2, s využitím binárních dat z analýzy souboru pomocí SSR markerů bylo shlukovou analýzou možné prokázat v rámci zkoušeného souboru ozimé pšenice značnou genetickou diverzitu. Jako geneticky odlišné v rámci celého souboru jsme identifikovali čínské odrůdy Zhengmai 9023 a Zhengnong 16. V analýze vystupují proto obě tyto odrůdy jako samostatný "shluk", stejně jako kontrolní odrůdy. Odrůda Zhengmai 9023 byla nejranější ve fázi metání a kvetení a patřila do skupiny velmi raných odrůd i ve zralosti. V těchto charakteristikách se jí velmi podobala i druhá geneticky odlišná odrůda Zhengnong 16, charakteristická dlouhým obdobím tvorby zrna (40 dnů) a dobrou odolností k padlí travnímu, na úrovni českých kontrol a nejlepší v rámci čínských materiálů. Za geneticky originální lze považovat i kultivar Ji 8756 (zařazen ve shluku B), který je zajímavý vysokým obsahem proteinu (17,1 %) a mokrého lepku (41,9 %).

Shluk A je tvořen 14 odrůdami; je charakteristický poměrně dobrou průměrnou produktivitou klasu (1,66 g zrna/klas), při vyšším počtu klásků a zrn v klasu a spíše nižší HTS. Lze jej rozdělit do dvou podshluků po sedmi odrůdách, lišících se výškou porostu, raností v metání (a s

ní související dobou kvetení-zralosti), produktivitou klasu, vysokým HI a obsahem škrobu (průměry 1,91 g, HI 0,46 a 63,4 % obsahu škrobu u podshluku a1. Odrůdy v podshluku a2 se vyznačují velmi krátkou dobou od kvetení do zralosti (34 dnů).

**Obr. 1 Genetická diverzita vybraných perspektivních materiálů v souboru ozimých pšenic čínského původu (2014)**



Tab. 2: Fenotypové charakteristiky geneticky odlišných odrůd a shluků odrůd ozimých pšenic čínské provenience a dvou kontrolních českých odrůd (shlukování na základě binárních dat získaných pomocí SSR markerů)

Shluky		Přezimování **	Poléhání **	Výška porostu (cm)	Dny od 1. 1. do metání	Dny od 1. 1. do kvetení	Dny od 1. 1. do zralosti	Kvetení-zralost (dny)	Padlí travní **	Délka klasu (cm)	Počet klásků na klas	Počet zrn na klásek	Počet zrn na klas	HTS (g)	Hmotnost zrna na klas (g)	Sklizňový index (HI)	Hrubý protein (%)	Škrob (%)	Mokrý lepek (%)
Bohemia	Kontroly	9,0	9,0	115	142	149	187	38	7,0	11,5	21,9	1,89	41,5	53,6	2,23	0,41	13,6	62,4	26,5
Bodyček		8,0	9,0	85	137	143	181	38	7,0	7,6	20,0	1,61	32,1	53,4	1,72	0,55	13,1	63,6	28,1
Zhengmai 9023 *		8,0	9,0	65	128	139	178	39	5,0	6,2	18,3	1,30	23,8	50,4	1,20	0,38	15,4	61,5	34,2
Zhengnong 16 *		8,0	9,0	75	131	141	181	40	7,0	6,7	14,4	1,64	23,7	55,6	1,32	0,44	15,4	62,4	34,2
Fenotypové charakteristiky hlavních shluků (A,B,C,D).	A (n=14)	8,6	9,0	66	132	142	179	37	4,9	8,5	19,8	1,75	34,8	48,1	1,66	0,41	14,0	62,5	30,4
	B (n=5)	8,2	9,0	66	129	141	179	39	4,0	7,4	17,6	1,49	26,1	50,8	1,44	0,38	16,0	61,2	36,8
	C (n=3)	8,3	8,7	83	129	140	180	40	5,7	8,2	19,6	1,25	24,5	64,5	1,58	0,34	15,1	62,9	34,1
	D (n=16)	7,9	8,9	64	130	140	179	39	5,1	7,2	17,8	1,41	25,4	50,7	1,28	0,36	15,9	60,8	36,9
Fenotypové charakteristiky podskupin shluků A (a1, a2) D (d1-d4)	a1 (n=7)	8,6	9,0	60	130	141	178	37	5,3	9,4	21,4	1,93	41,1	46,4	1,91	0,46	13,3	63,4	28,9
	a2 (n=7)	8,6	9,0	73	134	142	180	34	4,6	7,7	18,5	1,60	29,4	49,6	1,46	0,37	14,7	61,6	31,9
	d1 (n=4)	7,8	9,0	60	130	140	180	39	5,3	7,1	19,0	1,45	27,8	52,1	1,44	0,39	15,6	60,5	34,9
	d2 (n=4)	8,3	8,8	66	130	141	180	40	5,3	8,1	17,7	1,70	30,0	51,6	1,55	0,42	14,8	63,0	32,6
	d3 (n=4)	7,5	8,8	65	129	142	179	39	5,3	7,3	17,5	1,22	22,1	54,2	1,18	0,33	15,7	60,4	36,8
	d4 (n=4)	8,0	9,0	65	130	141	178	37	4,5	6,6	17,7	1,33	23,4	44,1	1,04	0,33	17,2	59,8	42,3
<b>Průměrné hodnoty znaků</b>		<b>8,2</b>	<b>8,9</b>	<b>68,5</b>	<b>131</b>	<b>141</b>	<b>179</b>	<b>38,3</b>	<b>5,1</b>	<b>7,9</b>	<b>18,8</b>	<b>1,55</b>	<b>29,3</b>	<b>51,2</b>	<b>1,49</b>	<b>0,39</b>	<b>15,0</b>	<b>61,7</b>	<b>33,9</b>

\* Geneticky odlišné čínské odrůdy (každá tvoří samostatný shluk).

\*\* Bodové hodnocení podle klasifikátoru pšenice.

Mezi 5 položkami zahrnutými do shluku B lze jednu považovat za geneticky odlišnou (odrůda Ji 8756), ostatní 4 odrůdy jsou charakteristické nízkou odolností k padlí, vysokým průměrným obsahem proteinu (16,0 %) a mokrého lepku (36,8 %). Pomocí analýzy SSR lokusů lze identifikovat dvě podskupiny po dvou odrůdách, které však nelze jednoznačně fenotypově charakterizovat. Shluk C je tvořen pouze 3 odrůdami, které jsou charakteristické spíše vyšším porostem, delší dobou kvetení-zralosti a velmi vysokou HTS (průměr 64,5 g). V důsledku nízkého počtu zrn na klásek je ale produktivita klasu spíše průměrná. Pro studované čínské odrůdy je charakteristická větší výška porostu (83 cm) a s tím související nízký sklizňový index (0,34). Největší shluk D zahrnuje 16 odrůd, které lze rozdělit do čtyř poměrně odlišných podskupin po čtyřech odrůdách (podskupina d2 zahrnuje 5 položek, dvě jsou však duplicitní). Společnou charakteristikou je krátké stéblo (průměr 64 cm), vyšší průměrný obsah proteinu (15,9 %) a mokrého lepku (36,9 %) při nízké produktivitě klasu (průměr 1,28 g). U podskupiny d1 lze nalézt velmi nízké typy (průměr 60 cm) s relativně vysokým počtem klásků na klas (19) a vysokým obsahem proteinu (15,6 %). Zatímco odrůdy v podskupině d2 vykazují spíše průměrné hodnoty většiny znaků, podskupiny d3 a d4 charakterizuje nízká produktivita klasu (1,18 a 1,04 g) a nízký HI (0,33). Vysoký je obsah hrubého proteinu a mokrého lepku (u podskupiny d4 - 17,2 % hrubého proteinu, 42,3 % mokrého lepku, při nejnižším obsahu škrobu 59,8 %).

Řada zkoušených čínských kultivarů se vyznačovala raností v době kvetení a metání, některé z nich i delší dobou kvetení-zralosti, významnou pro tvorbu zrna. Většina kultivarů měla rovněž velmi krátké stéblo. V produktivitě klasu byly mezi zkoušenými kultivary velké rozdíly. Bylo možné nalézt materiály, které se hmotností zrna na klas vyrovnaly výkonným domácím odrudám. Produktivita těchto kultivarů měla rovněž rozdílnou strukturu – byly nalezeny typy s vysokým počtem zrn v klásku a v klasu, ale i velmi vysokou HTS. Mezi čínskými kultivary byly rovněž materiály s některými cennými charakteristikami kvality zrna pšenice, především s vysokým obsahem proteinu, mokrého lepku a škrobu. Slabinou většiny čínských kultivarů je nižší odolnost k padlí travnímu a celkově nižší zimovzdornost. Přesto byly ve studovaném souboru nalezeny genotypy s velmi vysokou zimovzdorností.

Dosažené výsledky ukazují, že genetické rozdíly v souboru lze charakterizovat na úrovni fenotypu a využít je při hodnocení a studiu genetických zdrojů a jejich doporučování uživatelům. Získané výsledky potvrdily významnou genetickou odlišnost čínských kultivarů oproti českým materiálům. Mezi čínskými kultivary byly rovněž materiály s některými cennými charakteristikami kvality zrna pšenice, především s vysokým obsahem proteinu, mokrého lepku Xinong 2000, Changwu 134 a škrobu Dong Ying 3 a Dong Ying 4. Čínské kultivary se vyznačovaly také raností v době kvetení a metání, některé z nich i delší dobou kvetení-zralosti, významnou pro tvorbu zrna - Zhengmai 9405, Xinong 1043, Xiaoyan 986 a Dengfenfeng 168. Nalezené specifické znaky mohou být přínosem ve šlechtitelských programech v ČR.

#### LITERATURA

- /1/ Dotlačil L., Faberova I., Stehno Z. (2008): Plant genetic resources in the Czech Republic, Czech J. genet. Plant Breed., 44(4): 129 – 139.
- /2/ Hermuth J., Dotlačil L., Prohasková A., Stehno Z., Dvořáček V. (2013): Změny odrudových charakteristik pšenice dosažené šlechtěním a podmíněné pěstitelskými technologiemi. Recenzovaný sborník příspěvků „Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2013“ s. 251 - 255
- /3/ <http://www.fao.org/giews/countrybrief/country.jsp?code=CHN>
- /4/ Perrier and Jacquemoud-Collet, (2006): DARwin software (<http://darwin.cirad.fr/darwin>).
- /5/ Saghai Maroof M.A. et al. (1984): Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 8014-8018.
- /6/ Zhonghu He, Bonjean, A.P.A. (2010): Cereals in China. Limagrain, CIMMYT, s. 118, ISBN: 978-970-648-177-1

#### Poděkování

Příspěvek vznikl za finanční podpory MŠMT v rámci řešení projektu LH12158 KONTAKT II.

# Přednášky



## POZDNÍ MRÁZ, POŠKOZENÍ A FLUORESCENCE CHLOROFYLU SAZENIC SMRKU ZTEPILÉHO

### *LATE FROST, DAMAGE AND CHLOROPHYLL FLUORESCENCE OF THE NORWAY SPRUCE SEEDLINGS*

Ondřej Špulák, Jarmila Martincová

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v.v.i., Výzkumná stanice Opočno, Na Olivě 550, 517  
73 Opočno, spulak@vulhmop.cz

#### *Summary*

Late frost is one of the negative factors influencing performance of tree plants. Three years old sprouting Norway spruce seedlings were exposed to simulated late frost and subsequent full or partial exposure of light. It was found, that increasing phase of sprouting corresponded to increase of stress by frost. Physiology of the older needles was disturbed although their damage was not visible. Seedlings exposed to lower light intensity following frost event had less damage of new sprouts as well as lower fluctuation of the fluorescence parameters of the older shoots. When late frost is expected, shading of the tree plants in forest nurseries can not only mild frost peaks but also lower stress by intensive radiation following frost event. This can be profitable not only by shade-loving species.

*Key words: flushing, frost, light, damage, chlorophyll fluorescence, spruce*

#### *Souhrn*

Pozdní mráz je jedním z negativních faktorů prostředí ovlivňujících vývoj sazenic lesních dřevin. Tříleté sazenice smrku ztepilého byly po narašení vystaveny simulovanému pozdnímu mrazu a následně plnému nebo částečnému osvětlení. Bylo zjištěno, že se stupněm narašení roste stres mrazem sazenic, kdy dochází i k narušení fyziologického stavu starších jehlic, přestože jejich poškození není viditelné. Menší intenzita záření po mrazové epizodě způsobila menší poškození nových výhonů i menší výkyv hodnot parametrů fluorescence vyzrálých výhonů. Zakrývání sazenic při předpokládaném výskytu pozdních mrazů v lesních školkách tak může napomoci jak při tlumení mrazových špiček, tak i snížením stresu působeného intenzivní radiací po mrazové epizodě, a to nejen u stínomilných druhů dřevin.

*Klíčová slova: rašení, mráz, světlo, poškození, fluorescence chlorofylu, smrk*

## ÚVOD

Jedním z negativních faktorů prostředí, zvláště v horských podmínkách či v podmínkách mrazových poloh, je pozdní mráz v době, kdy už sazenice lesních dřevin ukončily dormanci a začínají rašit. V součinnosti s dalšími stresujícími jevy (např. sluneční záření, poškození zvěří či myšovitými hlodavci, překonávání šoku z přesazení atd.) se může poškození pozdním mrazem stát letálním faktorem. Vlivem náhlých mrazů mimo zimní období může dojít až k okamžité destrukci a odumření buněčné protoplazmy /1, 5/. Přestože nejvíce náchylná jsou mladá pletiva narašených výhonů, poškození pozdními mrazy se projevuje i na starších výhonech a v důsledku tak ovlivňuje růst /3/.

Prvním projevem stresu listů je poškození asimilačního aparátu, zejména fotosystému II (PSII) /4/. Měření fluorescence chlorofylu poskytuje informaci o rozsahu, v jakém je PSII schopen absorbovat a využívat fotosynteticky účinnou radiaci. Parametry fluorescence chlorofylu u jehličí mohou být používány i jako indikátory stresu mrazem /2, 6, 7/.



Cílem popisovaného pokusu bylo posouzení vlivu pozdního mrazu a následného vlivu různých světelných podmínek na poškození rašících výhonů a na parametry fluorescence chlorofylu jednoletých výhonů u sazenic smrku ztepilého.

## MATERIÁL A METODA

Tříleté obalované sazenice smrku ztepilého (B/SM/112-/3/3/KV), pěstované ve foliovníku nejprve jako prostokořenné semenáčky, druhý rok přesazené do obalu, třetí rok byly přemístěny na venkovní záhon – pěstební vzorec f1+fk1+k1) byly na jaře 2012 krátkodobě (ca 3 týdny) skladovány v chladícím boxu (teplota +3 až +5 °C). Dne 3. 5. 2012 bylo 96 sazenic (8 sadbovačů) umístěno do růstové komory (SGC 120, Weiss Technik, UK). Pro intenzivní probouzení sazenic z dormance byl nastaven 16hodinový den o teplotě 22 °C (intenzita záření ca 15 000 lux) a 8 hodinová noc s teplotou 15 °C.

Průběžně (2 x týdně) byl sledován **postup rašení** jednotlivých sazenic. Rašení bylo hodnoceno podle stupnice uvedené v tabulce 1, odděleně pro terminální výhon a pro boční výhony, kde byl hodnocen nejvíce rozvinutý pupen.

Tab. 1: Empirická stupnice rašení smrku.

Stav	Index
Neraší	0
Zvětšené pupeny	1
Prosvítají zelené jehlice	2
Sevřené svazečky jehlic vyrůstají mezi šupinami	3
Rozevřené svazečky jehlic, začátek délkového růstu	4
Délkový růst nových výhonů	5

Po vyrašení většiny sazenic byla dne 5. 6. 2012 v temné části dne aplikována **simulovaná mrazová epizoda** s minimální teplotou -4,2 °C a trváním teplot pod bodem mrazu ca 6 hodin. Po aplikaci mrazu byla první pozvolná fáze ohřevu bez osvětlení (15 min), dále byla polovina sazenic ponechána v růstové komoře při plném osvětlení (**varianta S** – světlo; cca 15 000 lux), a druhá polovina při minimálním osvětlení (**varianta T** – stín; cca 500 lux) po 16 hodin. Plné osvětlení u obou variant bylo obnoveno až po následující temné noční periodě.

**Poškození rašících výhonů** bylo hodnoceno vizuálně podle stupnice: 0 – nepoškozené, 1 – slabě poškozené (s možností regenerace), 2 – silně (letálně) poškozené. Hodnocení probíhalo odděleně pro boční výhony a terminální výhon. U bočních výhonů byl stanoven podíl výhonů s různým stupněm poškození v procentech.

**Fluorescence chlorofylu a** posledního vyzrálého ročníku jehličí byla hodnocena v ca týdenních intervalech přístrojem Plant Efficiency Analyser (PEA; Hansatech Instruments, UK). Byla měřena na jednoletém jehličí ze svrchní strany bočních letorostů v horní části korunky. Hodnocení probíhalo v zatemněné místnosti zaručující dodatečné stínění. Pro vyhodnocení v tomto příspěvku byl vybrán parametr maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II pletiva adaptovaného na tmu ( $F_v/F_m$ ; /4/. Vitalita rostlin byla charakterizována parametrem výkonnosti (performance index on absorption basis,  $PI_{abs}$ , /9/.

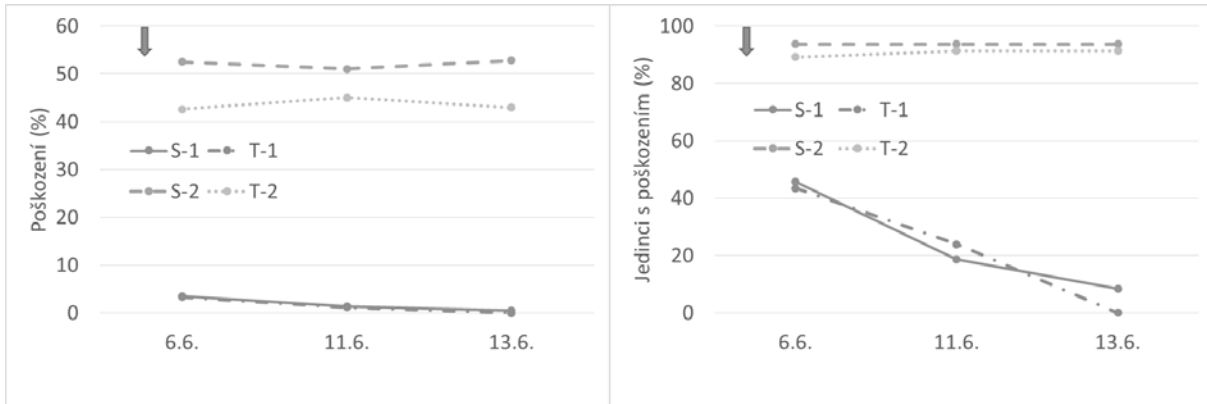
Poškození bočních čerstvě vyrašených výhonů bylo hodnoceno ve vztahu k světelným podmínkám po aplikaci mrazových teplot a k indexu rašení výhonů před mrazem.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

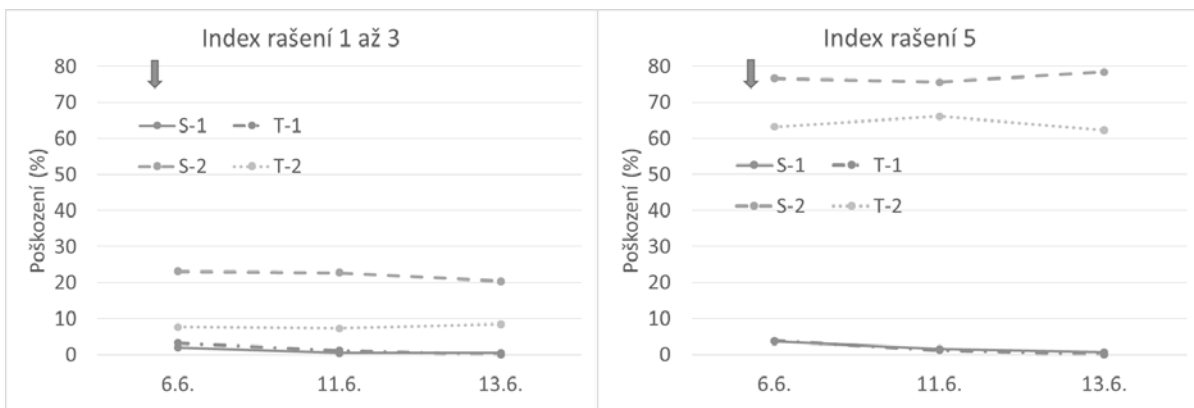
Smrk ztepilý se vyznačuje značnou individuální variabilitou časnosti (rychlosti) rašení. Průměrný průběh rašení před aplikací mrazu byl u obou variant (S a T) srovnatelný.

Simulovaný mráz způsobil výrazné poškození bočních výhonů, stupeň poškození 2 se u varianty T vyskytoval u 91 % jedinců a u varianty S u 94 % jedinců. Průměrné poškození varianty

S bylo o cca 10 % vyšší než u varianty T (Obr. 1). Změny v průměrném poškození jedinců byly v následujících dvou týdnech minimální. Podíl jedinců s poškozením 2 se časem neměnil, výhony postupně odumíraly. Podíl jedinců s poškozením stupně 1 klesal - výhony buď regenerovaly, nebo přecházely do stupně 2.



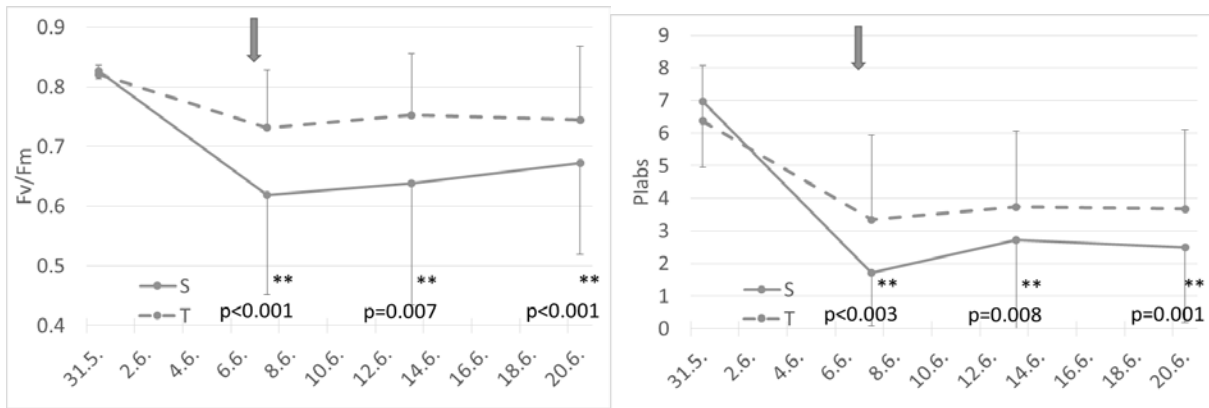
Obr. 1: Průběh průměrného procenta 1. a 2. stupně poškození rašících pupenů na sazenici (vlevo) a podíl jedinců s výskytem poškození 1. a 2. stupně (vpravo) v důsledku simulovaného mrazu (šipka). S-1 – varianta S se stupněm poškození 1, S-2 – varianta S se stupněm poškození 2, obdobně u T. Pozn.: Oba stupně poškození se na sazenicích mohly vyskytovat současně.



Obr. 2: Průběh průměrného procenta 1. a 2. stupně poškození rašících pupenů v důsledku simulovaného mrazu (šipka) podle indexu rašení před mrazem a variant. Popis variant viz obr. 1

Z analýzy poškození ve vztahu ke stavu rašení byl patrný zřetelný vliv časnosti rašení (stavu rašení v době aplikace mrazu) na poškození čerstvě vyrašených výhonů (Obr. 2). U pozdně rašících sazenic bylo pozorované pouze minimální poškození. U sazenic s výrazným délkovým růstem nových výhonů (index 5), byl rozsah i intenzita poškození nejvyšší. Více byli poškozeni jedinci vystavení po mraze silnějšímu osvětlení (varianta S).

Hodnoty maximálního kvantového výtěžku PSII ( $F_v/F_m$ ) posledního vyžralého ročníku jehličí byly již od počátku měření vyšší než 0,83, s nízkou variabilitou (Obr. 4). Tyto hodnoty svědčí o ukončení dormance a dobrém fyziologickém stavu asimilačního aparátu [8]. Vlivem mrazu došlo k výraznému poklesu hodnot  $F_v/F_m$ , průkazně vyšší propad hodnot nastal u varianty S, u které se střední hodnota snížila až na téměř 0,6. Obdobná tendence byla potvrzena i u indexu  $PI_{abs}$ . Průkazné rozdíly přetrvaly i 14 dní po aplikaci mrazu.



Obr. 4: Vývoj maximálního kvantového výtěžku  $F_v/F_m$  (vlevo) a indexu  $PI_{abs}$  (vpravo), průměr a směrodatné odchylky v závislosti na simulovaném mrazu (šipka). Hvězdičky s údajem o pravděpodobnosti značí průkazný rozdíl v daném termínu měření (Man-Whitney test).

Ze studie vyplývá, že u smrku ztepilého stupeň narašení ovlivňuje poškození nových výhonů i fyziologii vyrostlých výhonů sazenic vlivem pozdního mrazu. Se stupněm narašení roste stres mrazem sazenic. Dochází i k narušení fyziologického stavu starších jehlic, přestože jejich poškození není viditelné. Jako u řady druhů dřevin bylo i u smrku potvrzeno, že když po mrazové epizodě následuje den se sníženou intenzitou záření, dochází k menšímu poškození nových výhonů i výkyvu hodnot parametrů fluorescence, než v případě slunečného dne. Zakrývání sazenic při očekávání výskytu pozdních mrazů v lesních školkách se tak jeví účelné nejen vzhledem k předpokladu tlumení mrazových špiček, ale i z hlediska snížení stresu působeného intenzivní radiací po mrazové epizodě, a to nejen u stínomilných druhů dřevin.

## LITERATURA

- 1/ Beadle, C., Sands, R., 2004: Physiology and Silviculture. In: Encyclopedia of Forest Sciences, Volume Four. Oxford, Elsevier 2061 s.
- 2/ Binder, W. D., Fielder, P., 1996: Chlorophyll fluorescence as an indicator of frost hardiness in white spruce seedlings from different latitudes. *New Forests* **11**: 233-253.
- 3/ Dittmar, CH., Fricke, W., Elling, W., 2006: Impact of late frost events on radial growth of common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Southern Germany. *European Journal of Forest Research* **125**: 249–259.
- 4/ Maxwell K., Johnson G.J. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**: 659-668.
- 5/ Neuner, G., Beikircher, B., 2010: Critically reduced frost resistance of *Picea abies* during sprouting could be linked to cytological changes. *Protoplasma* **243**: 145-152.
- 6/ Peguero-Pina, J. J., Morales, F., Gil-Pelegrín, E., 2008: Frost damage in *Pinus sylvestris* L. stems assessed by chlorophyll fluorescence in cortical bark chlorenchyma. *Ann. For. Sci.* **65**: 813.
- 7/ Silfver, T., Häikiö, E., Rousi, M., Holopainen, T., Oksanen, E., 2008: Interactive effects of elevated ozone and springtime frost on growth and physiology of birch (*Betula pendula*) in field conditions. *Trees* **22**:291-301.
- 8/ Strand M., Lundmark T. 1995: Recovery of photosynthesis in 1-year-old needles of unfertilized and fertilized Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) during spring. *Tree Physiology* **15**: 151-158.
- 9/ Strasser R.J., Srivastava A., Tsimilli-Michael M. 2004: Analysis of fluorescence transient. In: Papageorgiou, G., Govindjee (eds.). *Chlorophyll Fluorescence: A signature of photosynthesis, advances in photosynthesis and respiration*. Vol. 19, Springer, Dordrecht: 321–362.

## Poděkování

Uvedená práce vznikla z poskytnuté institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace MZe ČR – Rozhodnutí č. RO0115 (č. j. 5774/2015-MZE-17011).

## VPLYV TEPLoty NA RAST A VÝVOJ JEDLEJ HUBY HLIVY USTRICOVITEJ (*PLEUROTUS OSTREATUS*) S PRIHLIADNUTÍM NA KVANTITU A KVALITU PRODUKCIE

### **THE EFFECT OF TEMPERATURE ON THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF EDIBLE OYSTER MUSHROOM (*PLEUROTUS OSTREATUS*) TAKING INTO ACCOUNT THE QUANTITY AND QUALITY OF PRODUCTION**

Marcel Golian<sup>1</sup>, Alžbeta Hegedúsová<sup>1</sup>, Eva Szabová<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FZKI, Katedra zeleninárstva, Tr. Andreja  
Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika, marcel.golian1@gmail.com, +421 915 158 677

<sup>2</sup> Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, Katedra biochémie a biotechnológie,  
Tr. Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika

#### **Summary**

The research deals with the impact of temperature periods during agrotechnical process of production of fruiting bodies edible oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). From cultivate processes results knowledge about the needs of growing in different temperature regimes. The actual experiment deals with the growth and development of the fruiting bodies of the two variants. Variant A is a group of substrates that have been chilled to 6 °C for 4 days and variant B comprises control substrate without chilling. Used was the production strain HK35. Comparison of alternatives there were no significant differences of growth, development and quality of the final product and therefore the oyster mushroom fruiting bodies.

*Key words:* oyster mushroom , *Pleurotus ostreatus* , growing , production , temperature

#### **Súhrn**

Práca rieši vplyv teplotných períód počas agrotechnického postupu produkcie jedlých plodníc huby, hlivy ustricovitej (*Pleurotus ostreatus*). Z pestovateľskej praxe vyplývajú poznatky o potrebné pestovania v rôznych teplotných režimoch. Samotný experiment rieši rast a vývoj plodníc dvoch variantov, pričom variant A tvorí skupina substrátov, ktoré boli schladené na teplotu 6 °C po dobu 4 dní a variant B, ktorý tvoria substráty kontrolné, bez schladenia. Použitý bol produkčný kmeň HK35. Porovnaním variantov neboli zistené žiadne zásadné rozdiely v raste, vývoji a kvalite finálneho produktu a teda plodníc hlivy ustricovitej.

*Kľúčové slová:* hľiva ustricovitá , *Pleurotus ostreatus* , pestovanie , produkcia , teplota

## **ÚVOD**

Hľiva ustricovitá je saprofytická huba čeľade *Pleurotaceae*, radu *Agaricales* a triedy *Agaricomycetes*, je voľne rastúca, hlavne v jarnom a jesennom období /7/. V potravinárstve dlhodobo využívaná komodita. Nutričné hodnoty plodníc *Pleurotus ostreatus* možno porovnať s vajcami alebo mliekom. Obsah vody v plodniciach je cca 90 % /9/. Pre jej priaznivý účinok na ľudský organizmus zohráva jej pestovanie stále dôležitejšiu rolu, nakoľko v súčasnosti, v dobe intenzívneho výskytu civilizačných chorôb je jej potreba stále väčšia /5/. Plodnice húb nachádzajú vďaka svojej nízkej energetickej hodnote uplatnenie pri rôznych typoch diét /13/. Významným ukazovateľom výhod produkcie potravín zo saprofytických húb je fakt, že na ich produkciu sa využívajú zdanlivo nepotrebné a nevyužiteľné druhotné suroviny poľnohospodárskej výroby a drevospracujúceho priemyslu, ktoré sú často považované za odpad /12/. V súčasnosti poznáme viac ako 200 druhov uplatniteľných substrátov /11/. V našich

podmienkach sa hľiva ustricovitá v intenzívnej výrobe pestuje spravidla na slamennom substráte. Dung /3/ rozdeľuje proces pestovania húb do nasledujúcich krokov: izolácia kultúry z plodnice, vyselektovanie čistej kultúry a nasledovná príprava sadby, príprava substrátu, očkovanie, prerastanie, až samotný zber. /8/ uvádzajú, že teplota významne pôsobí na kvantitu a kvalitu vyprodukovaných húb. Kolonizovanie substrátu mycéliom pri teplote 15 °C je lineárne, pričom pri teplotách v rozmedzí 20 °C až 30 °C sa jeho rýchlosť významne zvyšuje. /6/, ktorí sú s názorom stotožnení, píše, že pre klíčenie spór je najideálnejšia teplota 28 °C. Rovnako rast mycélia všetkých druhov hľív je maximálny pri teplote 28 °C. Tento poznatok možno zovšeobecniť pre všetky vláknité huby. Dolná teplotná hranica pre rast a vývoj mycélia je 5 °C. Samotná kultúra však bez problémov znáša aj mráz, pričom po rozmrznutí a oteplení nad 5 °C huba opätovne pokračuje vo svojom vývoji. Horná teplotná hranica je na úrovni 32 – 35 °C v závislosti od vlhkosti substrátu. Pri teplote vyššej ako 35 °C často dochádza k deštrukcii kultúry. Optimálny teplotný režim pre nasadzovanie zárodokov plodníc hľivy ustricovitej je 8 – 12 °C. *Pleurotus ostreatus* HK35 neplodí pri teplotách vyšších ako 15 °C bez tzv. chladového šoku. /14/ vo svojej práci naopak uvádzajú, že hľiva ustricovitá rastie v širokom rozmedzí teplôt v závislosti od konkrétneho druhu a kmeňa. Rast a vývoj takmer všetkých druhov hľív sa zastavuje už pri teplote 10 °C, pričom úplne hynie pri teplotách nad 40 °C.

## MATERIÁL A METÓDY

### Substráty a produkčný kmeň

Pestovateľské vrecia so substrátmi boli zabezpečené prostredníctvom kúpy od obchodného partnera, firmy Jánoš. Firma má dlhoročné skúsenosti s výrobou substrátov hľivy ustricovitej, pričom používa osvedčený, v praxi najvyužívanejší kmeň HK35. Spomínaný kmeň je určený na očkovanie tak slamenných substrátov pri intenzívnej výrobe, ako aj na očkovanie dreva pri extenzívnom pestovaní. Pestovateľský substrát pre naše výskumné účely bol vyrobený dňa 20. marca 2014. Samotný substrát pre spustenie skúšobnej prevádzky bol objednaný v počte 20 kusov 22 litrových vriec valcovitého tvaru s hmotnosťou jedného vreca cca 10 kg. Naočkovaný substrát odo dňa výroby až do dňa odberu (27.03.2014) prerastal mycéliom v priestoroch firmy. Dňa 28.03.2014 bol prevzatý z dodávateľskej firmy, prevezený a naskladnený do našich výrobných priestorov, kde prerastal pri teplote cca 22 °C až do 13.04.2014. Dňa 14.04.2014 boli vrecia označené číslami 1 - 20.

### Vyhodnotenie výsledkov práce

Celkový počet substrátov (20 ks) bol rozdelený na dva varianty:

- variant A: vrecia so substrátmi, ktoré boli schladené na 6 °C po dobu 4 dní (č.1 – č.10)
- variant B: vrecia so substrátmi, ktoré neprešli chladnou periódou (č.11 – č.20)

Dňa 14.04.2014 boli do priestorov rýchliarne umiestnené prvé vrecia so substrátmi s číslami 1 – 10. Tieto substráty javili znaky dokonalého prerastenia mycéliom, t.j. bielym povlakom. Naskladňovacia teplota bola 6 °C. Uvedená teplota podľa odbornej literatúry vyvoláva iniciáciu tvorby plodníc. Vrecia so substrátmi s označením 11 – 20 sme v tom istom čase nechali ďalej prerastať pri teplote 22 °C. Zámerom bolo zistiť vplyv teploty na tvorbu plodníc.

18.04.2014 bola teplota v priestoroch rýchliarne zvýšená zo 6 °C na 13 °C. Súčasne boli naskladnené aj ostatné vrecia so substrátmi s číslami 11 – 20. Tieto však neprešli rýznym schladením na teplotu 6 °C a dobu 4 dní, ako vrecia so substrátmi 1 - 10. Substráty boli na podlahu rýchliarne ukladané voľne, bez podstavca, pričom boli ukladané do tvaru obráteného písmena V. Počas jednotlivých dní sme merali prírastok plodníc v centimetroch a po dosiahnutí zberovej fázy sme plodnice v čerstvom stave odvážili s presnosťou na gramy a vyhodnotili dosiahnutú úrodu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

### Zhodnotenie kvality a kvantity produkcie plodníc

Prvé zárodky plodníc na substrátoch sa vytvorili 4 dni po naskladnení do rýchliarne s teplotou 13 °C. Jednalo sa o substrát číslo 10 z variantu A. Inicializácia posledných zárodokov prvej vlny sa uskutočnila po 11 dňoch od naskladnenia substrátov do rýchliarne. V tomto prípade šlo o substráty číslo 11 a 19, teda vrecia zaradené do variantu B. Výsledky uvádzame v tabuľke číslo 1.

Tab. 1: Prehľad úhrnu dní od inicializácie plodníc po zber (Zdroj: Vlastná práca, 2014)

Prehľad úhrnu dní od inicializácie plodníc po zber							
Variant A				Variant B			
substrát číslo	začiatok plodenia v dňoch	koniec plodenia v dňoch	dĺžka vývoja plodníc v dňoch	substrát číslo	začiatok plodenia v dňoch	koniec plodenia v dňoch	dĺžka vývoja plodníc v dňoch
1	7	22	15	11	11	22	11
2	6	20	14	12	9	19	10
3	8	22	14	13	9	20	11
4	8	22	14	14	7	19	12
5	6	19	13	15	7	19	12
6	6	20	14	16	9	12	13
7	5	20	15	17	8	20	12
8	9	22	13	18	7	19	12
9	7	20	13	19	11	22	11
10	4	16	12	20	7	19	12
Priemer	10 deň	24 deň	14 dní	Priemer	13 deň	23 deň	12 dní

Prvý zber plodníc prvej rastovej vlny sa začal dňa 03.05.2014, teda 16. deň od naskladnenia substrátov. Posledné plodnice prvej rastovej vlny dosiahli zberovú veľkosť dňa 09.05.2014, teda 22. deň od naskladnenia substrátov. Z tabuľky číslo 1 vyplýva, že priemerný počet dní od naskladnenia po iniciáciu prvých zárodokov plodníc je 11 dní a že vývoj plodnice od inicializácie po deň zberu je v priemere 13 dní. Po spočítaní týchto dní potrebných na inicializáciu plodníc s dňami potrebnými na vývoj plodníc sme dostali celkový počet dní potrebných na prvú rastovú vlnu. Za použitých podmienok, prvá rastová vlna prebehne za 24 dní, zatiaľ čo autori Jablonský a Šašek /6/ uvádzajú 21 dní. Vzniknutý rozdiel si možno vysvetliť použitím rôznych teplôt v rýchliarni pri pestovaní húb. Zatiaľ čo autori opisujú pestovanie pri teplote 13 až 21°C, my sme pestovali pri stabilnej teplote 13 °C. Známe je, že pri vyšších teplotách sa plodnice vyvíjajú skôr, sú však náchylné na choroby a škodcov. Porovnaním variantu A a variantu B sme zistili, že chladový šok pri teplote 6 °C po dobu 4 dní mal mierny vplyv na nástup jednotlivých substrátov do rodivosti. Zatiaľ čo substráty z variantu A začali iniciovať plodnice v priemere po 10 dňoch od naskladnenia do rýchliarne, substráty z variantu B začali plodiť v priemere po 13. dni. Dôležitejšie je však zistenie, že substráty z variantu B dosiahli zberovú veľkosť v priemere o deň skôr ako substráty z variantu A. Na základe týchto zistení konštatujeme, že v procese produkcie plodníc jedlej huby *Pleurotus ostreatus* pri kmeni HK35 schladzovanie substrátov na teplotu 6 °C nie je potrebné. Vyhneme sa tým zbytočným nákladom na energie. Zistili sme, že chladový šok nebol vôbec potrebný, čím sme v čiastočnom rozpore so zistením autora Jablonského /6/, ktorý tvrdí, že na fruktifikáciu húb je často krát potrebné schladenie na 5 °C po dobu niekoľkých dní.

V nasledujúcej tabuľke uvádzame výnosy plodníc čerstvých húb z jednotlivých substrátov pozbieraných počas prvej rastovej vlny.

Tab. 2: Výnos čerstvých húb z jednotlivých substrátov v gramoch (Zdroj: Vlastná práca, 2014).

Prehľad výnosu čerstvých húb							
Variant A				Variant B			
substrát číslo	Poradie v nástupe do rodivosti	trvanie zberu v dňoch	výnos v g	substrát číslo	poradie v nástupe do rodivosti	trvanie zberu v dňoch	výnos v g
1	štvrtý	3	906	11	siedmi	1	906
2	tretí	2	766	12	šiesty	1	644
3	piaty	5	1 152	13	šiesty	3	824
4	piaty	5	804	14	štvrtý	2	984
5	tretí	3	1 052	15	štvrtý	1	1 327
6	tretí	2	1 032	16	šiesty	4	878
7	druhý	4	860	17	piaty	3	618
1	štvrtý	3	906	11	siedmi	1	906
2	tretí	2	766	12	šiesty	1	644
3	piaty	5	1 152	13	šiesty	3	824
<b>Spolu 10 290</b>				<b>Spolu 10 009</b>			

Výnosy plodníc z prvej rastovej vlny spolu z variantu A a variantu B tvoria 20 299 g, čo je v prepočte 10,14 % váhy celkového substrátu. Väčšina autorov /1, 2, 4, 6, 10/ uvádza, že výnos plodníc je na úrovni 15 - 30 % celkovej váhy čerstvého substrátu, pričom prvá vlna tvorí obyčajne 70 % celkovej produkcie húb. Výnimka však nastáva, keď v priebehu prvej rastovej vlny sa vyskytujú problémy, ktoré obmedzia vývoj plodníc. S uvedeným súvisia nasledujúce zistenia. Z celkového pozorovania vývoja jednotlivých substrátov môžeme s určitosťou povedať, že vrecia so substrátmi, ktoré začali rodiť skôr, dosiahli najvyššiu produkciu. Plodnice dorastali do väčších rozmerov a ich vývoj prebiehal bez problémov. V substrátoch, ktoré vstúpili do rodivosti neskôr, sme zaznamenali veľké nedostatky. Zatiaľ čo spočiatku prebiehal ich vývoj plodníc štandardne, postupom času sa začali jednotlivé plodnice veľkostíne diferencovať. Plodnice rastúce vyššie sa vyvíjali ďalej, ale plodnice rastúce nižšie do veľkej miery zaostávali, až prestali rásť, zavädli a zmraštili sa. Domnievame sa, že celý problém vznikol nahromadením sa plynu pri podlahe rýchliarne, nakoľko plyn CO<sub>2</sub> je ťažší ako O<sub>2</sub>, steká ku zemi, a tým brzdí rast plodníc, ktoré sú nižšie umiestnené.

V posledných dňoch zberu úplne prestali rásť aj plodnice vo vyšších miestach, čo malo veľký vplyv na znižovanie výnosov z produkcie. Toto zistenie však nesúvisí s teplotnými periódami počas rýchlenia húb. Vo výsledkoch uvádzame, že medzi variantmi nie je žiaden zásadný rozdiel. Výška úrod jednotlivých variantov bola takmer totožná. Z uvedeného vyplýva, že pre pestovateľskú prax neodporúčame pri kmeni HK35 používať chladový šok, čím sa vyhneme zvýšeným nákladom na energiu. Na záver je potrebné uviesť, že všetky plodnice získané z prvého zberu boli úplne zdravé, bez deformácií, alebo iného poškodenia. Vplyvom optimálnej pestovateľskej teploty sme predišli rozvoju hmyzích škodcov a ďalších nežiaducich mikroorganizmov.

#### LITERATÚRA

- /1/ Bela, E., Khalafalla, M.: Biodegradation of *Panicum repens* residues by *Pleurotus ostr.* for its use as a non conventional feedstuff diets off *Oreochromis niloticus*. Microbiology, 19, 2011: 3038-3050 ISSN 1996 – 0808.
- /2/ Block, S., Tsao, G., Han, L.: Experiments in the cultivation of P.O. Mushroom Science, 4, 1959: 309.
- /3/ Dung, L.B.: Mushrooms in Tay Nguyen. Ha Noi: Science and Technique, 2003.
- /4/ Ginterová, A.: Pestovanie húb. Príroda, Bratislava, 1985: 124-160.

- /5/ Chang, R.Y.: Functional properties of mushrooms. *Nutrition Reviews*, 54,1996: S91–S93.
- /6/ Jablonský, I., Šašek, V.: *Jedlé a léčivé houby*. Brázda 2006, Praha, 2006: 263 ISBN: 80-209-0341-0.
- /7/ Lee, JY.: *Coloured Korean mushrooms*. Seoul: Academy Press, 1993.
- /8/ Mishra, S.K., Tiwari, A.K.: Pfenological, quantitative and analytical studies off *Pleurotus*. *African Journal of Biotechnology*, 11, 2012: 346 – 354 ISSN 1684-5315.
- /9/ Oei, P.: *Manual on mushroom cultivation: techniques, species and opportunities for commercial application in developing countries*. TOOL Publications, Amsterdam, 2003: 274.
- /10/ Petersen, R., Hughes, K., Psurtseva, N.: Biological Species in *Pleurotus*. [online] 2010. [cit. 23.4.2015]. Dostupné na internete: <http://www.bio.utk.edu/mycology/Pleurotus/default.htm>.
- /11/ Poppe, J.: *Agricultural Wastes as Substrates for Oyster Mushroom*. In: Gush R (ed) *Mushroom Growers Handbook 1*, Mush World, Seoul, 2004.
- /12/ Sharma, S., Kailash, R., Yadav, P., Pokhre, C.P.: Growth and Yield of Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on different Substrates. *Journal on New Biological Reports*, 2, 2013: 03 – 08.
- /13/ Synytsya, A., Mickova, K., Jablonsky, I., Slukova, M., Copikova, J.: Mushrooms of genus *Pleurotus* as a source of dietary fibers and glucans for food supplements. *Czech Journal Food Sciense*, 6, 2008: 441 – 446.
- /14/ Uddin, M.N., Yesmin, S., Khan, M.A., et al.: Production of Oyster mushrooms in Different Seasonal Conditions of Bangladesh. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 3, 2011: 161 – 167 ISSN 0975-1084.

### Pod'akovanie

Uvedená práca vznikla za finančnej podpory výskumného zámeru VEGA 1/0105/14



## ZMENY KLIMATU A ÚZEMNÉ VPLYVY NA NITRIANSKY SAMOSTATNÝ KRAJ (Prípadová štúdia)

### *CLIMATE CHANGE AND TERRITORIAL EFFECTS ON NITRA SELF-GOVERNING REGION (Case Study)*

Ivan Šembera<sup>1</sup>, Tomáš Šembera<sup>1</sup>, Jiří Balajka<sup>2</sup>, František Fekete<sup>3</sup>, Milan Lapin<sup>4</sup>, Pavel Šťastný<sup>5</sup>, Tibor Tóth<sup>1</sup>

<sup>1</sup> EKOJET s.r.o. Staré Grunty 9A, 841 04 Bratislava

<sup>2</sup> ECOSYS, Bratislava

<sup>3</sup> VÚVH, Bratislava,

<sup>4</sup> Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Bratislava

<sup>5</sup> SHMÚ Bratislava

#### *Summary*

CLIMATE CHANGE AND TERRITORIAL EFFECTS ON NITRA SELF-GOVERNING REGION (Case Study) is a first attempt of a pan – Nitra region cross-sectoral climate change vulnerability assesment. Case Study uses a conceptual framework ESPONClimate project, provide in-depth regional analyses of climate change vulnerability (exposure, sensitivity, impact, adaptation). The results of the Case Study shows that the following sectors of the economy are directly affected\_ the primary sector agriculture a water managemant. As a rule unfavourable impacts are addressed by the development of water managemant and the use of various means of risk prevention.

*Key words: climate change, ESPON Climate project, vulnerability assesment*

#### *Súhrn*

Prípadová štúdia Zmena klimatu a územné vplyvy na Nitriansky samostatný kraj je prvým pokusom medzisektorového hodnotenia zraniteľnosti na klimatické zmeny regiónu. Štúdia má koncepčný rámec projektu ESPONClimate. Poskytuje podrobné regionálne analýzy zraniteľnosti zmenou klímy (expozícia, citlivosť, dopad, adaptácia). Výsledky projektu poukazujú, že priamo ovplyvnené sú sektory hospodárstva: primárny sektor poľnohospodárstvo a vodné hospodárstvo. Spravidla sú nepriaznivé dopady riešené vývojom manažmentu hospodárenia s vodou a využitím rôznych prostriedkov prevencie rizík.

*Kľúčová slova: klimatické zmeny, Projekt ESPON Climat, odhad zraniteľnosti*

## ÚVOD

Nitriansky kraj je najvýznamnejším poľnohospodárskym producentom, druhým najvýznamnejším producentom energií a druhým najvýznamnejším poskytovateľom obchodných služieb v Slovenskej republike. Zásadným podkladom pre vypracovanie prípadovej štúdie bola Šiesta správa o zmene klímy /6/, ktorá detailne analyzuje vývoj témy v širšom medzinárodnom, EÚ a v národnom kontexte a súčasne hodnotia plnenie záväzkov Slovenskej republiky.

## MATERIÁL A METÓDA

K riešeniu úlohy bol zvolený koncepčný a metodický princíp programu *ESPONClimate project* ([www.espon.eu](http://www.espon.eu)), ktorý definuje možné dopady zmien klimatu na vybrané prírodné riziká, zvlášť tie, ktoré sa prejaví v priestorovom plánovaní a v jednotlivých sektoroch hospodárskej činnosti. Metodika obsahuje nasledujúce komponenty.

*Expozícia* – vyjadruje povahu a stupeň, ktorými je určitý systém vystavený významným klimatickým variáciám. Analýza expozície využila existujúce projekcie klimatických zmien a klimatickej premenlivosti z modelu CCS 2000, ktorého výsledky boli použité k vytvoreniu scenára klimatickej zmeny a scenára hydrologického cyklu Nitrianskeho regiónu pre obdobie do roku 2050.

*Citlivosť* – vyjadruje stupeň, ktorým je systém ovplyvnený buď negatívne alebo kladne a klímou súvisiacimi stimuly. Pre každý rozmer citlivosti (fyzikálny, environmentálny, sociálny, ekonomický a kultúrny) boli vypracované viaceré indikátory citlivosti.

Expozícia a citlivosť boli kombinované na určenie *potenciálnych vplyvov* klimatických zmien a na určenie celkovej zraniteľnosti Nitrianskeho regiónu.

*Zraniteľnosť* - vyjadruje stupeň, v ktorom je systém zraniteľný, alebo neschopný sa vyrovnat' sa so zápornými dôsledkami klimatických zmien, vrátane variability klímy a extrémov. Zraniteľnosť je funkciou povahy, veľkosti a rýchlosti klimatickej variácie, ktorej je systém vystavený, jeho citlivosti a adaptívnej schopnosti.

*Schopnosť adaptácie (alebo adaptability)* - vyjadruje schopnosť prírodného alebo humánneho systému prispôbiť sa klimatickým zmenám ( vrátane klimatickej variability a extrémov) na zmiernenie potenciálnych škôd, využitie príležitostí, alebo na vyrovnanie sa s dôsledkami.

*Zmiernenie dôsledkov /adaptačné opatrenia)* - označuje všetky ľudské pokusy o zmiernenie dôsledkov klimatických zmien.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V úlohe boli analyzované efekty klimatických zmien v podobe adaptačnej kapacity regiónu v sektoroch regionálnej ekonomiky: vodné hospodárstvo, poľnohospodárstvo, lesné hospodárstvo, zdravotníctvo, cestovný ruch, doprava, sídelné prostredie, energetika a biodiverzita. Rovnako bola posúdená adaptačná kapacita mikroregiónu Požitavie-Širočina.

Zhodnotenie časového priebehu vybraných teplotných, zrážkových a kombinovaných ukazovateľov klimatickej zmeny za obdobie 1961 – 2014 v regióne Nitrianskeho samosprávneho kraja (NSK) ukazuje na nasledovné skutočnosti.

Teplotné ukazovatele majú zreteľne vyjadrený vzrast priemerných aj extrémnych teplôt vzduchu vo všetkých ročných obdobiach na celom území kraja. Priemerná ročná teplota vzduchu aj počet letných a tropických dní rastie, čo spôsobuje nielen skorší nástup vegetačného obdobia, ale aj zvýšený nárast vln horúčav v letnom období. Naopak, pokles počtu ľadových a mrazových dní ukazuje na celkove vyšší výskyt miernejších zím, ktorých kladnou stránkou sú nižšie energetické nároky na vykurovanie, no zápornou možnosť vyššieho výskytu zimných povodní. Zrážkové ukazovatele nemali za spracované obdobie výrazný trend.. Suma zimných zrážok v uvedenom období stagnovala a suma letných len slabó rástla. Výskyt intenzívnych zrážok tiež nevykazoval časový vývoj. Do trendov ukazovateľov zmeny klímy, ktoré sú výsledkom kombinácie teplotných a vlhkostných (zrážkových) ukazovateľov v podstatnej miere zasahuje vývoj teploty vzduchu. Trend aktuálnej evapotranspirácie v suchých oblastiach NSK rastie, no výraznejší je vzrast potenciálnej evapotranspirácie. Tento vývoj znamená vysušanie vrchných vrstiev pôdy. Aj v počte dní so snehovou pokrývkou je klesajúci trend spôsobený podstatnou mierou vzrastom teploty vzduchu v zimných mesiacoch.

Zmeny v cirkulačných pomeroch atmosféry zrejme spôsobia, že južná časť NSK bude zasiahnutá otepľovaním klímy a aj súvisiacou zmenou iných klimatických prvkov viac ako severná časť NSK. To sa prejaví predovšetkým v zhoršených podmienkach zavlaženia pôdy a v častejšom výskyte sucha. Na druhej strane, významné zvýšenie intenzívnych konvektívnych zrážok na úkor trvalých zrážok s menšou intenzitou bude mať za následok nevyrovnaný režim zavlaženia pôdy a častejší výskyt prívalových povodní v celej oblasti NSK. V malej nadmorskej výške bude závažným negatívnym dôsledkom oteplenia klímy oveľa častejší výskyt vln horúčav súčasne s vysokou absolútnou vlhkosťou vzduchu.

### Sektor vodného hospodárstva

Scenár hydrologického cyklu SR predpokladá, že väčšina územia bude poznačená poklesom odtoku. Pre časový horizont 2030 sa predpokladalo, že takmer 64 % plochy územia sa bude nachádzať v pásme poklesu -5 až -20 %, v časovom horizonte 2075 viac ako 77 % plochy územia Slovenska v pásme poklesu -20 až -40 %. Obdobne sa pokles odtoku prejaví aj v sledovaných výškových pásmach, kde sa zachovanie súčasného stavu predpokladá len v nadmorských výškach nad 800 m n. m. v časových horizontoch 2010 a 2030. V ostatných výškových pásmach sa predpokladá mierny až výraznejší pokles odtoku. Najvyšší je vyhodnotený pre oblasť nížin, kde sa pre časový horizont 2075 predpokladá pokles dlhodobého priemerného ročného odtoku o viac ako -27 %. Mierny rast odtoku, resp. zachovanie súčasného stavu sa predpokladá v rámci sledovaných povodí iba pre povodia západného Slovenska a to iba pre časové horizonty 2010 a 2030.

Klimatické zmeny budú významne ovplyvňovať aj využiteľnosť vodných zdrojov. Pre obdobie 1931-1980 a súčasný stav obyvateľov vychádza využiteľná voda 2,84 tis. m<sup>3</sup> za rok na obyvateľa. Pri poklese vodných zdrojov ovplyvnených klimatickou zmenou a náraste počtu obyvateľov môže v suchých rokoch výrazne klesať až na kritickú úroveň. Pri nezmenenom vývoji klímy k časovému horizontu 2050 by sme pri takomto trende mohli očakávať, že využiteľné zdroje vody nám poklesnú o 40 až 50% (teda klesnú na hodnoty okolo 1,42 (tis. m<sup>3</sup>/rok/obyvateľ).

Z aplikácie scenára vyplývajú aktuálne negatívne dopady klimatických zmien v podobe povodní. V dotknutom území Nitrianskeho kraja bolo identifikovaných 44 obcí s potenciálne významným povodňovým rizikom (okres Nitra 14 obcí, okres Levice 7 obcí, okres Nové Zámky 8 obcí, okres Zlaté Moravce 15 obcí). U obcí mikroregiónu Požitavie – Širočina sú navrhnutá konkrétna opatrenia (Slovenský vodohospodársky podnik, š.p. Banská Štiavnica),

ktorá znižujú maximálne prietoky povodne a chránia územia pred zaplavením: úprava vodných tokov, výstavba protipovodňových línií pozdĺž vodných tokov, výstavba vodných hrádzí a poldrov, zariadenia na prečerpávanie vnútorných vôd, odstraňovanie nánosov a porastov na brehu vodných tokov. Štúdia doplnila návrh opatrenia, ktoré zvyšujú retenčnú schopnosť dotknutého územia obce, spomaľujú odtok vody z územia do vodných tokov, podporujú akumuláciu vody, podporujú protierózne úpravy na poľnohospodárskej pôde a úpravy na urbanizovanom území dotknutej obce.

### Sektor poľnohospodárstva

Dôsledky klimatickej zmeny sa budú prejavovať vo väčšej miere v sektore poľnohospodárstva. Priebeh počasia počas vegetačného obdobia výrazne bude ovplyvňovať výšku úrod poľnohospodárskych plodín. Pri predpokladanom náraste výparu a bez výraznejšieho zvýšenia atmosférických zrážok bude ohrozená suchom časť Podunajskej nížiny ohraničená mestami Nitra, Levice, Šahy s výskytom veľmi úrodných pôd (ľahké a stredne ťažké pôdy pôdy černoze, fluvizeme). Významným nástrojom na elimináciu sucha sú funkčné závlahy, ktoré hodnotíme pre dotknuté územie ako existenčno-stabilizačný faktor poľnohospodárskej výroby. Medzi pozitívne dôsledky zmeny klimatu môžeme zaradiť predĺženie obdobia bez mrazov o 20-30 dní a posunutie začiatku vegetačného obdobia za začiatok marca. Očakávaný teplotný vzostup vytvorí podmienky pre pestovanie teplomilných plodín.

### Sektor lesné hospodárstva

Výstupy prípadovej štúdie hodnotí budúce environmentálne riziká v lesnom hospodárstve v podobe významného narušenia lesných ekosystémov s výskytom smreku. Nepredpokladá sa však, že bude v krátkodobom výhľadu dochádzať k výraznému posunu vegetačných stupňov.

### Sektor energetiky

Pod pojmom energetika sú zahrnuté ekonomické aktivity spojené s výrobou elektriny, tepla ako aj ostatné procesy spaľovania v priemysle, verejnom sektore a domácnostiach. Je to v súlade s metodikou inventarizácie a projekcie skleníkových plynov IPCC. Energetika je zdrojom najväčšieho objemu skleníkových plynov, predovšetkým CO<sub>2</sub> zo spaľovania fosílnych palív.

V rámci analýzy dopadov klimatických zmien na sektor energetiky Nitrianskeho kraja sa táto štúdia zamerala na to, ako postupné otepľovanie zníži potrebu vykurovania a tým aj spotreby palív a tvorby emisií. Okrem kvantitatívnych údajov (spotreba palív v TJ) emisie v kt. boli tieto výsledky aj vyjadrené v monetárnych jednotkách t.j. v znížení palivových a externých nákladov výroby tepla. Dopad klimatických zmien však z hľadiska ekonomiky jednotlivých subjektov bude pozitívne pôsobiť v prípade sektorov 1A4a a 1A4b kde majitelia výrobcov tepla sú aj ich spotrebiteľia, zatiaľ čo u ekonomických subjektov v rámci sektoru 1A1a to predstavuje zníženie tržieb za dodávku tepla. Na druhej strane tieto subjekty však budú naďalej musieť prevádzkovať zariadenie bez odpovedajúceho znižovania kapacity. Z toho vyplýva aj potreba udržania si prevádzkovej kapacity vykurovania. Pre zdroje zabezpečujúce dodávku tepla pre externých odberateľov t.j. pre zdroje sektoru 1A1a bude musieť v budúcnosti URSO stanoviť inú štruktúru kalkulácie ceny tepla, kde fixné náklady budú mať väčšiu váhu ako doteraz oproti nákladom palivovým. Klimatické zmeny v sektore energetiky môžu mať dopad na zásadné rozdiely medzi ponukou a dopytom po energii. Nárast priemernej zimnej teploty sa môže prejavovať na poklese dopytu pri vykurovaní, na druhej strane pri zvýšení priemerných letných teplôt a ich extrémity môže mať za následok jej zvýšenie (klimatizačné a chladiarenské procesy).

#### Ostatné sektory

Zmeny klimatu a hlavne riziká zvýšenej extremity počasia sa budú prejavovať aj na zdraví obyvateľstva, v cestovnom ruchu, v doprave, v sídelnom prostredí a dopadu na biodiverzitu. S ohľadom na závažnosť rizík sa predpokladajú dopady v týchto sektoroch len nárazovo.

Prípadová štúdia využila koncepčný rámec ESPONClimate a na tomto základe bola schopná vytvoriť súdržnú metodológiu posúdenia zraniteľnosti Nitrianskeho samosprávneho kraja. Avšak výber, výpočet a zlučenie jednotlivých indikátorov zahŕňajú nielen vedecké znalosti ale aj normatívne rozhodnutia, ktoré aspekty takých koncepcií ako sú klimatické zmeny, citlivosť alebo schopnosť adaptácie, majú byť zachytené a posudzované.

Adaptácia na klimatické zmeny je zadaná ako prispôbenie prírodných a ľudských systémov v reakcii na skutočné alebo očakávané klimatické podnety alebo ich účinkov, ktoré zmierňujú hrozby klimatické zmeny alebo využíva prospešná zariadenia. Adaptačné opatrenia v prípadovej štúdii sú zameraná na adaptačné prístupy v hlavných sektoroch hospodárskej činnosti v regiónu u jednotlivých technických riešení až po návrh významných zmien v činnosti sektorov.

Rozsah návrhu adaptačných opatrení bol ovplyvnený nedostatkom údajov na likvidáciu škôd, nákladoch a prínosoch adaptačných opatrení, spôsobu monitorovaní a vyhodnotení už stávajúcich opatrení. Schopnosť adaptácie je závislá na dostupnosti finančných zdrojov, technológiách, dostupných informáciách, vhodnom plánovaní a celkovej infraštruktúre. ale aj normatívne rozhodnutia, ktoré aspekty takých koncepcií ako sú klimatické zmeny, citlivosť alebo schopnosť adaptácie, majú byť zachytené a posudzované.

#### **LITERATÚRA**

- /1/ ESPON Climate 2013 Climate Change and Territorial Effects on Regions and Local Economies, Scientific Report, [www.espon.eu](http://www.espon.eu).
- /2/ ESPON Climate 2013 Climate Change and Territorial Effects on Regions and Local Economies, Case Study North Rhine-Westphalia (NRW), [www.espon.eu](http://www.espon.eu).
- /3/ The Sixth National Communication of the Slovak Republic on Climate Change, 2013: MŽP SR, SHMÚ.

## STUDIUM FAKTORŮ, OVLIVŇUJÍCÍCH ROZVOJ „VODNÍHO KVĚTU“ VE VODNÍ NÁDRŽI SEČ

### STUDY OF FACTORS INFLUENCING THE DEVELOPMENT OF „WATER BLOOM“ IN THE WATER RESERVOIR SEČ

Sándor T. Forczek<sup>1</sup>, Josef Holík<sup>1</sup>, Luděk Rederer<sup>2</sup>, Václav Koza<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ústav experimentální botaniky Akademie věd ČR, Izotopová laboratoř, Videňská 1083, 142 20 Praha 4, Česká republika, alex067@biomed.cas.cz

<sup>2</sup> Povodí Labe s.p., Víta Nejedlého 951, CZ-50003 Hradec Králové, Česká republika

#### Summary

In this work, we monitored several parameters that influence the development of algal bloom on the water reservoir Sec. Primarily climatic conditions belong to the monitored parameters that influence the population dynamics of algae (air temperature and rainfall, incident light), temperature stratification of water, concentration of oxygen, concentrations of total phosphorus, phosphate, various forms of nitrogen and organic substances, turbidity and also diversity and frequency of phytoplankton and zooplankton species. Between 2012 and 2014 have not occurred massive algal blooms in the summer months, however the measured physical, chemical and biological data, can be used to assess the development of algal population. The population dynamic factors influencing algal growth must be understood to be able to predict formation and to attempt suppression of algal blooms.

*Key words: Cyanobacteria, water bloom, water reservoir Seč, eutrophication*

#### Souhrn

V této práci jsme sledovali řadu parametrů, které mají vliv na rozvoj vodního květu na nádrži Seč. Mezi sledované parametry, které ovlivňují dynamický vývoj populace sinic a řas, patří především klimatické podmínky v daném roce (teplota vzduchu a množství srážek, množství dopadajícího světla), teplotní stratifikace vody, koncentrace kyslíku, celkového fosforu a fosfátů, koncentrace různých forem dusíku, množství organických látek, zákal a nezanedbatelnou úlohu má druhová četnost a rozmanitost fytoplanktonu i zooplanktonu.

V letech 2012 až 2014 nedošlo v letních měsících k masivnímu kvetení vody, nicméně pomocí naměřených fyzikálních, chemických a biologických údajů jsme hodnotili rozvoj populací sinic a řas. K pochopení tvorby vodního květu, predikci rozvoje a k možnostem jejího potlačení je nutno přihlížet k populačně dynamickým faktorům, ovlivňujícím přemnožení sinic.

*Key words: sinice, kvetení vody, vodní nádrž Seč, eutrofizace*

## ÚVOD

Fenomén nazývaný „vodní květ“ je hromadné, pouhým okem viditelné přemnožení řas nebo sinic. Vyskytuje se ve stojatých nebo pomalu tekoucích vodách zejména v letních měsících, kdy bývá teplota vody nejvyšší. Prakticky pro celé okolí znamená výskyt vodního květu nepříjemný poplach: lze očekávat významné zhoršení kvality vody jak pro rekreační, tak pro vodárenské účely, možnou produkci řady toxických látek (především cyanotoxinů), při masivním přemnožení sinic hrozí lidem zdravotní problémy a může dojít i k hromadným úhynům ryb. Příčinou tohoto přemnožení bývá obvykle hypereutrofizace vody, tj. zvýšený obsah fosforu a dusíku ve vodě, ke kterému dochází antropogenní činností člověka (splachy z přehnojených polí, nedostatečné nebo zcela chybějící čištění odpadních vod apod.) spolu s klimatickými podmínkami v daném roce.

Účelem této práce je poznat důležité faktory přispívající rozvoji populaci fytoplanktonu a umožnit tak predikci přemnožení sinic.

## MATERIÁL A METODY

Ve vodní nádrži Seč jsme odebírali vzorky vody k chemické a biologické analýze v zaměřených vertikálách v epilimniu (30cm pod hladinou) a hypolimniu (nade dnem). Vzorkování jsme prováděli v dvoutýdenním intervalu na začátku a na konci vegetační sezóny, tj. v květnu, září a říjnu a a týdně během vegetační sezóny. Vzorkování vždy probíhalo ze člunu na odběrových místech, která byla zaměřena pomocí GPS, s použitím odběrového zařízení, ve vzorcích stanovovaly akreditované laboratoře Povodí Labe standardním normovaným způsobem množství organických látek ( $\text{CHSK}_{\text{Mn}}$ ), celkový obsah fosforu, obsah  $\text{PO}_4$ , obsah celkového dusíku, množství  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$  a  $\text{NH}_4$ . Obsah chlorofylu a a feopigmentů jsme měřili fluorimetricky. Vzorky pro mikrobiologické analýzy jsme odebírali planktonní sítkou se 100  $\mu\text{m}$  okem a Dr. V. Koza (Povodí Labe) provedl v odebraných vzorcích biologické analýzy fytoplanktonu (sinice a řasy) i zooplanktonu.

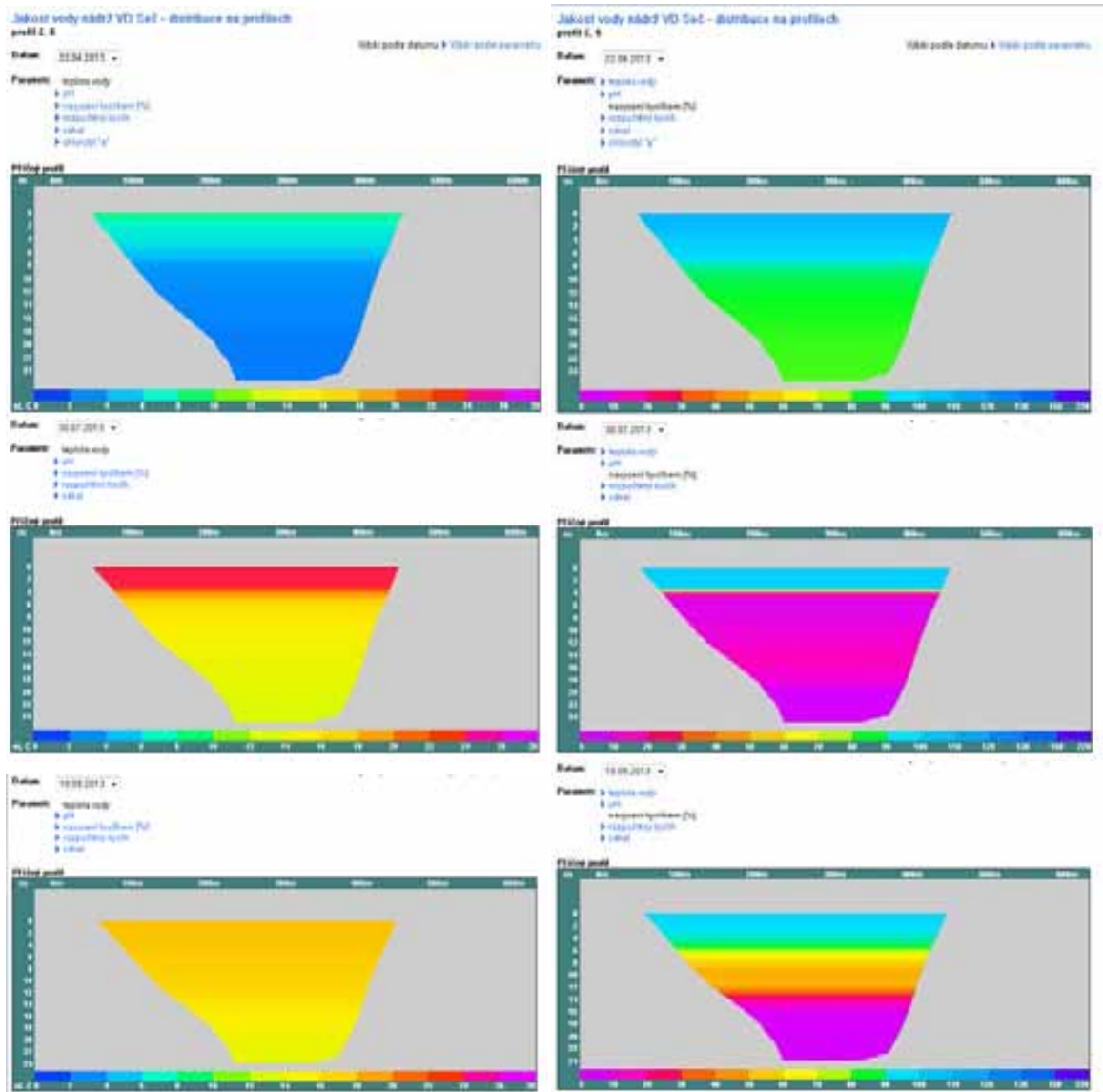
Na stejných odběrových místech jsme měřili multiparametrickou sondou YSI 6600 nebo YSI EXO6 s integrovaným hloubkovým čidlem na vertikálách s hloubkovým krokem 1 m další aktuální fyzikální a chemické parametry vody (teplota, průhlednost, zákal, obsah a nasycení kyslíkem, pH, obsah fykocyaninu a chlorofylu). Secchiho deskou jsme měřili průhlednost vody. Dále jsme sledovali meteorologické údaje pomocí lokálně umístěných automatických čidel (teplota a vlhkost vzduchu, množství srážek).

## VÝSLEDKY A DISKUSE

Na jaře se začíná zvyšovat teplota vzduchu, a proto s malým časovým odstupem se také zvedá teplota vody. Zobrazením distribuce teplotních poměrů v celé akumulaci, lze pozorovat tvorbu základních objemových útvarů v nádrži, jejichž vznik předurčuje procesy, které se následně podílejí na vývoji jakosti vody.

Maximum teploty vody bylo v roce 2012 dosaženo na začátku července a v půli srpna, stejně jako teplota vzduchu. Ze začátku sledovaného období bylo možné pozorovat teplotní stratifikaci, kde v prvních 5 m teplota prudce klesala, od 5 do 12 m teplota relativně stabilně klesala a od pak od 15 m zůstala stabilní. Toto vrstvení v průběhu září roku 2012 postupně zmizelo, a koncem září byla i v nejhlubším místě skoro stejná teplota jako u povrchu. V roce 2013 probíhala teplotní stratifikace obdobně, nástup této stratifikace započal již v červenci vzhledem k vyšším teplotám vzduchu a teplotní zlom byl ostřejší. Povrchová teplota vody se v první polovině srpna dostala až k 25 °C. Srážky ve druhé polovině srpna 2013 ochladily povrchovou vrstvu, došlo k promíchání celého vodního tělesa a tím k vyrovnání teplot v epilimniu a hypolimniu, které se udrželo během celého října (Obr. 1.). V roce 2014 docházelo k pomalejšímu prohřívání vodního tělesa, výraznější teplotní stratifikace začala začátkem prázdnin, avšak termoklima probíhala v malé hloubce (od cca 2 m do asi 4 m).

Zhoršování hydrochemického a kyslíkového režimu je prvotním signálem počínající eutrofizace vodního biotopu. Zatím co u hladiny je kyslíku nadbytek, v hlubších vrstvách jej začíná být nedostatek. Kyslík je spotřebováván dýcháním vodních živočichů i rozkladem organických látek. Vede to k nepříznivým kyslíkovým poměrům u dna. Biocenóza fytoplanktonu je poměrně chudá, zvyšuje se zákal, a tudíž se snižuje průhlednost vody, v jednotlivých vrstvách během letní stratifikace jsou zaznamenány skokové změny koncentrace kyslíku. Se zvyšující se fotosyntetickou aktivitou fytoplanktonu se v epilimniu mění i pH vody vlivem snižování obsahu  $\text{CO}_2$ .



Obr. 1. Vertikální stratifikace teploty a nasycení vody kyslíkem v různých obdobích (bod 6)

Důvodů, proč se sinice letech 2012 a 2013 nepřemnožily a ani v roce 2014 nedosáhlo jejich množství v letních měsících kritických hodnot, může být více. Rozhodujícím faktorem byl jistě dostatek dostupných živin ve vodě. Protože sinice jsou schopny fixace atmosférického dusíku, nejsou jeho nedostatkem zvláště limitovány. Proto potřebují především fosfor. Z biologického hlediska je významná ta část rozpuštěného fosforu, která je rychle využitelná řasami. Pro vodní ekosystém je to okamžitě dostupná živina, jejíž zvýšené množství má za následek rychlý rozvoj vodní vegetace, v první fázi vedoucí k rychlému nárůstu planktonních sinic a řas. Autotrofní organismy jsou schopné asimilovat fosfor ve formě orthofosforečnanů. Koncentrace především dostupného fosfátu  $PO_4$  byly nízké, takže nemohly mít vliv na množení fytoplanktonu. Avšak koncem prázdnin roku 2014 se výrazně zvýšila jeho koncentrace, což mělo za následek rozvoj populací především sinic. Závažným důvodem mohla být i teplota vody, která ani v povrchových vrstvách nepřesáhla  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  a tím mohla ve sledovaných letech přibrzdit rozvoj populací fytoplanktonu. Avšak na rozdíl od předchozích let se v roce 2014 v podzimních měsících vodní těleso ochlazovalo pomaleji a teplota vody byla dlouho stabilní okolo  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . I tento jev mohl v září a říjnu 2014 přispět k rozvoji populací sinic. Bohužel nemáme k dispozici ucelená data z období, kdy došlo k výraznému vytvoření vodního květu, která bychom mohli porovnat se zatím získanými daty.

Rozborem vzorků v roce 2012 byla potvrzena přítomnost zelených řas, sinic, rozsivek a skrytěnek. Na začátku vegetačního období bylo přítomno mnoho druhů. Biodiverzita ale vždy klesá rozvojem vodního květu, v kterém ovládá většinu biotopu pouze několik druhů. V roce 2012 na Seči nedošlo tak k masivnímu rozvoji sinic, rozsivek a řas jako v předchozích letech. V odebraných vzorcích se stanovoval fluorimetricky celkový obsah chlorofylu a obsah sinicového chlorofylu. Naměřená data nám poskytla obraz o zastoupení sinic i řas ve fytoplanktonu. V roce 2013 se situace opakovala s tím rozdílem, že celkový počet jedinců ve vzorcích byl nižší a zastoupení sinic v odebraných vzorcích byl rovněž nižší. V roce 2013 to přičítáme především klimatickým poměrům i většímu rozvoji zooplanktonu (především nižších korýšů) v epilimniu, který je predátorem fytoplanktonu a částečně mohl omezit jeho rozvoj. V roce 2014 bylo naměřené množství celkového hladinového chlorofylu obdobné jako v roce 2013. Avšak obsah sinicového hladinového i hloubkového chlorofylu od konce srpna prudce vzrostl a do konce sledovaného období se udržel poměrně vysoký, zastoupení sinicového chlorofylu přesáhlo 80%. Toto se prokázalo i druhovou analýzou zastoupení jednotlivých skupin fytoplanktonu a nárůstem jejich počtů.

Potvrdilo se, že na rozvoj vodního květu má především vliv množství a přísun okamžitě využitelného fosforu ve formě rozpustného fosfátu ( $PO_4$ ) a velmi výrazný dopad mají klimatické podmínky v daném roce. Pokud se podaří omezit přísun fosforu z povodí výstavbou nových a modernizací starších čistíček odpadních vod v povodí horního toku řeky Chrudimky a nebudou na jaře a začátkem léta výrazně vysoké teploty vzduchu, které rychleji a více prohřejí vodní těleso a tím ovlivní rychlost množení fytoplanktonu, lze očekávat, že v daném roce nebude docházet k masovému rozvoji „vodního květu“.

On-line publikování naměřených dat k posouzení jakosti vody v nádrži Seč na veřejně přístupném informačním portálu Povodí Labe ([www.pla.cz/portal/jvn/cz/](http://www.pla.cz/portal/jvn/cz/)). Analýza naměřených dat umožňuje částečnou predikci rozvoje „vodního květu“, tj. možného přemnožení řas a sinic ve vodní nádrži Seč a tím zhoršení podmínek pro rekreační i vodárenské využití vodní nádrže Seč.

## LITERATURA

- /1/ Elliott JA (2012) Is the future blue-green? A review of the current model predictions of how climate change could affect pelagic freshwater cyanobacteria. *Water Research* 46: 1364-1371.
- /2/ Kalina T, Váňa J (2010) Sinice, řasy, houby, mechorosty, Univerzita Karlova v Praze, Nakl. Karolinum
- /3/ Navrátilová M (2008) Studium sezónních změn jakosti vody ve vírské nádrži, Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí.
- /4/ Paerl HW., NS. Hall, Calandrino ES., Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change, *Science of The Total Environment* 409, 2011, 1739-1745.
- /5/ Phillips GL (2005) Eutrophication of Shallow Temperate Lakes, in *The Lakes Handbook, Volume 2: Lake Restoration and Rehabilitation* by P.E. O'Sullivan, C.S. Reynolds, Blackwell Science Ltd., pp. 261-278.

## Poděkování

Uvedená práce vznikla za finanční podpory Akademie věd České republiky a Krajského úřadu Pardubice. Děkujeme laboratoři Povodí Labe za provedení analýz vodních a biologických vzorků v rámci vzájemné spolupráce.



## VÝZNAM POSTRANNÍCH KOŘENŮ V REAKCI KOŘENOVÉHO SYSTÉMU NA ABIOTICKÉ STRESOVÉ FAKTORY

### *IMPORTANCE OF LATERAL ROOTS IN ROOT SYSTEM RESPONSE TO ABIOTIC STRESS FACTORS*

Edita Tylová, Eva Pecková, Aleš Soukup

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra experimentální biologie rostlin, Viničná 5, 128 44 Praha 2, edmunz@natur.cuni.cz

#### *Summary*

Root apoplastic barriers (endodermis and exodermis) are key regulators of plant solute uptake (nutrient uptake, entrance of pollutants). In spite of this, we have limited data concerning differentiation of these barriers in tiny lateral roots. Laterals form the major part of root absorptive surface and their involvement in overall plant stress tolerance (towards e.g. drought, waterlogging, or salinity) seems obvious. The present study brings the first systematic insight into variation of barriers establishment in lateral roots in response to environmental conditions. It shows high plasticity in lateral root development and its importance in the maintenance of plant internal environment.

*Key words: root apoplastic barriers, exodermis, endodermis, Zea mays, lateral roots*

#### *Souhrn*

Apoplastické bariéry v kořenech (endodermis a exodermis) jsou klíčové pro regulaci vstupu látek do rostliny (příjem živin, vstup polutantů). Přesto o rozsahu jejich diferenciaci v jemných postranních kořenech existuje jen minimum informací. Postranní kořeny tvoří hlavní část absorpční plochy kořenového systému a lze předpokládat, že se zásadním způsobem podílí na odolnosti rostliny vůči abiotickým stresovým faktorům (sucho, zaplavení, salinita). Tato práce přináší první ucelený přehled variability diferenciaci bariér a ukazuje, že krátké postranní kořeny reagují dynamicky na okolní podmínky a zásadním způsobem se tak podílí na udržování vnitřního prostředí rostliny.

*Klíčová slova: apoplastické bariéry kořene, exodermis, endodermis, Zea mays, postranní kořeny*

## ÚVOD

Jemné postranní kořeny mají zásadní význam v komunikaci rostliny s okolním půdním prostředím. Jejich struktura, především utváření vnitřních apoplastických bariér, proto hraje významnou roli ve schopnosti rostliny využívat půdní zdroje i regulovat vstup látek, jež mohou negativně ovlivnit růst rostliny a jejichž akumulace v potravním řetězci je nežádoucí (např. těžké kovy a další polutanty). Apoplastické bariéry (endodermis a exodermis) díky specifickým modifikacím buněčných stěn (přítomnosti Casparyho proužků a suberinových lamel) zabraňují volnému pohybu látek prostorem buněčné stěny (apoplastem) a umožňují rostlině regulovat příjem látek díky selektivitě transportu přes membrány. Zatímco endodermis je obligátní struktura, bez které by fungování kořenů suchozemských rostlin nebylo možné, exodermis je spíše přídatná ochranná struktura. Najdeme ji ve vnější vrstvě primární kůry kořene u většiny krytosemenných rostlin a její utváření je výrazně stimulováno působením stresových faktorů, především salinitou, suchem, těžkými kovy nebo nedostatkem kyslíku v rhizosféře /2/. V této souvislosti zůstává otázkou nakolik jemné postranní kořeny dokáží reagovat na působení agronomicky významných stresových faktorů změnami v rozsahu utváření exodermis a endodermis, protože dosavadní práce

sledovaly téměř výlučně reakci silnějších primárních kořenů /2, 3, 4/. Systematická analýza postranních kořenů nebyla doposud provedena.

## MATERIÁL A METODA

Rostliny kukuřice seté kultivar Cefran byly pěstovány v hydroponii a v pevných substrátech za působení různých abiotických stresových faktorů. Hydroponie probíhala v kultivační místnosti (fotoperioda 16:8, termoperioda 22:18) v živném roztoku Hoagland 3 s přidavkem mikroprvků ( $\text{N} 250$ ;  $\text{P} 50$ ;  $\text{K} 200$ ;  $\text{Mg} 250$ ;  $\text{Ca}^{2+}$  254;  $\text{Ca}^{2+}$  1249;  $\text{K}^+$  1501;  $\text{Mg}^{2+}$  510;  $\text{SO}_4^{2-}$  510;  $\text{BO}_3^{3-}$  11.6;  $\text{Fe}^{2+}$  5.1;  $\text{Mn}^{2+}$  2.3;  $\text{Zn}^{2+}$  0.34;  $\text{Cu}^{2+}$  0.12;  $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{2-}$  0.015. Jednotlivé varianty kultivace zahrnovaly kontrolní variantu (provzdušňovaná hydroponie), vliv salinity (100mM NaCl), hypoxie (bez provzdušňování s přidavkem 0,01% agaru pro minimalizaci difúze kyslíku do roztoku) nebo kombinace hypoxie a toxicity (bez provzdušňování s přidavkem organických kyselin). Organické kyseliny vznikají při anaerobním rozkladu organické hmoty a podílejí se na poškození kořenů v zaplavené půdě /1/. Substrátové kultivace zahrnovaly zeminu, zaplavenou zeminu a směs písku s perlitem, kde lze předpokládat nižší vodní potenciál v okolí kořenů.

Růst a větvení primárního kořene byly sledovány u 14ti denních rostlin s pomocí analýzy obrazu (NIS Elements). Zároveň byl analyzován rozsah diferenciacie apoplastických bariér - endodermis a exodermis. Lignifikace a suberinizace byly detekovány histochemicky (berberin hemisulfát, genciánová violet, Sudan Red 7B) na řezech zhotovených pomocí ručního mikrotomu. Propustnost apoplastu povrchových vrstev kořene byla analyzována s pomocí testu permeability. Kořeny byly vystaveny pronikání kyseliny jodisté ( $\text{H}_5\text{IO}_6$ ) z vnějšího prostředí, chemická modifikace buněčných stěn způsobená kontaktem s kyselinou jodistou byla následně detekována s pomocí Schiffova roztoku /5, 6/. Anatomická stavba a propustnost apoplastu byla hodnocena u hlavní osy kořene a postranních kořenů prvního řádu lišících se svoji délkou i pozicí na mateřské ose kořene (obr. 1, schéma vlevo). Statistická analýza (GLM ANOVA) byla provedena programem NCSS 2000.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

Anatomická analýza prokázala vliv podmínek prostředí na utváření endodermální vrstvy. V hlavních kořenech byly detekovány delší Casparyho proužky při působení salinity (hydroponie s NaCl) a nízkého vodního potenciálu (kultivace v perlitu s pískem), což je v souladu s řadou předchozích prací /2, 3, 4/. Naopak v hypoxických podmínkách byly Casparyho proužky výrazně kratší, což zřejmě napomáhá transportu kyslíku mezi středním válcem a primární kůrou pro efektivnější provzdušňování vnitřních pletiv kořene (Graf 1A). V tenčích postranních kořenech byl vliv podmínek prostředí méně patrný (Graf 1B). Výraznější efekt byl pozorován pouze při působení toxicity kadmia (viz. Blascheová et al. ve stejném sborníku).

Utváření exodermis bylo podmínkami prostředí ovlivněno ještě znatelněji. V hlavních kořenech byla exodermis (Casparyho proužky i suberinové lamely) přítomna ve všech variantách kultivace (Tab. 1). V tenčích postranních kořenech byla diferencována v menším rozsahu, což bylo patrné zejména v hydroponii bez ohledu na působící stresový faktor (salinita, hypoxie nebo kombinace hypoxie s toxicitou organických kyselin; Tab. 1, Obr. 1A-F). V souladu s tím byla pozorována i větší propustnost apoplastu povrchových vrstev tenkých postranních kořenů, detekovaná pomocí průniku apoplastické sondy (kyselina jodisté) do pletiv kořene. V silnějších primárních kořenech kyselina jodistá zasáhla < 50% primární kůry kořene, v tenčích postranních kořenech 50-100%.

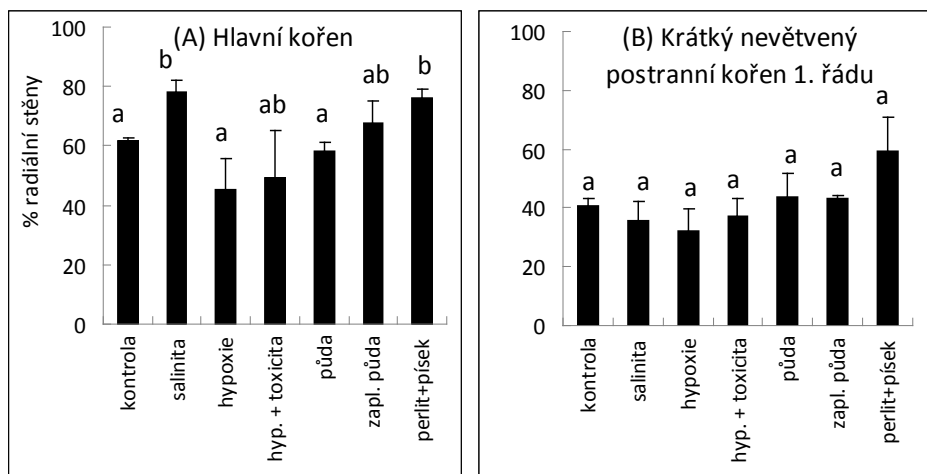
Naopak při kultivaci rostlin v substrátech (zemina, zaplavená zemina a směs písku s perlitem) měly postranní kořeny, včetně krátkých nevětvených PKk, diferencované Casparyho proužky v exodermální vrstvě (Tab. 1, Obr. 1A-F). Tyto výsledky jasně ukazují, že postranní kořeny za podmínek odpovídajících skutečnému půdnímu prostředí exodermis diferencují a dokáží plasticky reagovat na podmínky prostředí. Rostliny kultivované v pevných substrátech (především

zemina a směs písku s perlitem) také tvořily více postranních kořenů, včetně postranních kořenů vyšších řádů, oproti rostlinám v hydroponii. Výsledky této studie proto ukazují, že utváření vnitřní struktury postranních kořenů napomáhá optimalizovat vztah mezi větvením kořenového systému a jeho transportními vlastnostmi.

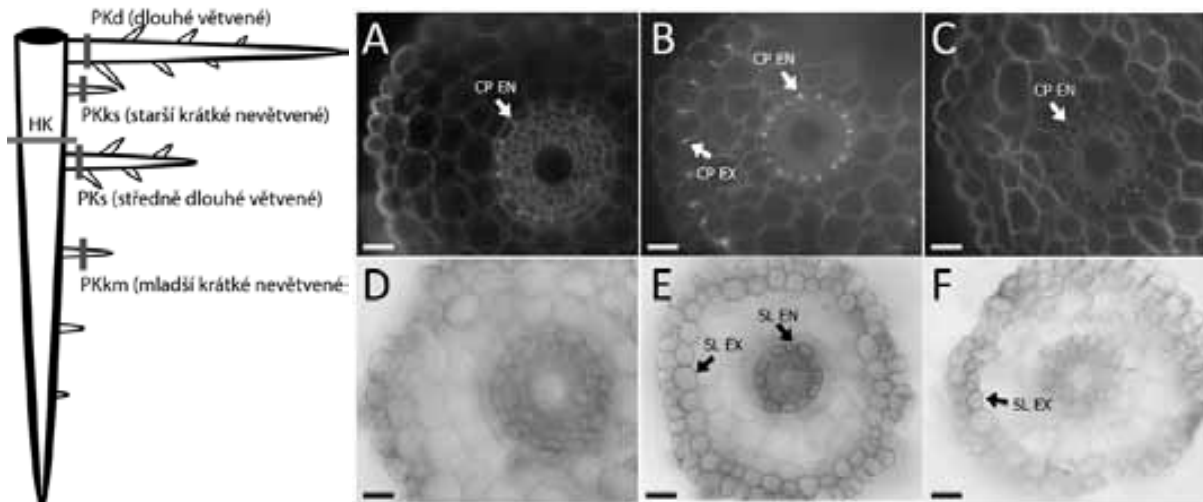
Tab.1: Rozsah utváření exodermis a endodermis v hlavním kořeni (HK) a postranních kořenech (PK) 1. řádu různé délky. PKd – dlouhé, PKs – střední, PKk – krátké mladší, PKks – krátké starší.

	HK					PK				
		PKd	PKs	PKk	PKks		PKd	PKs	PKk	PKks
	<b>Casparyho proužky v endodermis</b>					<b>Casparyho proužky v exodermis</b>				
<b>kontrola</b>	IV	IV	IV	IV	IV	IV	0-I	I	0	0-I
<b>salinita</b>	IV	IV	IV	IV	IV	III-IV	0-I	0	0	0-I
<b>hypoxie</b>	IV	IV	IV	IV	IV	0-I	0	0	0	0
<b>hyp. + toxicita</b>	IV	IV	IV	IV	IV	IV	0-I	0-I	I	0
<b>půda</b>	IV	IV	IV	IV	IV	IV	II-III	II-III	II-III	I-II
<b>zaplavená půda</b>	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	II-III	II-III	II-III
<b>perlit+písek</b>	IV	IV	IV	IV	IV	III-IV	IV	III-IV	III-IV	III-IV
	<b>Suberinové lamely v endodermis</b>					<b>Suberinové lamely v exodermis</b>				
<b>kontrola</b>	III-IV	III-IV	II-III	0-I	I-II	III-IV	II-III	I-II	0	I-II
<b>salinita</b>	IV	III-IV	II-III	0-I	I	III-IV	I-II	0-I	0	I-II
<b>hypoxie</b>	III-IV	II-III	III-IV	0-I	0-I	III-IV	II	II-III	0-I	I-II
<b>hyp. + toxicita</b>	IV	II-III	I-II	0-I	0-I	IV	II	II-III	I-II	0-I
<b>půda</b>	IV	III-IV	II-III	0-I	0-I	III	I-II	I	II	I-II
<b>zaplavená půda</b>	IV	III-IV	0-I	0-I	I-II	IV	III-IV	0	I-II	II-III
<b>perlit+písek</b>	IV	IV	IV	III-IV	III	IV	IV	III-IV	III-IV	III-IV

Vyjádřeno v procentech výskytu buněk s diferencovanými Casparyho proužky nebo suberinovými lamelami v exodermální nebo endodermální vrstvě v jednotlivých variantách: 0 (0%); I (<20%); II (±50%); III (> 90%); IV (100%).



Graf 1: Délky endodermálních Casparyho proužků v různých podmínkách kultivace. Vyjádřeno v % radiální stěny endodermální buňky. Průměr (n = 3) ± SE; různá písmena označují statisticky významné rozdíly (p < 0.05; GLM ANOVA, Bonferroni test).



Obrázek 1: Lokalizace anatomických řezů pro srovnání struktury hlavního (HK) a postranních kořenů (PK) různé délky a pozice (schéma vlevo). Rozsah utváření exodermis a endodermis v krátkých (cca 2 cm) postranních kořenech 1. řádu v provzdušňované hydroponii (A, D), ve směsi perlitu s pískem (B, E) a v hypoxické hydroponii (C, F). Detekce Casparého proužků (A, B, C) a suberinových lamel (D, E, F). CP EX a CP EN – exodermální a endodermální Casparého proužky, SL EX a SL EN – exoderm. a endoderm. suberinové lamely. Měřítko = 1 $\mu$ m.

## LITERATURA

- /1/ Armstrong J, Armstrong W.: Rice and Phragmites: effects of organic acids on growth, root permeability, and radial oxygen loss to the rhizosphere. *American Journal of Botany* 88, 2001: 1359-1370.
- /2/ Enstone DE, Peterson CA, Ma F.: Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation* 21, 2003: 335-351.
- /3/ Karahara I, Ikeda A, Kondo T, Uetake Y.: Development of the Casparian strip in primary roots of maize under salt stress. *Planta* 219, 2004: 41-47.
- /4/ Meyer CJ, Seago JL, Jr., Peterson CA.: Environmental effects on the maturation of the endodermis and multiseriate exodermis of *Iris germanica* roots. *Annals of Botany* 103, 2009: 687-702.
- /5/ Pearse A. *Histochemistry (theoretical and applied)*. London, UK: J. A. Churchill Ltd. 1968.
- /6/ Soukup A, Votrubová O, Čížková H.: Development of anatomical structure of roots of *Phragmites australis*. *New Phytologist* 153, 2002: 277-287.

## Poděkování

Uvedená práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky - projekt LO1417 a projektu COST LD 11017.

## KVANTITATIVNÍ ANALÝZA PROTEOMU PLODIN VYSTAVENÝCH ABIOTICKÝM STRESŮM

### QUANTITATIVE PROTEOME ANALYSIS OF CROPS GROWN UNDER ABIOTIC STRESSES

Pavel Vítámvás, Klára Kosová, Ilja Tom Prášil

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Biologie stresu a biotechnologie ve šlechtění, Drnovská 507/73,  
161 06 Praha 6 – Ruzyně, vitamvas@vurv.cz

#### Summary

Abiotic stresses significantly reduce agricultural production of crops. Plant stress acclimation is a complex process accompanied by profound changes in the expression of multiple genes resulting in the de novo biosynthesis of several stress-protective compounds (e.g., stress-regulated proteins such as dehydrins) and an enhancement of the acquired FT level. Thus, the detailed proteome study is essential for understanding of winter barley reaction on cold. In this short review, the comparison and discussion of our proteome results on plant under stress conditions are provided.

*Key words: proteome, wheat, barley, cold, drought*

#### Souhrn

Abiotické stresy významně redukují zemědělskou produkci plodin. Aklimace rostlin na stres je komplexní proces spojený s expresí mnoha genů, jejímž výsledkem je biosyntéza protektivních látek vůči stresu (např. stresem regulované proteiny, jako jsou dehydriny) a tím zvýšení odolnosti rostlin vůči danému stresu. Proto se v tomto krátkém přehledovém článku zaměříme na srovnání a diskuzi našich dosažených výsledků provedených na stresovaných rostlinách.

*Klíčová slova: proteom, pšenice, ječmen, chlad, sucho*

#### ÚVOD

Proteomických studií publikovaných v impaktovaných časopisech provedených na rostlinách je cca třikrát méně (kolem 2600), než je tomu jen u lidských tkání (8400; WoS 11. 5. 2015). Transkriptomických studií provedených na rostlinách je cca dvakrát víc (4400), než proteomických, což je pravděpodobně důsledkem náročnosti proteomických technik na kvalitu a zkušenosti výzkumného týmu, než je tomu u transkriptomických studií (zvláště u technik založených na analýzách proteomů rozdělených na polyakrylamidových gelech). Proteiny představují funkční molekuly (stresové proteiny, chaperony, enzymy, atd.), které přímo ovlivňují stav a kondici rostliny. Odhad výsledné proteinové koncentrace ve vzorku pomocí transkriptů kódujících genů může být navíc dost nepřesný v důsledku posttranskripční a postranlační regulace či degradace proteinů viz /1/.

#### PROTEOMICKÉ TECHNIKY

Základní metody umožňující výzkum proteinů jsou hybridizační techniky využívající protilátky (W-bloty, proteinové čipy), elektroforetické techniky (SDS-polyakrylamidové gely-jednoduché i dvourozměrné, tj. SDS-PAGE a 2DE) a hmotnostní spektrometrie (MALDI, ESI) umožňující identifikaci proteinů. Pro kvantitativní výzkum proteinových vzorků se využívá hlavně identifikace tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) proteinů vyřezaných z 2DE gelů (gel-based proteomika), nebo se tyto vzorky dají analyzovat bez elektroforetického mezikroku (gel-free proteomika). 2D-DIGE (Difference in gel electrophoresis) technika je pravděpodobně zatím

nejpřesnější kvantitativní gel-based metoda, kdy je možné díky fluorescenčním barvičkám (CyDye2, 3, 5) rozdělit až tři vzorky na jednom SDS-PAGE gelu (viz /2/). Obdobně i iTRAQ (Isobaric tags for relative and absolute quantitation) díky navázaným značkám patří mezi poměrně robustní gel-free kvantitativní metody. Ovšem, když se obě metody použily na jeden vzorek, tak výsledky ukázaly, že nelze pro slabý průnik (cca 10-15 %) získaných výsledků nahradit jednu metodu druhou /3, 4/. Proto kombinace obou technik by byla ideální pro výzkum daného proteomu, jenže kvůli finanční i časové nákladnosti takového přístupu jsou téměř výhradně dosud publikované výstupy proteomických studií získané jen jednou proteomickou technikou. Kvůli nižší technické náročnosti a lepšímu přístupu k modernějším přístrojům hmotnostní spektrometrie se začínají výrazněji prosazovat gel-free techniky, ale gel-based techniky zůstávají nenahraditelné pro výzkum různých izoform proteinů, které lze snadno vizualizovat na proteinové mapě 2-DE gelů.

Hybridizační metody se výrazně uplatňují u výzkumu specifických proteinů, jako jsou např. dehydriny, které patří mezi stresem regulované proteiny /5/.

## PROTEOMIKA ABIOTICKÉHO STRESU PLODIN

Většina proteomických studií zabývajících se abiotickými stresy byla provedena nejen na modelových rostlinách jako je huseníček a rýže, ale i na významných plodinách mírného pásu jako je pšenice, ječmen, kukuřice, brambory, sója, u nichž je známá genetická sekvence (viz /1/). Ovšem i u dalších plodin byly studovány reakce na abiotické stresory proteomickými technikami. Jde například o tvrdou pšenici /6/, cukrovou řepu /7/, řepku/8/, rajče /9/, vodní meloun /10/ (více v přehledovém článku /11/). Ve zmíněných pracích se sledovala odpověď rostlin na různé abiotické stresy, jako jsou chlad, mráz, horko, sucho, zaplavení, osmotický stres (PEG), zasolení, nerovnováha v minerální výživě, či stres těžkými kovy. Obecně se během stresu syntetizovaly stresové proteiny, jako jsou dehydriny, GST (glutathion-S-transferáza), PR proteiny (patogen-related), HSP (heat-shock) proteiny, proteiny zabírající tvorbu volných radikálů (peroxidázy) a proteiny účastnící se degradace poškozených proteinů (proteázomové podjednotky) či tvorby proteinů (ribosomální proteiny). Byla pozorována regulace enzymů regulačních (RNA a DNA) a signálních drah (14-3-3 proteiny, glycine-rich protein), sacharidového metabolismu (sacharózy syntáza), respirace (malát dehydrogenáza), fotosyntézy (OEE), atd. Naše výsledky z kvantitativních proteomických pokusů (2D-DIGE) prováděných v VÚRV, v.v.i. byly ve shodě s ostatními publikovanými výsledky, ovšem našli jsme také nové poznatky. Studiem proteomické odezvy různých orgánů ječmene na chlad /12/ jsme zjistili, že pro komplexní analýzu proteomu je s výhodou použít nefotosyntetizující pletivo odnožovacího uzle, kde bylo možno kvantifikovat výrazně více proteinových skvrn (cca 700) než tomu bylo u listů (cca 600) a s výsledným výraznějším poměrem rozdílně akumulovaných proteinových skvrn (90 vs 63), pravděpodobně kvůli abundantnímu proteinu Rubisco v listech. Díky 2D-DIGE metodě jsme byli schopni rozlišit proteom reciproční substituční linie chromozómů 5A a 5B chladem otužených ozimých pšenic Mironovské 808 a Bezosté 1 a tak navrhnout možné proteinové markery mrazuvzdornosti (např. malát dehydrogenáza, /13/), které by mohly po ověření zpřesnit proteinovou analýzu mrazuvzdornosti, která se zatím provádí jen pomocí akumulace dehydrinů /5/. Při srovnání jarní a ozimé pšenice /14/ byla rozpoznána a definována represe regulace vývoje u otuženého ozimu na proteinové, fytohormonální i fyziologické úrovni. U ječmene vystaveného různým hladinám sucha byly zase pozorovány specifické stresové reakce oproti chladem otuženému ječmenu či pšenici, kdy byl sledován pokles CSP1 (cold-shock protein 1) a HSP70 a zvýšení hladiny HSP90 u sucha a opačný trend u chladem otužených rostlin/15/. Navíc ze srovnání kvantitativních změn v proteomu bylo možné odlišit a definovat i hladinu sucha, kdy docházelo k vyššímu poškození daných rostlin a zároveň definovat možné proteinové indikátory suchovzdornosti ječmene (např. glutathion peroxidáza).

Díky proteomickým technikám lze tedy kvantitativně zmapovat rozdíly v proteomu různě stresovaných rostlin. Výsledky mohou po ověření na širším výběru genotypů plodiny sloužit pro proteinové fenotypování odolnosti a tak zefektivnit případnou selekci genotypů při šlechtění.

#### LITERATURA

- /1/ Kosova, K., Vítámvás, P., Prášil, I.T., Renaut, J.: Plant proteome changes under abiotic stress - Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*, 74, 2011: 1301-1322
- /2/ Vítámvás, P., Kosová, K., Škodáček, Z., Prášil, I.T.: The Method of Two-Dimensional Differential Gel Electrophoresis and Its Application in Proteomics. *Chemické listy*, 104, 2010: 371-676
- /3/ Alvarez, S., Berla, B.M., Sheffield, J., Cahoon, R.E., Jez, J.M., Hicks, L.M.: Comprehensive analysis of the Brassica juncea root proteome in response to cadmium exposure by complementary proteomic approaches. *Proteomics*, 9, 2009: 2419-2431
- /4/ Nanjo, Y., Nouri, M.Z., Komatsu, S.: Quantitative proteomic analyses of crop seedlings subjected to stress conditions; a commentary. *Phytochemistry*, 72, 2011: 1263-1272
- /5/ Vítámvás, P., Saalbach, G., Prášil, I.T., Čapková, V., Opatrná, J., Ahmed, J.: WCS120 protein family and proteins soluble upon boiling in cold-acclimated winter wheat. *Journal of Plant Physiology*, 164, 2007: 1197-1207
- /6/ Caruso, G., Cavaliere, C., Foglia, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., Lagana, A.: Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Plant Science*, 177, 2009: 570-576
- /7/ Hajheidari, M., Abdollahian-Noghabi, M., Askari, H., Heidari, M., Sadeghian, S.Y., Ober, E.S., Salekdeh, G.H.: Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics*, 5, 2005: 950-960
- /8/ Bandehagh, A., Salekdeh, G.H., Toorchi, M., Mohammadi, A., Komatsu, S.: Comparative proteomic analysis of canola leaves under salinity stress. *Proteomics*, 4, 2004: 709-719
- /9/ Manaa, A., Ben Ahmed, H., Valot, B., Bouchet, J.P., Aschi-Smiti, S., Causse, M., Faurobert, M.: Salt and genotype impact on plant physiology and root proteome variations in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 62, 2011: 2797-2813
- /10/ Kawasaki, S., Miyake, C., Kohchi, T., Fujii, S., Uchida, M., Yokota, A.: Responses of wild watermelon to drought stress: accumulation of an ArgE homologue and citrulline in leaves during water deficits. *Plant Cell Physiology*, 41, 2000: 864-873
- /11/ Kosová, K., Vítámvás, P., Urban, M.O., Klíma, M., Prášil, I.T.: Biological networks underlying abiotic stress tolerance in temperate crops - a proteomic perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, v recenzním řízení
- /12/ Hlaváčková, I., Vítámvás, P., Šantrůček, J., Kosová, K., Zelenková, S., Prášil, I.T., Ovesná, J., Hynek, R., Kodíček, M.: Proteins involved in distinct phases of cold hardening process in frost resistant winter barley (*Hordeum vulgare* L.) cv Luxor. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 2013: 8000-8024
- /13/ Vítámvás, P., Prášil, I.T., Kosová, K., Planchon, S., Renaut, J.: Analysis of proteome and frost tolerance in chromosome 5A and 5B reciprocal substitution lines between two winter wheats during long-term cold acclimation. *Proteomics*, 12, 2012: 68-85
- /14/ Kosová, K., Vítámvás, P., Planchon, S., Renaut, J., Prášil, I.T.: Proteome analysis of cold response in spring and winter wheat (*Triticum aestivum*) crowns reveals similarities in stress adaptation and differences in regulatory processes between the growth habits. *Journal of Proteome Research*, 12, 2013: 4830-4845
- /15/ Vítámvás, P., Urban, M.O., Škodáček, Z., Kosová, K., Pitelková, I., Vítámvás, J., Renaut, J., Prášil, I.T.: Quantitative analysis of proteome extracted from barley crowns grown under different drought conditions. *Frontiers in Plant Science*, 2015, v recenzním řízení

#### Poděkování

Uvedená práce vznikla díky projektům MZE ČR (RO0415, QJ1310055) a MŠMT ČR (LD14064 and LD14087, které jsou součástí mezinárodní COST akcí FA 1204 a FA1208).

## OBSAH ZINKU V ASIMILAČNÝCH ORGÁNOCH RASTLÍN V PODMIENKACH ZNEČISTENÉHO PROSTREDIA

### ZINC CONTENT IN ASSIMILATORY ORGANS OF PLANT SPECIES IN CONDITIONS OF ENVIRONMENTAL POLLUTION

Margita Kuklová<sup>1</sup>, Ján Kukla<sup>1</sup>, Katarína Gašová<sup>1</sup>, Helena Hniličková<sup>2</sup>, František Hnilička<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ústav ekológie lesa SAV, L. Štúra 2, 960 53 Zvolen, Slovenská republika, kuklova@savzv.sk

<sup>2</sup> Česká zemědělská univerzita v Praze, Katedra botaniky a fyziologie rostlin, Kamýčká 129, 165 21 Praha 6  
– Suchdol, Česká republika

#### Summary

The paper presents the results of zinc contents in soil samples and assimilatory organs of plants (*Fagus sylvatica*, *Dryopteris filix-mas*, *Vaccinium myrtillus*, *Rubus idaeus*) in forest type group *Abieti-Fageta inferiora* and *Fageta abietino-piceosa* on plots in buffer zone of Slovenský raj National Park. Zinc content in A-horizons of soils decreased from lower 5<sup>th</sup> fir-beech to 6<sup>th</sup> spruce-beech-fir forest vegetation zone. Statistical evaluation of results showed a high degree of linear dependence between the Zn content in soils and altitudinal vegetation zones ( $P < 0.05$ ). In the case of plants, approximately 22 %, respectively 34 % higher zinc content than the literature level showed only *Senecio ovatus* species growing in 5<sup>th</sup> fir-beech and *Rubus idaeus* in 6<sup>th</sup> spruce-beech-fir zone. The results showed that among the Zn content of assimilatory organs and zinc content in A-horizons of soils was confirmed statistically insignificant linear relationship.

*Key words:* forest ecosystems, imissions, zinc content

#### Súhrn

V práci sú uvedené výsledky obsahov zinku v pôdnych vzorkách a asimilačných orgánoch rastlín (*Fagus sylvatica*, *Dryopteris filix-mas*, *Vaccinium myrtillus*, *Rubus idaeus*) v skupine lesných typov *Abieti-Fageta inferiora* a *Fageta abietino-piceosa* na plochách v ochrannom pásme NP Slovenský raj. Obsah zinku v A-horizontoch pôd klesal od nižšieho 5. jedľovo-bukového po 6. smrekovo-bukovo-jedľový lesný vegetačný stupeň (lvs). Štatistické hodnotenie výsledkov ukázalo veľkú mieru lineárnej závislosti medzi obsahom Zn v pôdach a lvs ( $P < 0,05$ ). V prípade rastlín približne o 22 %, resp. 34 % vyššie obsahy Zn ako je požadovaná hodnota ukázal len druh *Senecio ovatus* rastúci v 5. lvs a *Rubus idaeus* v 6. lvs. Medzi obsahom zinku v sušine asimilačných orgánov rastlín a obsahom zinku v A-horizontoch pôd sa potvrdila štatisticky nevýznamná lineárna závislosť medzi hodnotenými premennými.

*Kľúčové slová:* lesné ekosystémy, imisie, obsah zinku

## ÚVOD

Zinok, ako esenciálny rastlinný mikroelement pri vyšších koncentráciách pôsobí negatívne na metabolické procesy a môže spôsobiť pokles produkcie fytohmoty a poškodenie asimilačných orgánov rastlín. Vo forme rozpustných organických komplexov je tento element ľahko prístupný pre rastliny [1]. Príjem Zn rastlinou závisí vo vysokej miere od pH pôdy. Zinok je často naviazaný na organickú hmotu, preto jeho prítomnosť v pôde závisí hlavne od fyzikálnych a chemických procesov v pôde. Medzi antropogénne zdroje zinku patria najmä emisie z priemyslu, aplikácie kalov a agrochemikálií.

Výskum bol vykonávaný vo fytoocenózach v ochrannom pásme NP Slovenský raj (Západné Karpaty). Dopad antropogénnych imisií na lesné ekosystémy je stále aktuálnym problémom vo



vztahu k znečisteniu prostredia. Prevádzkovatelia priemyselnej činnosti v katastri mesta Spišská Nová Ves patria medzi 100 najväčších zdrojov znečisťovania ovzdušia na Slovensku (<http://www.air.sk/>). V práci sme sa preto zamerali na posúdenie obsahu zinku v pôdach a rastlinách v skupine lesných typov *Abieti-Fageta inferiora* a *Fageta abietino-piceosa* na plochách zasiahnutých znečistením ovzdušia.

## MATERIÁL A METÓDA

Výskum lesných geobiocenóz sa vykonával v rokoch 2012–2013 prostredníctvom metód geobiocenologickej školy /2/. Ekologické charakteristiky skúmaných ekosystémov sú uvedené v Tab. 1. Hemioligotrofné geobiocenózy G1 až G4 sú súčasťou 5. jedľovo-bukového lesného vegetačného stupňa (lvs) a skupiny typov geobiocenov (stg) *Abieti-Fageta inferiora*, geobiocenózy G5 a G6 patria do 6. smrekovo-bukovo-jedľového lvs a stg *Fageta abietino-piceosa*.

Orografický celok	Slovenský raj (oblasť západokarpatskej flóry)					
Monitorovacia plocha	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Lesný vegetačný stupeň	5. jedľovo-bukový			6. smrekovo-bukovo-jedľový		
Nadm. výška [m]	750	760	960	950	1100	1110
Vek porastu	10–15	80–100	10–15	80–100	10–15	80–100
Pôdny subtyp	kambizem podzolová			podzol rankrový		
pH <sub>H2O</sub> (0–5 cm)	4,8	4,5	4,0	4,8	3,4	

Reprezentatívne vzorky pôd sa odobrali z minerálnych vrstiev 0–10 cm, vysušili sa na vzduchu a preosali cez sito s veľkosťou otvorov 2 x 2 mm. Vo vzorkách pôd sa celkový obsah Zn stanovil metódou AAS-FAAS na prístroji Thermo Scientific iCE 3000 series.

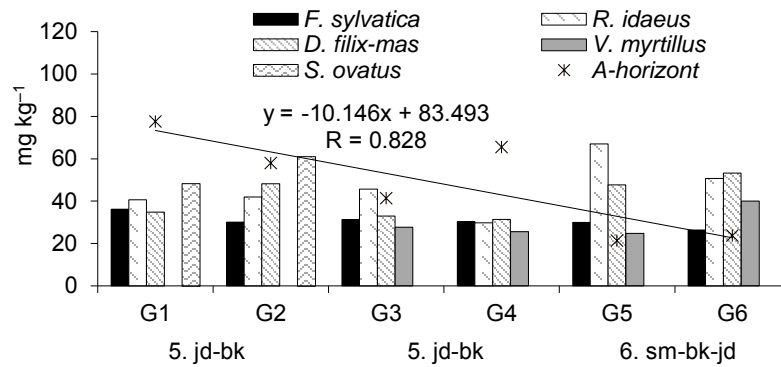
Vzorky asimilačných orgánov rastlín (*Fagus sylvatica* L., *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott, *Vaccinium myrtillus* L., *Rubus idaeus* L.) boli vysušené pri 80 °C počas 48 hodín a zhomogenizované achátovým mlynom firmy Fritsch GmbH (Planetary – Micro Mill „pulverisette 7“) pod hodnotu 0,001 mm. Následne boli zmineralizované za pomoci koncentrovanej HNO<sub>3</sub> v mikrovlhnej piecke Uni Clever (Plasmatronika, Poľsko). V zmineralizovaných rastlinných vzorkách sa celkový obsah Zn stanovil metódou AAS-FAAS za pomoci prístroja Thermo Scientific iCE 3000 series.

Významnosť rozdielov v obsahoch Zn v asimilačných orgánoch rastlín sa vyhodnotila pomocou ANOVA a Fischer LSD-testom. Korelačné vzťahy medzi obsahom Zn vo fytomase rastlín a obsahom Zn v pôdach boli hodnotené pomocou lineárnej regresnej analýzy (Statistica 9 software, Tulsa, USA).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z výsledkov je zrejmé, že obsah zinku v organo-minerálnej pôde (0–10 cm) klesal od nižšieho 5. jedľovo-bukového (jd-bk) po 6. smrekovo-bukovo-jedľový (sm-bk-jd) lesný vegetačný stupeň (lvs). Štatistické hodnotenie výsledkov ukázalo veľkú mieru lineárnej závislosti medzi obsahom Zn v pôdach a lvs ( $P < 0,05$ ), Obr. 1. Najnižšiu hodnotu Zn mal podzol rankrový (21,4 mg kg<sup>-1</sup>), najvyššiu kambizem podzolová (77,7 mg kg<sup>-1</sup>) v 5. lvs. V asimilačných orgánoch rastlín sa zistil súčasne najvyšší (*R. idaeus*: 67 mg kg<sup>-1</sup>), ale aj najnižší (*V. myrtillus*: 24,8 mg kg<sup>-1</sup>) obsah Zn na ploche G5 v 6. sm-bk-jd lvs, Obr. 1.

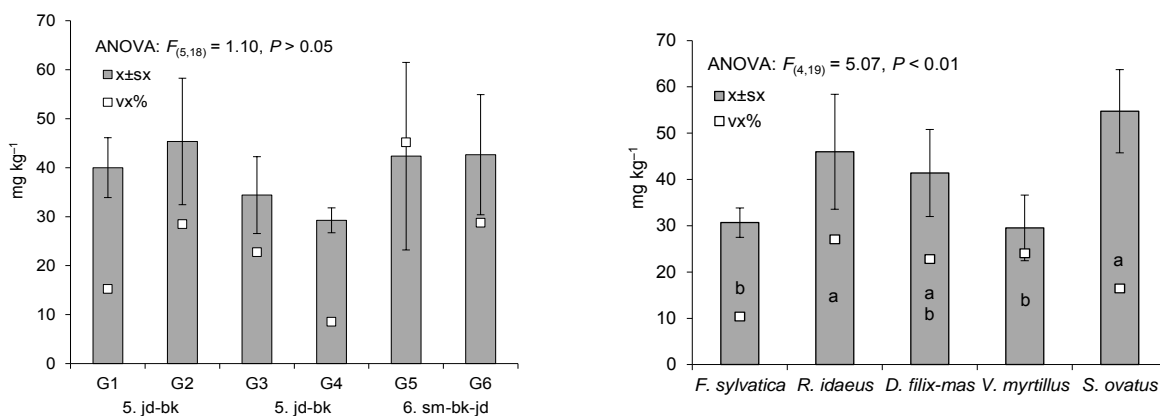
Najvyššiu, ale súčasne aj najnižšiu priemernú hodnotu Zn ukázali druhy rastúce na plochách G2, resp. G4 v 5. lvs (29 až 45 mg Zn kg<sup>-1</sup>), Obr. 2. Celkovo vyššie priemerné obsahy Zn naznačili aj druhy rastúce v 6. lvs v podzole rankrovom. Obsahy Zn v sušine rastlín boli viac vyrovnané na plochách 5. lvs (vx: 8,6 až 28 %), rokolísanejšie boli namerané hodnoty na plochách 6. lvs (vx: 29 až 45 %).



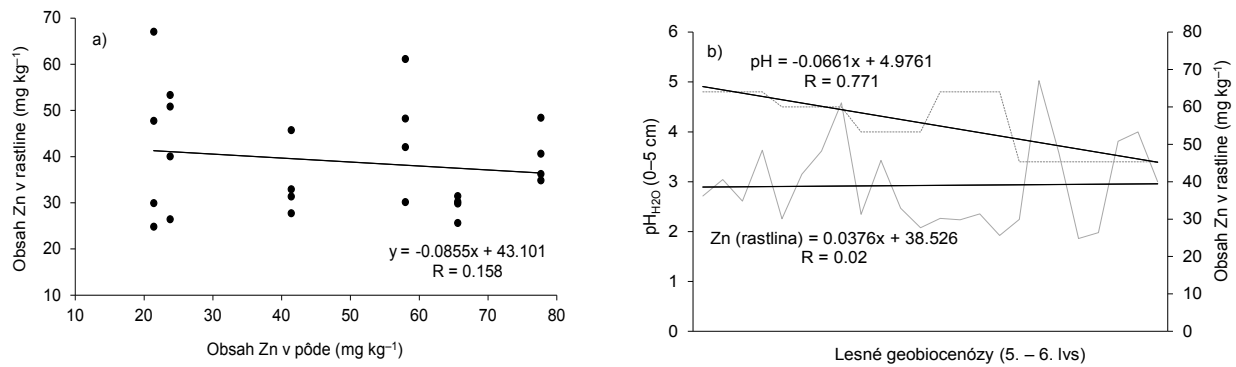
Obr. 1: Variabilita obsahu zinku v A-horizontoch pôd a asimilačných orgánoch rastlín vo vzťahu k lesným vegetačným stupňom (jedľovo-bukovému, smrekovo-bukovo-jedľovému).

Z asimilačných orgánov rastlín najvyššia priemerná hodnota zinku sa zistila v sušine druhu *Senecio ovatus*, nižšie hodnoty ukázali výhonky čučoriedky a listy buka, Obr. 2. Obsah Zn bol vyrovnanejší v listoch buka (vx: 10 %), viac varíroval obsah Zn (vx: od 16 do 27 %) v zvyšných druhoch rastlín. Výsledky analýzy variácie ukázali signifikantné rozdiely v obsahoch Zn medzi porovnávanými druhmi rastlín, pričom druhy s najvyšším obsahom zinku (*Senecio ovatus*, *Rubus idaeus*) sa významne líšili od ostatných druhov. Závislosť obsahu zinku v sušine asimilačných orgánov rastlín od obsahu zinku v A-horizontoch pôd je uvedená na Obr. 3a. Zistila sa štatisticky nevýznamná lineárna závislosť medzi hodnotenými premennými ( $P > 0,05$ ).

Prijateľnosť zinku rastlinami závisí najmä od pôdnej reakcie. Čím je pôda kyslejšia, tým viac je zinok mobilný, a tým viac je prístupný pre rastliny (Obr. 3b). Podľa /3/ zinok pri hodnote pH nižšej ako 5,5 disponuje maximálnou mobilitou v pôdnom prostredí. Na druhej strane, nedostatok Zn môže výrazne spomaliť rast rastlín (zakrpatenie orgánov a defekty chlorofylu). Celkovo sme na skúmaných plochách nezaznamenali prekročenie priemernej požadovanej hodnoty zinku v pôdach a rastlinách. Obsahy Zn v pôdach sa nachádzali pod dolnou limitnou hodnotou, ktorú uvádza príloha zákona 220/2004. V prípade rastlín, približne o 22 %, resp. 34 % vyššie obsahy Zn ako je požadovaná hodnota, ukázal len druh *Senecio ovatus* rastúci v 5. lvs a *Rubus idaeus* v 6. lvs.



Obr. 2: Priemerný obsah zinku v sušine asimilačných orgánoch rastlín v študovaných ekosystémoch (aritmetický priemer±smerodajná odchýlka; variačný koeficient; nevýznamné rozdiely pre hodnoty s rovnakými písmenami).



Obr. 3: Závislosť obsahu zinku v sušine asimilačných orgánov rastlín od obsahu zinku v A-horizontoch pôd (a). Variabilita  $pH_{H_2O}$  (y1) a obsahu zinku v rastlinách (y2) vo vzťahu k lesným vegetačným stupňom (b).

### LITERATÚRA

- /1/ Makovníková, J., Barančíková, G., Dlapa, P., Dercová, K.: Anorganické kontaminanty v pôdnom ekosystéme. Chemické listy, 100, 2006: 424–432.
- /2/ Zlatník, A. Lesnická fytoecologie. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1976, 495 p.
- /3/ Barančíková, G.: Návrh účelovej kategorizácie pôd SR z hľadiska citlivosti k znečisteniu ťažkými kovmi. Rostlinná výroba, 44, 3, 1998: 117–122.

### Pod'akovanie

Táto práca bola podporovaná Vedeckou grantovou agentúrou MŠ SR a SAV (projekt č. 2/0027/13).

**EFEKTY NANOPONOŽEK S OBSAHEM STRÍBRA NA VODNÍ ROSTLINY*****EFFECTS OF NANOSOCKS CONTAINING SILVER ON AQUATIC PLANTS***

Klára Kobetičová, Nikola Salová

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta technologie ochrany prostředí, Ústav chemie ochrany prostředí, Technická 5, 166 28 Praha 6, Klara.Kobeticova@vscht.cz

***Summary***

Materials containing nanoparticles are widely available in many products (in different types of food and beverages, cosmetics, medicines, in clothes, etc.). The most frequently used nanoparticles in consumer products are silver particles, which are added to various textiles. Information on the ecotoxicity of products containing nanosilver are but lacking. In this study were therefore tested socks containing silver from selected manufacturers. Socks were repeatedly leached and leachates were subsequently tested for freshwater algae (*Desmodesmus subspicatus*) and duckweed (*Lemna minor*). In both tests, the growth rate was evaluated for duckweed moreover also the amount of chlorophyll. The results suggest that the negative effect of the extracts decreased with repetition leaching (Anova, Tukey-Kramer Test;  $p < 0,001^{***}$  until  $p > 0,005$ ) and does not cause negative effects of nanosilver, but detergents, which were treated with socks.

*Key words: nanosilver, ecotoxicity, nanosocks, Lemna minor, Desmodesmus subspicatus*

***Souhrn***

Materiály obsahující nanočástice jsou běžně k dostání v mnoha produktech (v různých druzích nápojů a potravin, v kosmetice, lécích, v oblečení). Mezi nejčastěji používané nanočástice ve spotřebním průmyslu patří částice stříbra, která se přidávají do různých textilií. Informací o ekotoxicitě výrobků s obsahem nanostříbra je ale nedostatek. V této studii byly proto testovány nanoponožky s obsahem stříbra od vybraných výrobců. Ponožky byly opakovaně vyluhovány a výluhy byly postupně testovány na sladkovodních řasách (*Desmodesmus subspicatus*) a na okřehku (*Lemna minor*). V obou testech byla hodnocena růstová rychlost, u okřehku navíc také množství chlorofylu. Výsledky naznačují, že negativní účinek výluhů se snižoval s opakováním vyluhování (Anova, Tukey-Kramer Test;  $p < 0,001^{***}$  až  $p > 0,005$ ) a negativní efekty nezpůsobovalo nanostříbro, ale detergenty, kterými byly ponožky ošetřeny.

*Klíčová slova: nanostříbro, ekotoxicita, nanoponožky, Lemna minor, Desmodesmus subspicatus*

**ÚVOD**

V posledních letech je věnována veliká pozornost nanočásticím a nanomateriálům a jejich aplikaci ve spotřebitelském průmyslu. Mezi nejčastěji používané nanočástice patří oxidy zinku, titanu a částice stříbra, které se přidává do pracích prášků a do různých textilií díky jeho antimikrobiálním účinkům. V budoucnosti proto hrozí jejich hromadění v odpadních i povrchových vodách. Účinky stříbra na živé organismy jsou popsány, neví se ale příliš o jeho možném uvolňování do životního prostředí z textilních vláken a o jeho následnému potenciálnímu účinku na akvatické organismy. Z těchto důvodů jsme se rozhodly provést testy fytoxicity, abychom zjistily, zda se nanostříbro může z ponožek uvolňovat a pokud ano, tak jestli jeho přítomnost může mít vliv na vodní rostliny, jako jsou sladkovodní řasy a makrofyta.

## MATERIÁL A METODA

Testy ekotoxicity byly provedeny s nanoponožkami od tří různých výrobců (V1, V2, V3). Ze všech ponožek byl připraven výluh (24 hodin). Do výluhu byly přidány živiny, potřebné pro růst řas či okřehku. Testován byl 100% výluh.

V testech toxicity byl použit druh sladkovodní řasy *Desmodesmus subspicatus* (BÚ AV, Třeboň, ČR) a druh okřehku *Lemna minor* (Federal Environmental Agency, Berlín, Německo). Oba testy probíhaly podle příslušných norem /1, 2/.

Postup - řasy: do připraveného výluhu byla přidána suspenze řas odpovídající množství 10 000 buněk/ml. Test probíhal v erlenmayerových baňkách po dobu 72 hodin v termostatu za permanentního třepání a osvětlení (6 000 Lux). Počet řasových buněk byl na začátku, v průběhu i na konci testu počítán pod mikroskopem v počítačící komůrce Cyrrus II.

Postup - okřehek: pro test byly použity skleněné kádinky o výšce 150 ml a průměru 6,5 cm. Do nich bylo odměřeno po 100 ml výluhu a do testovaných roztoků bylo přemístěno tolik jedinců okřehku, aby v každé kádince bylo nasazeno 12 stélek (lístků). Kádinky s okřehkem byly každých 24 hodin expozice vyfoceny a byl zjištěn počet stélek. Po ukončení expozice (168 hodin) byly rostliny ze všech kádinek postupně přeneseny do zkumavek s metanolem (10 ml/zkumavka) a množství extrahovaného chlorofylu  $\alpha$  a  $\beta$  bylo měřeno spektrofotometricky (666 a 653 nm).

Vzorce pro výpočet jednotlivých parametrů a pro výpočet inhibice je uveden v následujících řádcích:

1. Výpočet růstové rychlosti (řasy - pro 72 hodin expozice, okřehek - pro 168 hodin expozice)

$$\mu = (\ln x_k - \ln x_0) / (t_k - t_0)$$

kde je  $\mu$  růstová rychlost (b/ml/t<sup>-1</sup>)

$x_k$  hustota (koncentrace) buněk na konci testu (b/ml)

$x_0$  hustota (koncentrace) buněk na počátku testu (b/ml)

$t_k$  doba konce testu (h)

$t_0$  doba počátku testu (h)

2. Výpočet celkového množství chlorofylu)

Chl celkem = (Cchl  $\alpha$  + Cchl  $\beta$ ) \* 10 (množství rozpouštědla v ml)

kde je Chl celkem celková koncentrace chlorofylu [ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ]

Cchl  $\alpha$  koncentrace chlorofylu  $\alpha$  ( $15,56 * A_{666} - 7,34 * A_{653}$ )

Cchl  $\beta$  koncentrace chlorofylu  $\beta$  ( $27,03 * A_{653} - 11,21 * A_{666}$ )

3. Výpočet inhibice růstové rychlosti u řas anebo okřehku a množství chlorofylu u okřehku)

$$I = (P_v - P_k / P_k) * 100$$

kde je I inhibice sledovaného parametru (%)

$P_v$  hodnota měřeného parametru v testovaném vzorku

$P_k$  hodnota měřeného parametru v kontrolním vzorku

Pro statistické vyhodnocení dat byl použit program GraphPad Prism, verze 3. Statistické porovnání hodnot mezi jednotlivými skupinami bylo provedeno metodou Anova, Tukey-Kramerovým testem) /3/. Vzhledem k tomu, že byl testován vždy pouze 100% výluh, nebyly počítány efektivní koncentrace (EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>).

## VÝSLEDKY A DISKUSE

Z výsledků testů vyplývá, že u obou organismů došlo po prvním vyluhování ponožek k negativnímu ovlivnění obou modelových druhů. S druhým louhováním ponožek již byl zaznamenán statisticky významný efekt pouze efekt na řasách, v případě okřehku k negativním efektům nedocházelo. Z tohoto důvodu byl třetí výluh otestován pouze na řasách. Po třetím výluhu nebyl zaznamenán statisticky významný efekt /3/ v porovnání s kontrolou ani pro řasy – (Anova, Tukey-Kramer Test:  $p > 0.005$ ) (Tab. 1). Chemická analýza výluhu pomocí atomové absorpční

spektrometrie (AAS) neprokázala výskyt stříbra (limit = 0,02 mg/l). Výluhy ze všech ponožek pěnily (s četností vyluhování se jejich pěnivost snižovala), což svědčí o přítomnosti detergentů (ústní sdělení, doc. V. Sýkora, VŠCHT Praha). Lze tedy předpokládat, že za efekty může právě přítomnost těchto látek ve výluzech.

Tab. 1: Naměřené hodnoty růstové rychlosti řas a okřehku u 100% výluhu testovaných nanoponožek, označených jako vzorek 1, vzorek 2 a vzorek 3 společně s inhibicí (%) měřených parametrů v porovnání s kontrolními skupinami. Každá z testovaných ponožek byla vyluhována celkem třikrát.

<b><i>Desmodesmus subspicatus</i></b>	<b>V1</b>	<b>V2</b>	<b>V3</b>
1. výluh - růstová rychlost (b/ml/t <sup>-1</sup> )	0,60	0,83	0,06
<b>I (%)</b>	<b>60</b>	<b>45</b>	<b>96</b>
2. výluh - růstová rychlost (b/ml/t <sup>-1</sup> )	0,39	1,70	0,36
<b>I (%)</b>	<b>79</b>	<b>6</b>	<b>80</b>
3. výluh - růstová rychlost (b/ml/t <sup>-1</sup> )	1,13	-	1,49
<b>I (%)</b>	<b>35</b>	<b>-</b>	<b>15</b>
<b><i>Lemna minor</i></b>	<b>V1</b>	<b>V2</b>	<b>V3</b>
1. výluh - růstová rychlost (b/ml/t <sup>-1</sup> )	0,15	0,13	0,13
<b>I (%)</b>	<b>26</b>	<b>32</b>	<b>34</b>
2. výluh - růstová rychlost (b/ml/t <sup>-1</sup> )	0,18	0,19	0,21
<b>I (%)</b>	<b>2</b>	<b>-5</b>	<b>-18</b>
1. výluh - množství chlorofylu [μg.cm <sup>-3</sup> ]	0,04	0,04	0,03
<b>I (%)</b>	<b>49</b>	<b>61</b>	<b>63</b>
2. výluh - množství chlorofylu [μg.cm <sup>-3</sup> ]	0,08	0,11	0,10
<b>I (%)</b>	<b>20</b>	<b>-19</b>	<b>-7</b>

#### LITERATURA

- /1/ OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, 2011.  
 /2/ ISO 20079: Water quality - Determination of toxic effect of water constituents and waste to duckweed (*Lemna minor*) - Duckweed growth inhibition test, 2005.  
 /3/ GraphPad Prism 5 for Windows; GraphPad Software Inc. 1999-2007.

#### Poděkování

Uvedená práce vznikla za finanční podpory VŠCHT v Praze. Poděkování dále patří Ing. Švorčíkové z Centrálních laboratoří VŠCHT Praha za provedení AAS analýzy.

## VLIV ARSENU NA VYBRANÉ FYZIOLOGICKÉ A STRUKTURNÍ PARAMETRY KOŘENOVÉ KULTURY KŘENU SELSKÉHO

### *INFLUENCE OF ARSENIC ON SELECTED PHYSIOLOGICAL AND SCTRUCTURAL PARAMETERS OF HORSERADISH HAIRY ROOTS CULTURE*

Monika Kofroňová

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra experimentální biologie rostlin, Viničná 5,  
128 44, Praha 2, kofronom@natur.cuni.cz

#### *Summary*

Potential contamination of the food chain is the most important aspect of arsenic toxicity because it is highly toxic to all organisms. Horseradish, a representative of crop plants, has been reported repeatedly as a heavy metals accumulator, and so it is an appropriate model for the study of physiological responses to the arsenic exposition. The aim of the study was to contribute to clarification of the plant response mechanisms on the level of root structure and its carbohydrate metabolism balance as a possible defence mechanism against oxidative stress. Results will contribute to possible phytoremediation exploitation, which in turn may help to limit the contamination of the food chain. Root culture (hairy roots type) of horseradish was grown *in vitro* on media with different content of arsenic. Subsequently, we determined arsenic contents inside the tissues and examined the effect of arsenic on the growth rate and levels of soluble sugars and starch. The arsenic content in tissue cultures increased significantly with increasing concentration in the medium. The growth rate declined in concentration dependent manner. The results showed no large changes in the content or spectrum of soluble carbohydrates, in contrast, the starch amount decreased significantly in variants with increased of arsenic concentrations.

*Key words: horseradish, Armoracia rusticana, hairy roots, arsenic, oxidative stres, carbohydrates*

#### *Souhrn*

Potenciální kontaminace potravního řetězce je nejvýznamnější aspekt toxicity arsenu, protože je vysoce jedovatý všem organismům. U křenu selského, jakožto zástupce zemědělsky využívaných rostlin, byla opakovaně zaznamenána schopnost akumulace těžkých kovů, a tak je vhodným modelem pro studium fyziologických reakcí na působení arsenu. Cílem experimentů bylo přispět k objasnění mechanismů odpovědi rostlin na úrovni stavby kořenové kultury a bilance sacharidového metabolismu jakožto možného mechanismu ochrany proti stresu oxidativnímu, a získat tak výsledky využitelné pro účely fytořemediací, které následně mohou posloužit k omezení kontaminace potravního řetězce. Kořenová kultura (typu hairy roots) křene byla pěstována v podmínkách *in vitro* na médiích s různým obsahem arsenu. Následně byl změřen obsah arsenu uvnitř pletiv, byl sledován vliv arsenu na rychlost růstu a stanoveny hladiny rozpustných sacharidů a škrobu. Obsah arsenu v pletivech kultury se průkazně zvyšoval s narůstající koncentrací v médiu. Se zvyšující se koncentrací arsenu v médiu se snižoval růstový kultur. Výsledky neukázaly velké změny v obsahu ani zastoupení jednotlivých rozpustných sacharidů naproti tomu se obsah škrobu u variant se zvýšenou koncentrací arsenu významně snížil.

*Klíčová slova: křen, Armoracia rusticana, Hairy roots, arsen, oxidativní stres, sacharidy*

#### **ÚVOD**

Arsen patří k nebezpečným látkám přirozeně se vyskytujícím v životním prostředí pouze omezeně, jeho hladina se však významně zvyšuje činností člověka. Akumuluje se v potravním řetězci a pro organismy je toxický. Kontaminované půdy se vyskytují i v České republice, především v okolí výsypek. Výskyt arsenu v půdě negativně ovlivňuje zemědělskou produkci

působením na fyziologické procesy (např. fotosyntéza, metabolismus sacharidů) či změnami v morfologických charakteristikách rostlin (např. zpomalení růstu kořenů, jejich deformace). Významným stresem, který arsen způsobuje, je stres oxidativní. Mezi důležité látky s antioxidační aktivitou, patří sacharidy, které dokážou účinně zhášet volné radikály. Jednou z relativně účinných a přitom levných možností odstraňování arsenu z prostředí či jeho stabilizaci v půdě je fytoremediace. Abychom však mohli této metody plnohodnotně využívat, je nutno nejprve pochopit, jak rostliny reagují na přítomnost toxických kovů.

Biologické chování kořenové kultury typu hairy roots nabízí velkou míru autenticity a podobnost s netransformovanými kořeny, protože jsou pletiva organizovaná s větší podobností struktury a funkce rostlinným orgánům a větší genotypovou a fenotypovou stabilitou ve srovnání s nediferencovanými rostlinnými kulturami /1/. Hairy roots se široce používají pro studium příjmu, toxicity a tolerance některých kovů, např. arsenu /6/.

## MATERIÁL A METODY

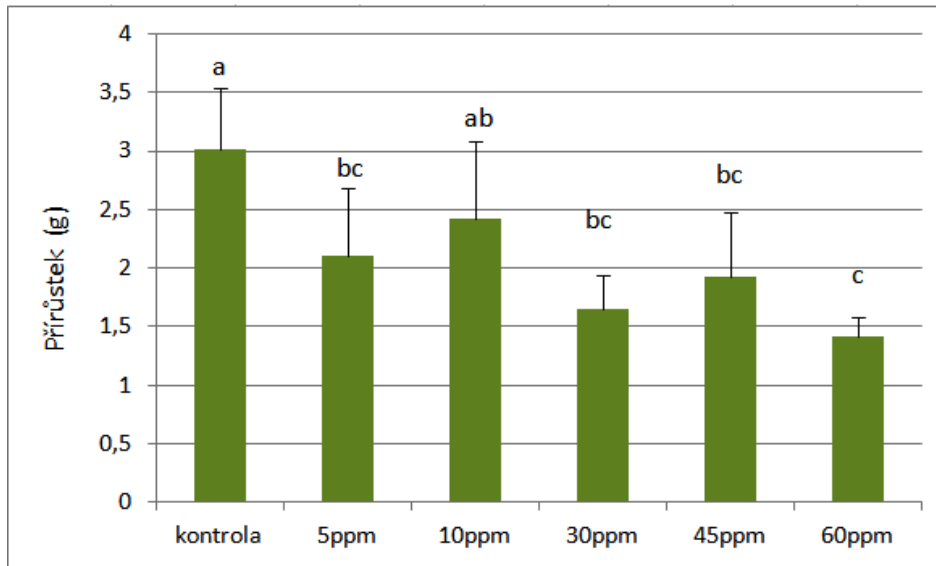
Kultura hairy roots křene byla pěstována v podmínkách in vitro, v tekutém MS médiu s různým obsahem arsenu ve formě  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (v koncentracích 5ppm, 15ppm, 30ppm, 45ppm a 60ppm). Kultury hairy roots byly pěstovány při konstantní teplotě 25°C ve tmě, na orbitální třepačce při 100 rpm. Obsah nestruturních sacharidů byl stanoven pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s refraktometrickou detekcí. Obsah škrobu byl stanoven jako množství glukózy po enzymatickém štěpení. Stanovení obsahu arsenu proběhlo metodou atomové absorpční spektrometrie s technikou generace hydridů. Získaná data byla vyhodnocena pomocí statistického programu NCSS9.0. Pro porovnávání dat byla použita jednocestná analýza rozptylu a analýza variance. V případě normálního rozdělení dat byl jako mnohonásobný srovnávací test použit Tukey-Kramer test. V případě nenormálního rozdělení byl použit Kruskal-Wallis Z test. Hladina významnosti byla zvolena u testů  $\alpha=0,05$  nebo 0,1.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

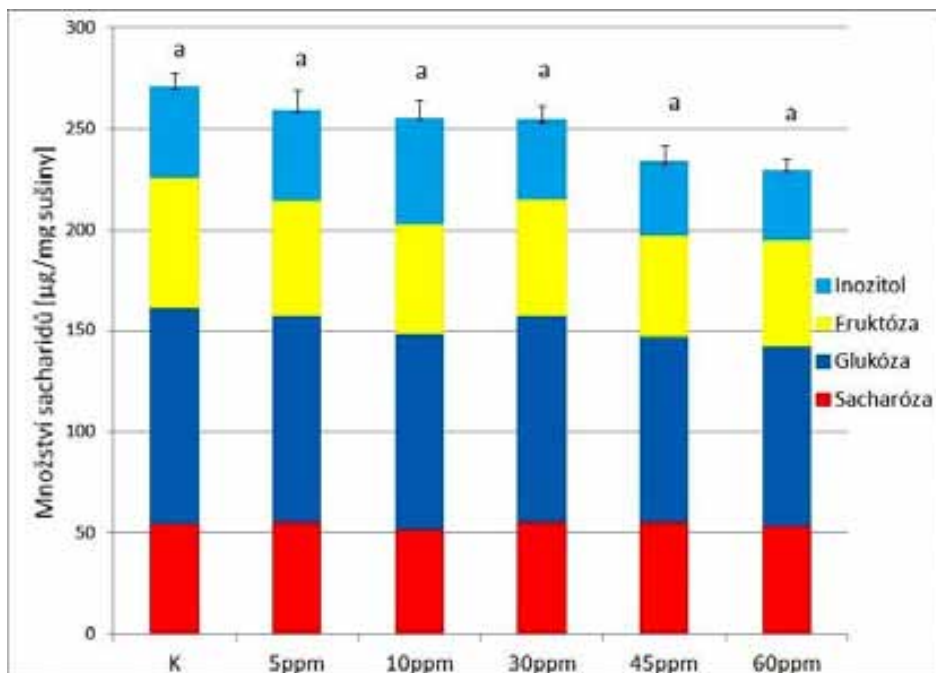
Kořenová kultura „hairy roots“ byla schopná růstu i při vyšších koncentracích arsenu v médiu. Nicméně u stoupajících koncentrací arsenu byla pozorována tendence poklesu růstového. Tento pokles byl ale signifikantní oproti kontrole u všech variant. Ačkoli hairy roots byly schopny růst i ve vyšších koncentracích, tvořily mnohem více postranních kořenů než varianty s nižšími koncentracemi. To může být způsobené odumíráním kořenového apexu negativním vlivem arsenu v médiu s následným posílením zakládání postranních kořenů. Celkový obsah rozpustných sacharidů v kultuře (graf 2) s narůstající koncentrací v živném médiu mírně klesal, rozdíly oproti kontrole však nebyly průkazné. Ani podíly jednotlivých sacharidů na celkovém obsahu neukázaly žádné odlišnosti. Podíl sacharózy ve všech variantách pouze lehce stoupá. Zdá se, že za daných podmínek se neprojevila výraznější stresová odpověď, na úrovni obsahu a spektra rozpustných sacharidů. U škrobu (graf 3) došlo k významnějším změnám.

S narůstající koncentrací arsenu v médiu obsah škrobu klesá ve všech stresovaných variantách, nicméně statisticky průkazný pokles byl pouze u varianty 30 a 45ppm. Snížení obsahu škrobu může být způsobeno navýšením aktivity enzymů degradace škrobu pod vlivem arsenu /3/. Při kontaminaci těžkými kovy dochází většinou k akumulaci škrobu, jako např. u kontaminace arsenem a hliníkem u sazenic rýže /3/, /5/. Ale naopak snížení množství škrobu bylo pozorováno u rostlin mangrovníků či borovice vystavených těžkým kovům /2/, /4/.

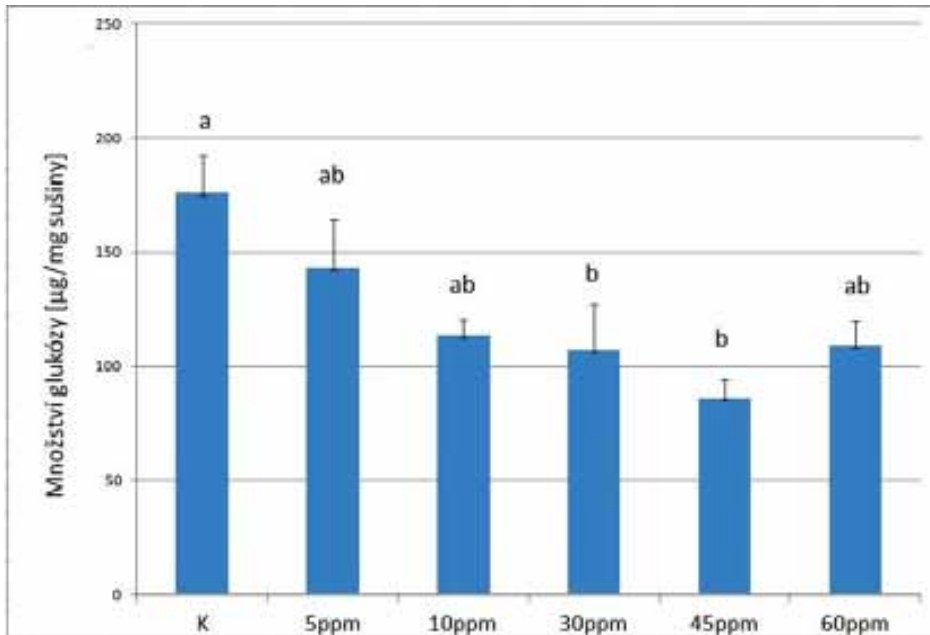




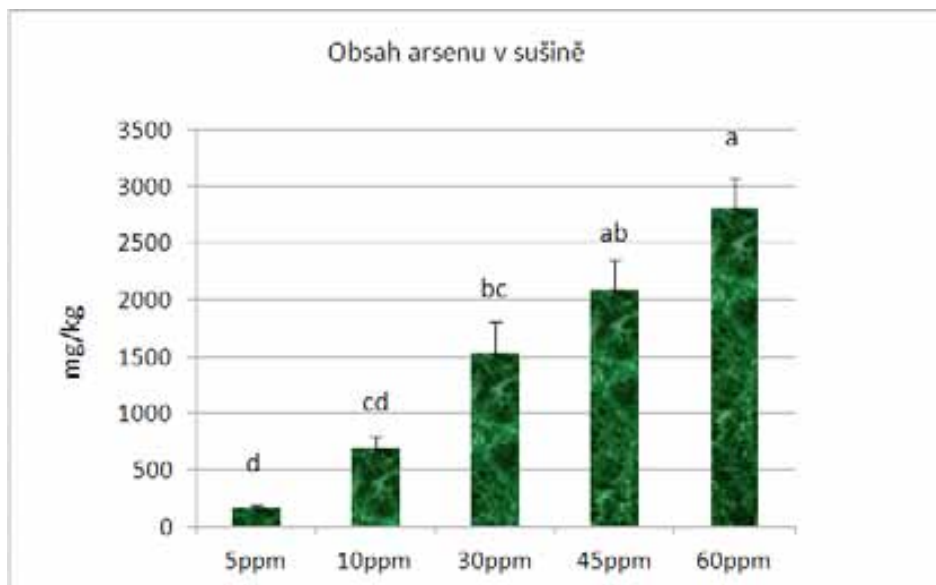
Graf 1: Týdenní přírůstek biomasy u kultury hairy roots *Armoracia rusticana* pod vlivem arzenu. Obsah arzenu v médiu- 5ppm, 10ppm, 30ppm, 45ppm a 60ppm Úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky. Rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině  $\alpha=0,1$ ,  $n=5-7$



Graf 2: Obsah endogenních rozpustných sacharidů u kultury hairy roots *Armoracia rusticana* pod vlivem arzenu. 5ppm, 10ppm, 30ppm, 45ppm a 60ppm varianty množství dodaného arzenu. Úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky celkového obsahu sacharidů. Rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině  $\alpha=0,05$ ,  $n=5-7$



Graf 3: Obsah škrobu u kultury hairy roots *Armoracia rusticana* pod vlivem arsenu. 5ppm, 10ppm, 30ppm, 45ppm a 60ppm varianty množství dodaného arsenu. Úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky celkového obsahu sacharidů. Rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině  $\alpha=0,1$ ,  $n=5-7$



Graf 4: Celkový obsah arsenu u kultury hairy roots *Armoracia rusticana* v závislosti na koncentraci arzenu v médiu 5ppm, 10ppm, 30ppm, 45ppm a 60ppm varianty množství dodaného arsenu. Úsečky nad sloupci znázorňují směrodatné odchylky. Rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl na hladině  $\alpha=0,5$ ,  $n=5-7$

## LITERATURA

- /1/ Flores HE. 1987. Use plant cells and organ culture in the production of biological chemicals. Chemistry 334:66 – 86.
- /2/ Guanqiu Q, Chongling Y, Haoliang L. 2007. Influence of Heavy Metals on the Carbohydrate and Phenolocs in Mangrove, *Aegiceras corniculatum* L., Seedlings. Bull Environment Contam Toxicol 78: 440 – 444.

- /3/ Jha AB, Dubey RS. 2005. Effect of arsenic on behaviour of enzymes of sugar metabolism in germinating rice seeds. *Acta physiologia plantarum* 27:341-347.
- /4/ Kim CG, Power SA, Bell JNB. 2003. Effect of kadmium and soil type on mineral nutrition and carbon partitioning in seedlings of *Pinus silvestris*. *Water, Air, and Soil Pollution* 145:253 – 266
- /5/ Mishra P, Dubey RS. 2008. Effect of aluminium on metabolism of starch and sugars in growing rice seedlings. *Acta Physiol Plant* 30:265 – 275.
- /6/ Sato K, Maitani T, Yoshihira K. 1991. Uptake of Arsenic by Cultured Hairy Roots of *Rubia tinctorum* from Liquid Medium. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 5:414 – 419.

## OROVNANIE ÚČINKU KADMIA NA HLADINU FOTOSYNTETICKÝCH PIGMENTOV, BIOMASU A OBSAH VODY V *HORDEUM VULGARE* A *TRITICUM AESTIVUM*

### COMPARISON OF CADMIUM EFFECT TO LEVEL OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS, BIOMASS AND WATER CONTENT IN *HORDEUM VULGARE* AND *TRITICUM AESTIVUM*

Marianna Molnárová, Agáta Fargašová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra environmentálnej ekológie, Mlynská dolina B2, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika, molnarova@fns.uniba.sk

#### Summary

The aim of our study was assessment of Cd impact on growth, biomass production, water content and photosynthetic pigments in a seven-day seedlings *Hordeum vulgare* and *Triticum aestivum*. While Cd more inhibited the growth of roots and shoots of *H. vulgare*, production of photosynthetic pigments (chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and total carotenoids) was significantly reduced in the *T. aestivum*. Greater sensitivity to Cd in *H. vulgare* was confirmed also by the evaluation of biomass production (DM, FM), which was reduced more in roots than shoots. In the *H. vulgare* significantly decreased the water content in the shoots indicating a failure in the water transport from the roots to the shoots. Failure of water transport in *T. aestivum* was less pronounced than in *H. vulgare*.

*Key words:* cadmium, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, photosynthetic pigments, biomass production, water content, growth inhibition

#### Súhrn

V príspevku sa hodnotí vplyv Cd na rast, produkciu biomasy, obsah vody a fotosyntetických pigmentov v sedemdnových semenáčikoch *Hordeum vulgare* a *Triticum aestivum*. Kým Cd silnejšie inhibovalo rast koreňov aj výhonkov *H. vulgare*, produkcia fotosyntetických pigmentov (chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a karotenoidy) bola výraznejšie redukovaná v *T. aestivum*. Väčšia citlivosť na Cd sa pri *H. vulgare* potvrdila aj pri hodnotení produkcie biomasy (DM, FM), ktorá bola viac redukovaná v koreňoch ako výhonkoch. V *H. vulgare* poklesol výraznejšie aj obsah vody vo výhonkoch, čo poukazuje na poruchy v jej transporte z koreňov do nadzemných častí. Porucha transportu vody pri *T. aestivum* nebola taká výrazná ako pri *H. vulgare*.

*Kľúčové slová:* kadmium, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, fotosyntetické pigmenty, produkcia biomasy, obsah vody, inhibícia rastu

## ÚVOD

Hoci kadmium patrí z environmentálneho hľadiska k najtoxickejšim kovom, mechanizmus jeho účinku v rastlinách zatiaľ nie je presne známy. Kým v kyslom prostredí sa jeho mobilita a bioprístupnosť zvyšuje, v alkalických podmienkach je skôr imobilný. Do životného prostredia sa dostáva banskou činnosťou, z minerálnych hnojív, spaľovaním fosílnych palív a komunálneho odpadu, alebo nevhodnou manipuláciou s nebezpečným odpadom s obsahom kadmia (napr. kadmiových batérií) /1/. Rastliny reagujú na jeho prítomnosť inhibíciou klíčenia, rastu aj fotosyntézy. Cd je efektívne absorbované listovým systémom a napriek obmedzenej translokácii cez rastlinné pletivá môže byť veľmi mobilné, pretože sa ľahko viaže na aktívne miesta bunkovej steny /2/. Cieľom príspevku bolo zhodnotiť toxický účinok Cd na rast koreňov a výhonkov, obsah

fotosyntetických pigmentov, produkciu biomasy a obsahu vody v dvoch obilninách – jačmeni a pšenici.

## MATERIÁL A METÓDA

Cd sa testovalo v koncentráciách 94, 197 a 394 mg.l<sup>-1</sup> (832, 1752 a 3504 μmol.dm<sup>-3</sup>) pre *H. vulgare*, a 49, 197 a 394 mg.l<sup>-1</sup> (438, 1752 a 3504 μmol.dm<sup>-3</sup>) pre *T. aestivum* /3/. Zdrojom Cd bol CdCl<sub>2</sub>.2,5H<sub>2</sub>O p.a (Lachema, Česká republika). Semená jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Orhego) a pšenice siatej (*Triticum aestivum* L., cv. Šárka s génom pre krátke stebľa *Rht 2*) od firmy Chepo, s.r.o. (Unhošt – Fialka, Česká republika) klíčili vo vertikálnych kultivačných plastových kontajneroch Phytotoxkit (MicroBioTests, Inc., Nazareth, Belgicko) s rozmermi 21 x 15,5 cm na vrstve papierovej vaty a filtračného papiera s 24 ml testovaného roztoku. Kontrolou bola odstáta vodovodná voda (80 mg Ca.l<sup>-1</sup>, 27 mg Mg.l<sup>-1</sup>; pH 7,3± 0,05). V každom kontajneri klíčilo 72 hod v tme pri teplote 25±1 °C 10 semien jačmeňa, príp. 8 semien pšenice. Každá koncentrácia sa hodnotila minimálne v troch paralelkách. Na tretí deň sa zmerala dĺžka koreňov a výhonkov a probitovou analýzou /3/ sa vypočítali hodnoty 50 %-nej inhibície rastu (IC50). Následne sa nechali semenáčky rásť v svetelnom režime deň/noc (16/8 hod) pri teplote 24±1 °C ďalšie 4 dni. Na 7. deň (3 dni v tme, 4 dni v dennom režime) sa z výhonkov extrahovali v 95 % (v/v) etanole (60 mg listov v 6 ml etanolu) fotosyntetické pigmenty (chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a celkové karotenoidy). Ich obsah sa stanovil spektrofotometricky pri vlnových dĺžkach 470, 649 a 665 nm, a prepočítal sa na mg sušiny /4/. Čerstvá biomasa (FM, „fresh mass“) sa odvážila a vysušila v sušiarňi pri 55 °C do konštantnej hmotnosti. Sušina (DM, „dry mass“) sa odvážila a obsah vody WC („water content“) sa vypočítal podľa vzorca /5/:

$$WC (g \cdot g^{-1} DM) = ((FM - DM) / DM).$$

Výsledky boli vyhodnotené a graficky spracované v programe Microsoft Excel 2010 a Adobe Photoshop Elements 10.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Koncentrácie Cd, pri ktorých dochádzalo k 50 % skráteniu dĺžky koreňov a výhonkov, sú uvedené v Tab. 1. Kým pri *H. vulgare* sa nepotvrdil rozdiel medzi IC50 hodnotou pre rast koreňa a výhonku, pri *T. aestivum*, ktorého rast bol inhibovaný na 50 % až pri 1,7 krát vyššej koncentrácii (367 mg Cd.l<sup>-1</sup>) ako pri *H. vulgare*, bol silnejšie inhibovaný rast koreňa. Dĺžka výhonkov *T. aestivum* bola v porovnaní s *H. vulgare* inhibovaná o 50 % pri dvojnásobne vyššej koncentrácii (Tab. 1). Kým /6/ pozorovali inhibíciu rastu koreňa jačmeňa pestovaného hydroponicky už pri koncentrácii 2,81 mg Cd.l<sup>-1</sup>, v našich semihydroponických pokusoch boli IC50 hodnoty niekoľkonásobne vyššie (216 mg Cd.l<sup>-1</sup>). V literatúre sa uvádza /7, 8/, že so zvyšujúcou sa koncentraciou Cd sa obsah chlorofylov znižuje. Pri hodnotení hladiny fotosyntetických pigmentov sa pri *T. aestivum* medzi jednotlivými pigmentmi v stanovenej IC50 hodnote (297 mg.l<sup>-1</sup>) (Tab. 1) nepotvrdili rozdiely. Pri *H. vulgare* Cd najviac znižovalo hladinu chlorofylu *b*, kým obsah chlorofylu *a* zredukovala na polovicu až koncentrácia Cd 599 mg.l<sup>-1</sup>. Fotosyntetické pigmenty boli teda v *H. vulgare* inhibované v nasledovnom poradí: chlorofyl *b* > karotenoidy > chlorofyl *a* (Tab. 1). Pokiaľ ide o obsah fotosyntetických pigmentov, hlavne chlorofylov, tak ten sa znižuje so zvyšujúcou sa hladinou kovov, ktoré sa akumulujú v pletivách rastlín /9, 10/. Cd môže inhibovať aj dôležitý enzým v koreni – Fe(III)-reduktázu, čo môže viesť k nedostatku Fe(II) pre rastlinu a môže výrazne ovplyvniť fotosyntézu /11, 12/.

Okrem rastu a produkcie fotosyntetických pigmentov Cd, v závislosti od koncentrácie, výrazne zredukovalo v oboch testovaných obilninách aj produkciu čerstvej biomasy (FM) a sušiny (DM) a znižovalo obsah vody (WC) v koreňoch aj výhonkoch (Tab. 2). Pri hodnotení týchto parametrov sa ako citlivejší ukázal jačmeň *H. vulgare*, pri ktorom bola silnejšie redukovaná produkcia biomasy koreňa ako výhonku. Podobný výsledok získali /6/ pri testovaní už 25 μmol.dm<sup>-3</sup> Cd na 12-dňových semenáčikoch jačmeňa, kde čerstvá biomasa koreňov bola

redukovaná vo vyššej miere ako biomasa výhonkov. Autori /7/ kultivovali jačmeň 12 dní v živnom roztoku s  $54 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  Cd ( $6,07 \text{ mg Cd}\cdot\text{l}^{-1}$ ), pričom na rozdiel od našich výsledkov nepozorovali okrem inhibície rastu žiadne štatisticky významné zmeny v relatívnom obsahu vody v listoch. Pokiaľ ide o obsah vody v našich výsledkoch (Tab. 2), tak jej pokles bol naopak výraznejší vo výhonkoch, čo poukazuje na poruchy v transporte vody z koreňov do nadzemných častí rastlín. Pri *T. aestivum* sa síce pozorovali v prítomnosti Cd štatisticky významné rozdiely v produkcii biomasy koreňov a výhonkov, ktoré boli porovnateľné s poklesom sušiny pšenice, prípadne slnečnice /8, 13/, ale štatisticky významný pokles obsahu vody bol pozorovaný len v prípade výhonkov (Tab. 2). Nepriaznivý vplyv Cd na príjem vody, jej transport a transpiráciu uvádzajú aj iní autori /14, 15/.

Tab.1: IC50 koncentrácie a ich 95 % interval spoľahlivosti (CI) pre rast koreňa, výhonku a hladinu fotosyntetických pigmentov (chlorofylu *a*, chlorofylu *b*, karotenoidov) v semenáčikoch *T. aestivum* a *H. vulgare* rastúcich v prítomnosti Cd

rastlina	IC50 + CI (mg.l <sup>-1</sup> )				
	koreň	výhonok	chlorofyl <i>a</i>	chlorofyl <i>b</i>	karotenoidy
<i>Hordeum vulgare</i>	216 (180-257)	218 (194-246)	599 (458-782)	387 (337-444)	503 (402-629)
<i>Triticum aestivum</i>	367 (300-449)	461 (383-554)	297 (237-372)	297 (237-372)	296 (233-376)

Tab.2: Obsah čerstvej biomasy, sušiny a vody v koreňoch a výhonkoch semenáčikov *H. vulgare* a *T. aestivum* rastúcich v prítomnosti Cd. Legenda: DM – sušina, FM – čerstvá biomasa, WC – obsah vody, \* – štatistická významnosť oproti kontrole (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001).

konc. (mg.l <sup>-1</sup> )	koreň			výhonok		
	I (g)	I (g)	C (g.g <sup>-1</sup> DM)	I (g)	I (g)	C (g.g <sup>-1</sup> DM)
<b><i>Hordeum vulgare</i></b>						
<b>0</b>	0,5619	0,0561	9,02	0,4734	0,1285	8,37
<b>94</b>	0,4059	0,0482	7,42	0,4565	0,0392	10,65
<b>197</b>	0,1431***	0,0169***	7,47	0,3076*	0,0649	3,74*
<b>394</b>	0,0667***	0,0092***	6,25*	0,1524**	0,0600	1,54**
<b><i>Triticum aestivum</i></b>						
<b>0</b>	0,5261	0,0660	6,97	0,5259	0,0548	8,60
<b>49</b>	0,3411**	0,0406**	7,40	0,3952	0,0420	8,41
<b>197</b>	0,2232**	0,0273**	7,18	0,2993**	0,0362*	7,27**
<b>394</b>	0,1037***	0,0131***	6,92	0,0961***	0,0132**	6,28*

## LITERATÚRA

- 1/ Anonymus: Kadmium a zlúčeniny, (CAS: 7440-43-9), Cd. Informačné listy SAŽP. Zdroj: [http://www.sazp.sk/slovak/struktura/COH/pchb/projekt\\_2004\\_01/informacne\\_listy/18.pdf](http://www.sazp.sk/slovak/struktura/COH/pchb/projekt_2004_01/informacne_listy/18.pdf), 26.4.2015.
- 2/ Lepp, N.W., Harrison, C.S., Morrell, B.G.: A role of *Amanita muscaria* L. in the circulation of cadmium and vanadium in a non-polluted woodland. Environmental Geochemistry and Health, 9, 1987: 61–64.
- 3/ STN 83 8303: Skúšanie nebezpečných vlastností odpadov. Ekotoxicita. Skúšky akútnej toxicity na vodných organizmoch a skúšky inhibície rastu rias a vyšších kultúrnych rastlín. 1999.
- 4/ Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R.: Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochemical Society Transaction, 603, 1983: 591–592.
- 5/ Drazic, G., Mihailovic, N.: Modification of cadmium toxicity in soybean seedlings by salicylic acid. Plant Science, 168, 2005: 511–517.
- 6/ Metwally, A., Finkemeier, I., Georgi, M., Dletz, K.J.: Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedling. Plant Physiology, 132, 2003: 272–281.

- /7/ Vassilev, A., Berova, M., Zlatev, Z.: Influence of  $Cd^{2+}$  on growth, chlorophyll content, and water relations in young barley plants. *Biologia Plantarum*, 41, 1998: 601–606.
- /8/ Gadallah, M.A.A.: Effects of cadmium and kinetin on chlorophyll content, saccharides and dry mater accumulation in sunflower plants. *Biologia Plantarum*, 37, 1995: 233–240.
- /9/ Burzynski, M., Buczek, J.: Interaction between cadmium and molybdenum affecting the chlorophyll content and accumulation of some heavy metals in the second leaf of *Cucumis sativus* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 11, 1989: 137–145.
- /10/ Abdel-Basset, R., Issa, A.A., Adam, M.S.: Chlorophylase activity: effect of heavy metals and calcium. *Photosynthetica*, 31, 1995: 421–425.
- /11/ Alcantara, E., Romera, F.J., Cañete, M., De La Guardia, M.D.: Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe(III)reductase in Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. *Journal of Experimental Botany*, 45, 1994: 1893–1898.
- /12/ Lang, F., Sarvari, E., Szigeti, Z., Fodor, F., Cseh, E.: Effects of heavy metals on the photosynthetic apparatus in cucumber. In: Mathis, P. (Ed.), *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, vol. IV. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 1995: 533–536.
- /13/ Cailin, G.E., Ding, Y., Wang, Z., Wan, D., Wang, Y., Shang, Q., Luo, S.: Responses of wheat seedling to cadmium, mercury and trichlorobenzene stresses. *Journal of Environmental Sciences*, 21, 2009: 806–813.
- /14/ Costa, G., Michaut, J., Morel, J.: Influence of cadmium on water relations and gas exchange, in phosphorous deficient *Lupinus albus* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 32, 1994: 105–114.
- /15/ Marchiol, L., Martin, M., Peressoti, A., Zerbi, G.: Physiological responses of two soybean cultivars to cadmium. *Journal of Environmental Quality*, 25, 1996: 562–566.

### Pod'akovanie

Výskum sa zrealizoval s finančnou podporou grantu Vedeckej grantovej agentúry MŠ SR VEGA 1/0098/14.

**VLIV NEDOSTATKU FOSFÁTU NA HLADINY CYTOKININŮ*****THE IMPACT OF PHOSPHATE DEFICIENCY ON CYTOKININ POOL***

Radomíra Vaňková<sup>1</sup>, Sylva Přerostová<sup>1,2</sup>, Alena Gaudinová<sup>1</sup>, Vojtěch Knirsch<sup>1</sup>, Michal Balin<sup>2</sup>, Petre Dobrev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 263, 165 02 Praha 6, vankova@ueb.cas.cz

<sup>2</sup> Karlova Univerzita v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra experimentální biologie rostlin, Viničná 5, 128 44 Praha 2

***Summary***

Plant responses to phosphorus deficiency are regulated by plant hormones, especially by strigolactones, the biosynthesis of which is strongly stimulated during phosphate starvation. Strigolactones affect plant growth and phosphate uptake in the interaction with cytokinins. The impact of synthetic strigolactone GR24 on cytokinin pool was compared at full phosphate nutrition and during phosphate deficiency in *Arabidopsis thaliana* plants. Decisive difference was found between the response of the shoots (predominantly apices) and roots. The hormonal responses corresponded well to the morphological changes, i.e. suppression of shoot growth and moderate promotion of root system.

*Key words: Arabidopsis thaliana, cytokinin, phosphate deficiency, strigolactone*

***Souhrn***

Odezva rostlin na nedostatek fosforu je regulována rostlinnými hormony, zejména strigolaktony, jejichž biosyntéza je za těchto podmínek silně stimulována. Strigolaktony ovlivňují růst rostlin i příjem fosfátu v interakci s dalšími hormony – cytokininy. Charakterizovali jsme vliv syntetického strigolaktonu GR24 na hladiny jednotlivých metabolitů cytokininů v rostlinách *Arabidopsis thaliana* při plném zásobení fosfátem a při jeho nedostatku. Odezva nadzemní části, zejména apexů, se významně lišila od reakce kořenů. Hormonální změny jsou v souladu s morfologickými změnami, t.j. se zastavením růstu nadzemní části a mírnou stimulací kořenového systému.

*Klíčová slova: Arabidopsis thaliana, cytokinin, nedostatek fosfátu, strigolakton*

**ÚVOD**

Fosfor je jednou z nejdůležitějších, esenciálních živin rostlin. Na rozdíl od další esenciální živiny, dusíku, jsou zásoby fosforu v přírodě limitovány. Pro zachování stabilní zemědělské produkce je proto důležité zvýšit příjem a využití fosforu rostlinami. Základním předpokladem je objasnění mechanismů odezvy rostlin na deficit fosforu. Ve fázi klíčení nedostatek fosforu výrazně omezuje růst celých rostlin, v pozdějších vývojových fázích převážně nadzemní části. Morfologická odezva, stejně jako příjem fosforu, jsou regulovány rostlinnými hormony, zejména strigolaktony. Vzhledem k tomu, že mezi fytohormony dochází k velmi intenzívním interakcím, charakterizovali jsme dopad deficitu fosforu na hladiny dalších interagujících hormonů, cytokininů, přímo a po aplikaci exogenního strigolaktonu GR24.

**MATERIÁL A METODA**

Rostliny *Arabidopsis thaliana* (ekotyp Columbia 0) byly pěstovány hydroponicky (Hoaglandovo medium zředěné 1:7, obsahující 100  $\mu\text{M}$  fosfát sodný), v kultivačních komorách (SANYO MLR 350H) při krátkém dni (8/16 h) a světelné intenzitě 130  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , teplotě 20 °C a relativní vlhkosti cca 75 %. Po 28 dnech byla polovina rostlin přemístěna do media bez fosfátu. Strigolakton GR24 (5  $\mu\text{M}$ ) byl přidán do kultivačního media, jak plně zásobeného fosfátem tak bez fosfátu, po dobu 7 dní. V dalších variantách byl GR24 přidán na 1 den, buď k

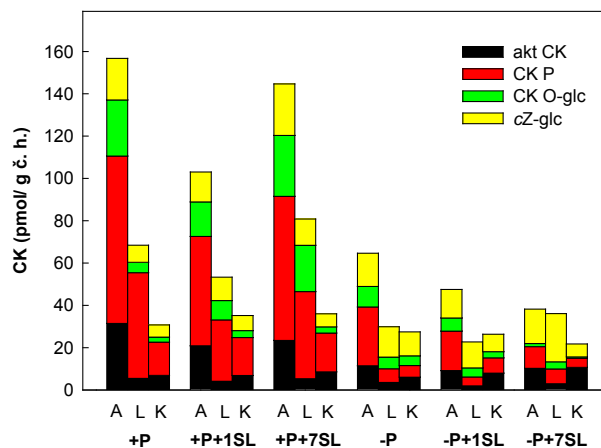


roślinám plně zásobeným fosfátem, případně po 6 dnech hladovění. Vzorky apexů, listů a kořenů 35-denních rostlin byly odebrány v polovině světelné fáze a okamžitě zamrazeny v kapalném dusíku.

*Stanovení cytokininů.* Hladiny 24 metabolitů cytokininů byly stanoveny v apexech, listech a kořenech *Arabidopsis thaliana*. Vzorky byly extrahovány a čištěny podle /3/. Deriváty cytokininů byly kvantifikovány po rozdělení na HPLC (Ultimate 3000, Dionex) pomocí hmotového spektrometru (3200 Q TRAP, Applied Biosystems) postupem podle /2/ a /4/.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

Sedmidenní nedostatek fosfátu výrazně snížil hladiny aktivních cytokininů (zejména *trans*-zeatinu a jeho ribosidu) v apexech a listech *Arabidopsis thaliana* (graf 1). V kořenech bylo pozorováno pouze minimální snížení. Současný pokles hladin prekurzorů cytokininů koreloval s poklesem biosyntézy cytokininů v celé rostlině. Tyto analýzy jsou v souladu s výsledky transkriptomických studií /např. 1/ a s dobře charakterizovanou úlohou signální dráhy cytokininů při inhibici exprese genů stimulovaných nedostatkem fosfátu /5/.



Graf 1: Hladiny aktivních cytokininů (*trans*-zeatinu, *isopentenyladeninu*, *cis*-zeatinu, *dihydrozeatinu* a odpovídajících ribosidů – akt CK), jejich prekurzorů (CK fosfátů – CK P), zásobních forem (CK O-glukosidů – CK O-glc) a glukosidů *cis*-zeatinu (cZ-glc) v apexech (A), listech (L) a kořenech (K) rostlin *Arabidopsis*. +P: 100  $\mu$ M fosfát, +P+1SL: 1-denní inkubace s 5  $\mu$ M GR24, +P+7SL: 7-denní inkubace s 5  $\mu$ M GR24, -P: 7-denní nedostatek fosfátu, -P+1SL: 7-denní nedostatek fosfátu doplněný poslední den 5  $\mu$ M GR24, -P+7SL: 7-denní aplikace 5  $\mu$ M GR24 při nedostatku fosfátu.

Při plném zásobení fosfátem měla aplikace exogenního strigolaktonu GR24 negativní vliv na hladiny aktivních cytokininů v nadzemní části, při nedostatku fosfátu se tento vliv ještě zesílil. V kořenech GR24 mírně zvyšoval hladiny aktivních cytokininů, zejména během delší inkubace. Tento vliv byl spojen s poklesem deaktivace cytokininů (tvorba O-glukosidů). Nejvíce zastoupenými metabolity cytokininů byly jejich deaktivované formy – N-glukosidy (tabulka 1). Omezení biosyntézy cytokininů při nedostatku fosfátu bylo doprovázeno poklesem tvorby glukosidů. Při plném zásobení fosfátem bylo negativní působení GR24 na obsah aktivních cytokininů doprovázeno zvýšením hladin N- a O-glukosidů cytokininů, při nedostatku fosfátu docházelo naopak k inhibici glukosylace.

Rozdíly mezi hormonální odezvou nadzemní části a kořenů velmi dobře odpovídají morfologickým změnám, vyvolaným nedostatkem fosfátů (omezení růstu nadzemní části, zvýšení tvorby kořenů, zejména kořenového vlášení) /6/. Získané výsledky jsou v souladu s funkcí cytokininů jakožto signálu dostupnosti živin /7/.

Tab.1: Vliv nedostatku fosfátu a exogenního strigolaktону na hladiny N-glukosidů cytokininů

	+P [pmol/g]	+P+1SL [pmol/g]	+P+7SL [pmol/g]
apex	266.04 ± 44.94	217.56 ± 63.99	324.00 ± 65.57
list	137.32 ± 13.53	151.49 ± 28.82	312.20 ± 57.74
kořen	15.13 ± 2.43	30.07 ± 7.48	41.26 ± 10.98
	-P [pmol/g]	-P+1SL [pmol/g]	-P+7SL [pmol/g]
apex	109.51 ± 39.69	55.94 ± 19.76	53.72 ± 10.49
list	106.81 ± 16.30	96.44 ± 28.57	143.84 ± 52.88
kořen	16.79 ± 5.79	16.09 ± 5.62	18.29 ± 4.59

+P: 100 μM fosfát, +P+1SL: 1-denní inkubace s 5 μM GR24, +P+7SL: 7-denní inkubace s 5 μM GR24, -P: 7-denní nedostatek fosfátu, -P+1SL: 7-denní nedostatek fosfátu doplněný poslední den 5 μM GR24, -P+7SL: 7-denní aplikace 5 μM GR24 při nedostatku fosfátu.

## LITERATURA

- 1/ Bai, F.X., Chen, C.L., An, J.Y., Xiao, S.Y., Deng, X.X., Pan, Z.Y.: Transcriptome responses to phosphate deficiency in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36, 2014: 3207-3215
- 2/ Djilianov, D.L., Dobrev, P.I., Moyankova, D.P., Vaňková, R., Georgieva, D.Ts., Gajdošová, S., Motyka, V.: Dynamics of endogenous phytohormones during desiccation and recovery of the resurrection plant species *Haberlea rhodopensis*. *Journal of Plant Growth Regulations*, 32, 2013: 564–574
- 3/ Dobrev, P., Kamínek, M.: Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 950, 2002: 21-29
- 4/ Dobrev, P.I., Vaňková, R.: Quantification of abscisic acid, cytokinin and auxin content in salt-stressed plant tissues. *Methods in Molecular Biology*, 913, 2012: 251-261
- 5/ Franco-Zorrilla, J.M., Martin, A.C., Leyva, A., Par-Ares, J.P.: Interaction between phosphate-starvation, sugar, and cytokinin signaling in *Arabidopsis* and the roles of cytokinin receptors CRE1/AHK4 and AHK3. *Plant Physiology*, 138, 2005: 847-857
- 6/ Niu, Y.F., Chai, R.S., Jin, G.L., Wang, H., Tang, C.X., Zhang, Y.S.: Responses of root architecture development to low phosphorus availability: a review. *Annals of Botany*, 112, 2013: 391-408
- 7/ Ruffel, S., Krouk, G., Ristova, D., Shasha D, Birnbaum, K.D., Coruzzi, G.M.: (2011) Nitrogen economics of root foraging: Transitive closure of the nitrate-cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand. *Proceeding of National Academy of Sciences USA*, 108, 2011:18524-18529

## Poděkování

Uvedená práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MŠMT ČR COST\_LD14120.

## **METABOLICKÉ ZMENY AGÁTU BIELEHO (*ROBINIA PSEUDOACACIA* L.) VYVOLANÉ ALELOCHEMIKÁLIAMI KONKURENČNÝCH DREVÍN**

### ***METABOLIC CHANGES OF BLACK LOCUST (*ROBINIA PSEUDOACACIA* L.) CAUSED BY ALLELOCHEMICALS OF COMPETITIVE WOODY PLANTS***

Dominika Bošiaková<sup>1,2</sup>, Peter Ferus<sup>1</sup>, Jana Konôpková<sup>1</sup>, Peter Hořka<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav ekológie lesa SAV, d.p. Arborétum Mlyňany, Vieska nad Žitavou 178, 951 52 Slepčany, dominika.bosiakova@savba.sk

<sup>2</sup> Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, FPV, katedra botaniky a genetiky, Nábřežie mládeže 91, 949 74 Nitra

#### **Summary**

Black locust (*Robinia pseudoacacia* L.), despite of many positive features, as an invasive species represents significant environmental risk. For this reason, we tested possibilities of its bioregulation using allelochemicals of competitive woody plants black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) and common hackberry (*Celtis occidentalis* L.). For this reason parameters of N metabolism (ureids, proteins), stress level (hydrogen peroxide) and photosynthetic pigments (chlorophylls, carotenoids) were analyzed. Allelochemicals of common hackberry are more effective for bioregulation of black locust, than allelochemicals of black cherry.

*Key words: black locust (Robinia pseudoacacia L.), allelochemicals, black cherry (Prunus serotina Ehrh.), common hackberry (Celtis occidentalis L.)*

#### **Súhrn**

Agát biely (*Robinia pseudoacacia* L.), napriek množstvu pozitívnych vlastností, ako invázny druh predstavuje značné ekologické riziko. Z tohto dôvodu sme sa zamerali na otestovanie možností bioregulácie agátu prostredníctvom alelochemikálií konkurenčných drevín čremchy neskorej (*Prunus serotina* Ehrh.) a brestovca západného (*Celtis occidentalis* L.). Za týmto účelom sme analyzovali parametre dusíkatého metabolizmu (ureidy, proteíny), mieru stresu (peroxid vodíka) a fotosyntetické pigmenty (chlorofyly, karotenoidy). Alelochemikálie brestovca západného sú účinnejším prostriedkom bioregulácie agátu bieleho ako alelochemikálie čremchy neskorej.

*Kľúčové slová: agát biely (Robinia pseudoacacia L.), alelochemikálie, čremcha neskorá (Prunus serotina Ehrh.), brestovec západný (Celtis occidentalis L.)*

## **ÚVOD**

Biologické invázie sú jedným z najväčších problémov, ktoré negatívne poznačujú globálnu biodiverzitu. Alelopatia je vo všeobecnosti považovaná za jeden z kľúčových mechanizmov stojacich za úspechom invázných druhov rastlín /2/. Využitie alelopatického účinku jedného rastlinného druhu voči inému sa však javí ako potenciálna možnosť regulácie invázných druhov.

Agát biely patrí na Slovensku k najrozšírenejším cudzokrajným drevinám a zároveň je jediným nepôvodným druhom, ktorý vytvára súvislé lesné porasty /1/. O možnostiach regulácie agátu bieleho prostredníctvom inhibičného účinku alelochemikálii vybraných druhov rastlín boli v posledných desaťročiach publikované viaceré práce /4, 7/.

Brestovec západný a čremcha neskorá majú výrazné alelopatické účinky /3/. V agátových lesoch v blízkosti Arboréta Mlyňany SAV a Botanickej záhrady ÚEB MAV vo Vácrátote v Maďarsku možno pozorovať unikátne interakcie medzi týmito druhmi. Na základe pozorovaní v prírodných podmienkach sme sa zamerali na charakteristiku supresívnych účinkov

alelochemikálií čremchy neskorej a brestovca západného na agát biely rastúci v kontrolovaných podmienkach.

## MATERIÁL A METODIKA

### *Príprava, inokulácia a kultivácia rastlinného materiálu*

Semená agátu bieleho (*Robinia pseudoacacia* L.) boli pozberané na jeseň 2013 v blízkosti Arboréta Mlyňany SAV. Následne sme ich skarifikovali po dobu 90 minút v 93% kyseline sírovej a do začiatku pokusu boli uchovávané v chlade. Na začiatku pokusu sme najskôr semená nechali naklíčiť, naklíčené semená sme preniesli na agarové médium (7g práškového agaru rozpusteného v 1000 ml LNS) a kultivovali v kontrolovaných podmienkach pri 16 hodinovej fotoperióde. V kultivačnej komore bola udržiavaná teplota  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  cez deň a  $16\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  počas noci a intenzita osvetlenia  $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Po uplynutí troch týždňov sme semená inokulovali ponorením ich koreňovej sústavy na 90 minút do suspenzie obsahujúcej bakteriálne kultúry *Rhizobium* sp. Inokulované semená (10 ks na jednu nádobu) sme vysadili do nádob sterilizovaných 3,5% roztokom NaClO so substrátom (riečny piesok), ktorý bol sterilizovaný teplom ( $100^{\circ}\text{C}$  po dobu 3 hodín). Nádoby so semenami sme umiestnili do kultivačnej komory s totožným nastavením svetelných, teplotných a vlhkostných pomerov. Vysadené rastliny sme pravidelne (jedenkrát týždenne) zalievali 250 ml LNS média /5/ s pridaním 0,8% vodného roztoku dusičnanu amónneho. Po dvoch mesiacoch sme uskutočnili selekciu rastlín, v nádobách boli ponechané vyrovnané jedince (extrémne prípady boli vylúčené) a zároveň sme zvýšili objem zálievky na 500 ml, kultivačné podmienky ostali nezmenené.

### *Aplikácia alelochemikálií a stanovenie metabolitov*

Po mesiaci kultivácie rastlín sme pristúpili k aplikácii výluhov z čremchy neskorej (*Prunus serotina* Ehrh.) a brestovca západného (*Celtis occidentalis* L.). Aplikovali sme 100 ml 1% výluhu z čremchy neskorej a brestovca západného na listy a 500 ml 1% výluhu z čremchy neskorej resp. brestovca západného v LNS vo forme zálievky. Objem a frekvencia zálievky ostali nezmenené.

Pred aplikovaním výluhov (variant CC – 1. kontrolný pokus) a po ukončení pokusu (varianty K – kontrolný pokus bez aplikácie výluhov; PS – aplikácia výluhu z čremchy neskorej a CO – aplikácia výluhu z brestovca západného) sme odobrali rastlinný materiál (listy a koreňové hľúžky), ktorý sme použili na stanovenie koncentrácie vybraných metabolických parametrov. Zamerali sme sa na spektrofotometrické (Jasco-V630, Japonsko) stanovenie koncentrácie fotosyntetických pigmentov (Lichtenthaler, 1987), ureidov (Knipp & Vašák, 2000), celkových proteínov (Bradford, 1976) a peroxidu vodíka (Mukherjee & Choudhuri, 1983).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V priebehu pokusu sme zaznamenali nárast obsahu fotosyntetických pigmentov (Tab. 1). V prípade kontrolného pokusu bez aplikovania výluhov (K) a variantu s aplikovaním výluhu z čremchy neskorej (PS) došlo k výraznému nárastu obsahu sledovaných parametrov. Vo variante s aplikáciou výluhu z brestovca západného (CO) bol tento nárast najmenší, namerané hodnoty sa od hodnôt prvého kontrolného pokusu (CC) líšili minimálne. Zároveň, v porovnaní s kontrolným pokusom (K) a variantom s aplikáciou výluhu z čremchy (PS), sú zaznamenané hodnoty sledovaných parametrov štatisticky preukazne nižšie. Získané výsledky poukazujú na inhibičné účinky brestovca západného.

Obsah ureidov a celkových proteínov v listoch agátu sa v priebehu pokusu zvýšil (Tab. 2). Najmenší nárast oproti prvému kontrolnému pokusu (CC) sme opäť zaznamenali vo variante s aplikáciou výluhu z brestovca (CO). V oboch sledovaných parametroch je ich obsah štatisticky preukazne nižší v porovnaní s kontrolným pokusom (K). Pri vyhodnotení obsahu ureidov v koreňových hľúžkach agátu sme pozorovali výrazný pokles, ktorý je štatisticky preukazný, vo variante s aplikáciou čremchy neskorej (PS). Vo variante s aplikáciou výluhu z brestovca západného (CO) boli namerané hodnoty obsahu ureidov v hľúžkach podobné tým z kontrolného

pokusu (K). Za vyšším obsahom ureidov v koreňových hlúčkach agátu ovplyvňovaného výluhom z brestovca môže stáť stres spôsobený jeho alelochemikáliami. Stres, napr. vyvolaný dehydratáciou, vedie k akumulácii ureidov v koreňových hlúčkach, tento jav vyvolá spätnú väzbu, ktorej výsledkom je znížená fixácia atmosférického dusíka /6/.

Tab. 1: Obsah fotosyntetických pigmentov v listoch agátu bieleho

Variant	Parameter		
	Karotenoidy [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ]	Chlorofyl b [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ]	Chlorofyl a [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ]
CC	2,0133 $\pm$ 0,2772 a	2,6158 $\pm$ 0,5095 a	8,6732 $\pm$ 1,3823 a
K	3,2777 $\pm$ 0,5779 c	4,7674 $\pm$ 0,8339 b	13,8482 $\pm$ 3,19857 b
PS	2,8673 $\pm$ 0,0422 bc	4,6362 $\pm$ 0,7897 b	12,9857 $\pm$ 1,6954 b
CO	2,4631 $\pm$ 0,3074 ab	3,3545 $\pm$ 0,4074 a	9,6587 $\pm$ 0,9076 a

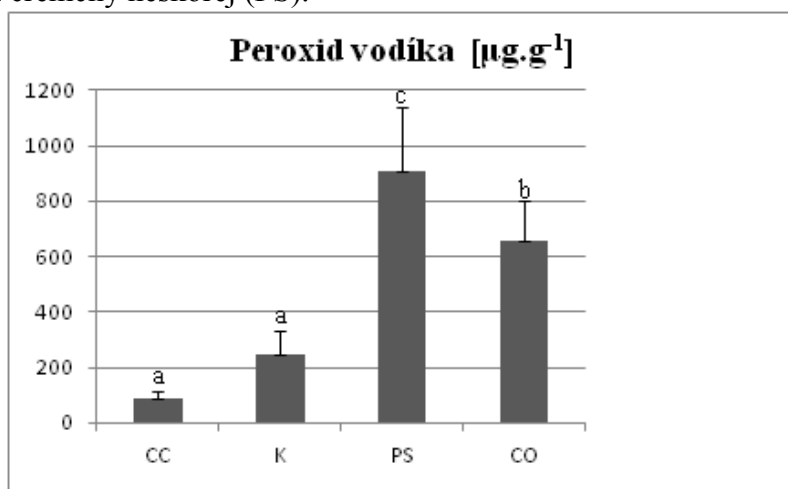
Vysvetlivky: CC – prvý kontrolný pokus, ukončený pred aplikáciou výluhov; K – kontrolný pokus bez aplikácie výluhov; PS – variant s aplikáciou výluhu z čremchy neskorej; CO – variant s aplikáciou výluhu z brestovca západného. Rozdiely v písmenovom označení hodnôt predstavujú štatisticky preukazný rozdiel na 95 % hladine významnosti (LSD test).

Tab. 2: Parametre dusíkatého metabolizmu listov a koreňových hlúčiek agátu bieleho

Variant	Parameter		
	Ureidy [ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ]	Ureidy - hlúčky [ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ]	Bielkoviny [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ]
CC	12,2951 $\pm$ 2,4382 a	1,4006 $\pm$ 0,2859 a	0,2421 $\pm$ 0,0114 a
K	20,9542 $\pm$ 7,9169 b	3,2959 $\pm$ 0,9174 b	0,5116 $\pm$ 0,0548 d
PS	19,7533 $\pm$ 4,8024 ab	2,2028 $\pm$ 0,4963 a	0,4521 $\pm$ 0,0482 c
CO	13,8357 $\pm$ 3,8043 a	3,4253 $\pm$ 0,8319 b	0,3636 $\pm$ 0,0617 b

Rozdiely v písmenovom označení hodnôt predstavujú štatisticky preukazný rozdiel na 95 % hladine významnosti (LSD test).

Obsah peroxidu vodíka v listoch agátu bieleho (graf 1) sa výrazne zvýšil po aplikovaní výluhov z oboch konkurenčných drevín. Štatisticky preukazné rozdiely sme zaznamenali nielen medzi variantmi s aplikáciou výluhov a oboma kontrolnými pokusmi (CC a K), ale aj medzi jednotlivými variantmi výluhov. Výraznejší nárast obsahu peroxidu vodíka bol zistený v prípade aplikácie výluhu z čremchy neskorej (PS).



Graf 1: Obsah peroxidu vodíka v listoch agátu bieleho. Odlišné písmenové označenie výsledkov zodpovedá štatisticky významnému rozdielu na 95 % hladine významnosti

Nami získané výsledky potvrdzují alelopatické účinky brestovca západného /3/. Při naší práci sme v takmer všetkých sledovaných parametroch zaznamenali inhibičné účinky brestovca na agát biely. V prípade čremchy neskorej sme pozorovali mierne inhibičné účinky, štatisticky významné rozdiely v obsahu sledovaných parametrov oproti kontrolnému pokusu sme zaznamenali len v niekoľkých prípadoch (koncentrácia ureidov v koreňových hľúzkach, celkových proteínov a peroxidu vodíka).

#### LITERATÚRA

- /1/ Benčať, T., Ťavoda, P.: Význam agáta bieleného (*Robinia pseudoacacia* L.) a duglasky tisolostej (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) v tvorbe krajiny. Vybrané problémy tvorby krajiny, 2007: 108 – 116.
- /2/ Callaway, R. M., Aschehoug, E. T.: Invasive plants versus their new and old neighbours: a mechanism for exotic invasion. *Science*, 290, 2000: 521 – 523.
- /3/ Csiszár, A.: Allelopathic effects of invasive woody plant species in Hungary. *Acta Silvatica & Lignaria Hungarica*, 5, 2009: 9 – 17.
- /4/ Larson, M. M., Schwarz, E. L.: Allelopathic inhibition of black locust, red clover and black alder by six common herbaceous species. *Forest Science*, 26, 1980: 511 – 520.
- /5/ Serraj, R., Vadez, V., Denison, R. F., Sinclair, T. R.: Involvement of ureides in nitrogen fixation inhibition in soybean. *Plant Physiologist*, 119, 1999: 289 – 296.
- /6/ Sinclair, T. R., Serrej, R.: Dinitrogen fixation sensitivity to drought among grain legume nodules. *Nature*, 378, 1995: 344.
- /7/ Wu, A. P. et al.: Differential belowground allelopathic effects of leaf and root of *Mikania micrantha*. *Tree-Structure and Function*, 23, 2009: 11 – 17.

#### Pod'akovanie

Táto práca vznikla vďaka finančnej podpore vedeckých projektov Vega 2/0159/11, 1/0084/13 a COST TD 1209.

## DYNAMIKA PRODUKČIE ČERSTVÉHO OPADU A HMOTNOSŤ OPADANKOVÉHO HORIZONTU V BUKOVÝCH GEOBIOCENÓZACH

### *PRODUCTION DYNAMICS OF LITTERFALL AND WEIGHT OF LITTER HORIZON IN BEECH GEOBIOCOENOSIS*

Katarína Gašová, Margita Kuklová, Ján Kukla

Ústav ekológie lesa SAV, L. Štúra 2, 960 53 Zvolen, Slovenská republika, gasova@savzv.sk

#### *Summary*

Canopy of forest stands captures a considerable amount of pollutants. They are brought into the soil, cause its changes and they affect properties of the ecosystem. The immission load of ecosystems varies with distance from the source of contamination. For this reason, the research has been conducted in beech geobiocoenoses of the Kremnické and Štiavnické vrchy Mts with a different distance from emission source – the aluminium smelter in Žiar nad Hronom (MP Žiar nad Hronom – 1.5 km, EES Kremnické vrchy Mts – 18 km). The results show that lower values of reaction ( $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ ) of surface humus markedly affected accumulation of organic matter in litter horizons (Oo) at a distance of 1.5 km from the source of contamination. However, this fact did not significantly influence production of fresh litterfall.

*Key words: litterfall, litter horizon, beech geobiocoenosis, imission load*

#### *Súhrn*

Lesné porasty svojim korunovým zápojom zachytávajú z ovzdušia značné množstvo znečisťujúcich látok. Polutanty sa dostávajú do pôd, spôsobujú ich zmenu a podmieňujú zmenu vlastností ekosystému. Imisná záťaž ekosystémov sa mení najmä so vzdialenosťou od zdroja znečistenia. Z tohto dôvodu výskum bol realizovaný v bukových geobiocenózach Kremnických a Štiavnických vrchov s rozdielnou vzdialenosťou od emisného zdroja, hlinikárne v Žiari nad Hronom (MP Žiar nad Hronom –1,5 km, EES Kremnické vrchy –18 km). Z výsledkov je zrejmé, že nižšia reakcia ( $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ ) povrchového humusu výrazne ovplyvnila hromadenie organickej hmoty v opadankových horizontoch (Oo) na ploche vo vzdialenosti 1,5 km od zdroja znečistenia. Predsa však, tento faktor nemal významný vplyv na produkciu čerstvého opadu.

*Kľúčové slová: čerstvý opad, opadankový horizont, bukové geobiocenózy, imisná záťaž*

## ÚVOD

Zložky lesa existenčne a svojimi vlastnosťami závisia od podmienok prostredia, ale zároveň prostredie ovplyvňujú, vytvárajú vlastnú mikroklímu a špecifický priebeh pôdnych procesov. V lesnom ekosystéme najmä dreviny formujúce porast podmieňujú akumuláciu, transformáciu a mineralizáciu humusu množstvom a kvalitou opadu /1/.

Rozklad opadu, ako aj hromadenie vo forme opadankového horizontu významne ovplyvňujú klimatické a antropogénne faktory daného prostredia. Za významný indikátor edaficko-trofických podmienok lesnej geobiocenózy sa považuje reakcia povrchovej vrstvy pôdy /2/, ktorá vytvára ekologické podmienky pre rast rastlín a ovplyvňuje pohyblivosť živín a rizikových prvkov v pôdnom profile. Najmä v oblasti emisných zdrojov sú jej hodnoty viac alebo menej ovplyvňované vlastnosťami polutantov, ktoré prenikajú do lesných ekosystémov. V tejto súvislosti sme sa v práci zamerali na zhodnotenie dynamiky produkcie opadu a opadankového horizontu v nudálnych bukových lesoch (*Fagetum pauper*) s rozdielnou imisnou záťažou.

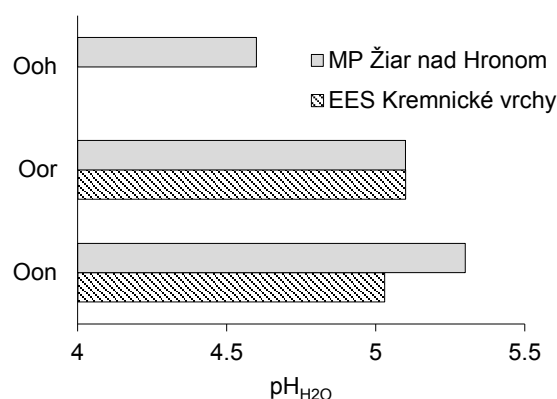
## MATERIÁL A METÓDY

Výskum sme uskutočňovali v rokoch 2014–2015 v geobiocenózach 3. lesného vegetačného stupňa v orografickom celku Kremnických a Štiavnických vrchov. Geobiocenologické plochy boli vybrané v štandardne obhospodarovovaných bukových porastoch zo slt *Fagetum pauper*. MP sa nachádzajú v mierne teplom klimatickom regióne, s priemernou ročnou teplotou na EES Kremnické vrchy 6–7°C, na MP Žiar nad Hronom 7–8°C a priemernými ročnými zrážkami na obidvoch plochách 700–800 mm /3/. MP Žiar nad Hronom v Štiavnických vrchoch bola v minulosti najviac zasiahnutá imisiami z neďalekej hlinikárne v Žiari nad Hronom, od emisného zdroja je vzdialená 1,5 km. Menej imisne postihnutou plochou je Ekologický experimentálny stacionár (EES) v Kremnických vrchoch vzdialený 18,0 km od emisného zdroja.

Pôdy boli klasifikované podľa Societas pedologica Slovaca /4/. Na každej MP bolo rovnomerne po diagonále rozmiestnených 5 opadomerov. Záchytná plocha opadomeru bola 0,5 m<sup>2</sup>. Umiestnené boli v stojane vo výške cca 1,5 m nad zemou. Vzorky opadu sa odoberali v roku 2014 v čase intenzívneho opadu lístia, najmä na jeseň (1.IX., 15.IX., 24.IX., 16.X., 31.X., 12.XI., 1.XII., 15.XII., 31.XII.). Okrem vzoriek opadu sa na MP odoberali aj vzorky opadankového horizontu – Oo (24. september 2014). Vzorky zo subhorizontov opadankového horizontu (Oon, Oor, Ooh) sa odoberali z plôšky 33,33 x 33,33 cm v troch opakovaniach z každej plochy zápisu. Hmotnosť čerstvého opadu a subhorizontov opadankového horizontu sa stanovila gravimetricky, po vysušení pri 80 °C počas 48 hodín, s presnosťou na 0,002 g /5/. Hodnoty aktívnej reakcie sa stanovili potenciometricky – pomocou digitálneho pH-metra Inolab pH 720 (pomer jemnozeme k destilovanej vode 1:2,5).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe výskumu kvantity subhorizontov opadankového horizontu (Oo) sa zistilo oveľa väčšie hromadenie opadu na monitorovacej ploche Žiar nad Hronom v porovnaní s EES Kremnické vrchy. V hemioligotrofnej geobiocenóze MP Žiar nad Hronom môžeme konštatovať spomalenie dekompozície odumretých organických látok najmä v dôsledku nižšej mikrobiálnej aktivity. Najnižšia pH<sub>(H<sub>2</sub>O)</sub> reakcia (Obr. 1) bola zistená v humifikovanom subhorizonte Ooh, najvyššia v nekrotickom subhorizonte Oon tej istej fytocenózy. Skok medzi hodnotami aktuálnej reakcie medzi subhorizontmi Oor a Ooh na MP Žiar nad Hronom môže podľa /6/ odrážať čiastočné zlepšenie imisno-emisnej situácie v okolí hlinikárne.

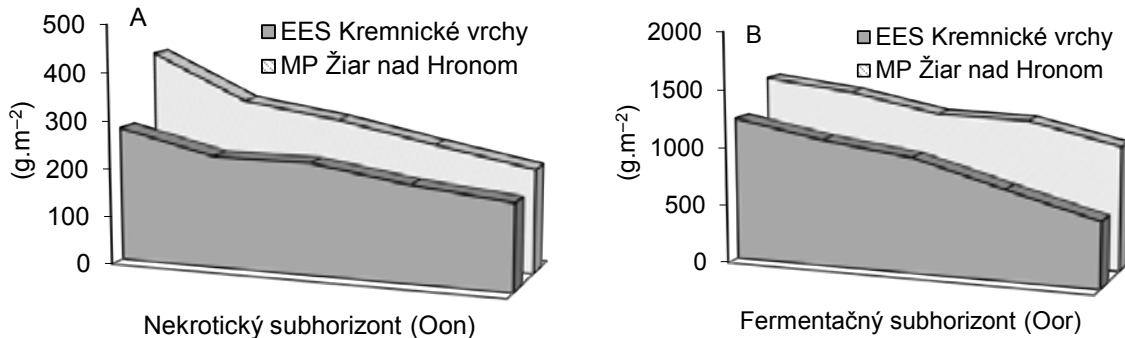


Obr.1: Hodnoty reakcie (pH<sub>H<sub>2</sub>O</sub>) subhorizontov opadankového horizontu (Oon, Oor, Ooh) v študovaných bukových ekosystémoch.

Z výsledkov je zrejmé, že nižšie hodnoty aktuálnej reakcie pôdy (pH<sub>H<sub>2</sub>O</sub> 4,6–4,7) na MP Žiar nad Hronom znížili aktivitu mikróbov a rozklad opadu a vytvoril sa mullový moder s približne 1 cm hrubým subhorizontom Ooh. Suchá hmotnosť tohto subhorizontu dosiahla viac ako 4400 g m<sup>-2</sup> [44 t ha<sup>-1</sup>]. Na tejto ploche je výrazne vyššia aj priemerná hmotnosť fermentačného subhorizontu



Oor 1304,9 g m<sup>-2</sup> [13 t ha<sup>-1</sup>], zatiaľ čo v EES Kremnické vrchy priemerná hmotnosť dosiahla hodnotu 932,2 g m<sup>-2</sup> [9,3 t ha<sup>-1</sup>] (Obr. 2B). Na druhej strane, priemerná hmotnosť subhorizontu Oon hemioligotrofnej a mezotrofnej bukovej geobiocenózy sa takmer neodlišovala (na MP Žiar nad Hronom je približne o 31 g m<sup>-2</sup> vyššia v porovnaní s EES Kremnické Vrchy) (Obr. 2A).

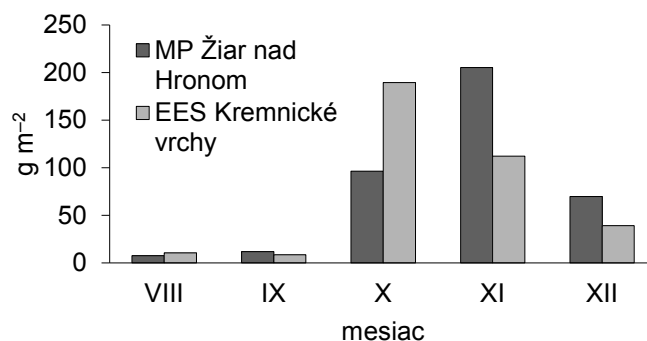


Obr.2: Variabilita hmotnosti nekrotického (A) a fermentačného subhorizontu Oor (B) na pokusných plochách.

Oon

Hmotnosť subhorizontov Oon na MP Žiar nad Hronom varíovala od 216,1 g m<sup>-2</sup> [2,2 t ha<sup>-1</sup>] do 420,2 g m<sup>-2</sup> [4,2 t ha<sup>-1</sup>] s 23 % variačným koeficientom (*vk*), variabilita hodnôt je veľká. Hmotnosť subhorizontov Oon na EES Kremnické vrchy kolísala od 179,6 g m<sup>-2</sup> [1,8 t ha<sup>-1</sup>] do 281,2 g m<sup>-2</sup> [2,8 t ha<sup>-1</sup>] s 15 % variačným koeficientom, variabilita hodnôt je stredná. Podobný trend sme pozorovali aj v prípade fermentačných subhorizontov Oor. Hmotnosť subhorizontov Oor na MP Žiar nad Hronom sa menila od 1072,9 g m<sup>-2</sup> [10,7 t ha<sup>-1</sup>] do 1512,3 g m<sup>-2</sup> [15,1 t ha<sup>-1</sup>], so strednou variabilitou hodnôt (*vk* 11,6 %). Hmotnosť subhorizontov Oor na EES Kremnické vrchy dosiahla hodnoty od 564,9 g m<sup>-2</sup> [5,4 t ha<sup>-1</sup>] do 1236,8 g m<sup>-2</sup> [12,4 t ha<sup>-1</sup>] s približne 25,5 % variačným koeficientom.

Dynamika hmotnosti čerstvého opadu v študovaných bukových ekosystémoch je uvedená na Obr. 3. Výraznejšie rozdiely medzi plochami môžeme pozorovať v mesiacoch október až december. V novembri a decembri sa najviac organickej hmoty formou opadu drevín dostáva do pôdy na MP Žiar nad Hronom. Naopak, na ploche ďalej od zdroja emisií sa najvyššia tvorba opadu (189,3 g m<sup>-2</sup>) zistila v októbri. Z výsledkov je vidieť, že tvorba opadu je ovplyvňovaná viacerými faktormi (napr. štruktúra porastu, klimatické, edafické faktory, reakcia na znečistenie atmosféry). Podobne Paluch a Gruba /7/ pozorovali, že nárast hustoty borovice v jedľových porastoch spôsobil vyššiu hrúbku opadankového horizontu (Oo). Borovica v porovnaní s jedľou mala výrazný vplyv na zníženie reakcie (pH<sub>H2O</sub>) Oo horizontu. Buk rastúci v jedľovom poraste mal zase slabší účinok na pokles vlhkosti opadankového horizontu v porovnaní s jedľou a výrazný vplyv na zvýšenie reakcie Oo horizontu.



Obr.3: Dynamika hmotnosti čerstvého opadu v študovaných bukových ekosystémoch.

**LITERATÚRA**

- /1/ Šimková, I., Kuklová, M., Kukla, J.: Accumulation of  $C_t$  a  $N_t$  in humus and mineral soil layers: the effect of change of tree species composition in nudaal beech forest: *Folia oecologica*, 41, 2014, 82–91.
- /2/ Kukla, J.: The direct determination of the geobiocen edaphic-trophic orders and interorders: *Ekológia*, 12, 1993, 373–385.
- /3/ Miklós, L., Hrnčiarová, T.: Atlas krajiny Slovenskej republiky. 1. vydanie, MŽP SR Bratislava, SAŽP Banská Bystrica, 2002.
- /4/ Societas pedologica slovacica: Morfogenetický klasifikačný systém pôd Slovenska. Základná referenčná taxonómia, Druhé upravené vydanie. Bratislava: NPPC – VÚPOP Bratislava, 2014, 96 p.
- /5/ Dykyjová, D. et al.: Metody studia ekosystémů. Academia, Praha, 1989, 690 p.
- /6/ Kuklová, M., Kukla, J., Sýkora, A.: Obsah  $C_t$  a  $N_t$  v pôde a v nadzemnej časti druhu *Dentaria bulbifera* L. v imisne ovplyvnených bukových ekosystémoch. In – Bláha, L., Hnilička, F. (eds): Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2011. Sborník recenzovaných příspěvků. VÚRV, ČZU, Praha, 52–57.
- /7/ Paluch, J. G., Gruba, P.: Effect of local species composition on topsoil properties in mixed stands with silver fir (*Abies alba* Mill.): *Forestry*, 85, 2012, 413–426.

**Pod'akovanie**

Táto práca bola podporovaná Vedeckou grantovou agentúrou MŠ SR a SAV (projekt č. 2/0027/13).

## **TĚKAVÉ NÍZKOMOLEKULÁRNÍ ORGANOCHLOROVANÉ LÁTKY Z PŘÍRODNÍCH A ANTROPOGENNĚ OVLIVNĚNÝCH EKOSYSTÉMŮ**

### ***LOW MOLECULAR WEIGHT VOLATILE ORGANOCHLORINE COMPOUNDS FROM NATURAL AND ANTHROPOGENICALLY INFLUENCED ECOSYSTEMS***

Sándor T. Forczek<sup>1</sup>, Josef Holík<sup>1</sup>, Luděk Rederer<sup>2</sup>, Martin Ferenčík<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Ústav experimentální botaniky Akademie věd ČR, Izotopová laboratoř, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, Česká republika, alex067@biomed.cas.cz

<sup>2</sup> Povodí Labe s.p., Víta Nejedlého 951, CZ-50003 Hradec Králové, Česká republika

<sup>3</sup> Ústav environmentálního a chemického inženýrství, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, CZ-53210 Pardubice, Česká republika

#### ***Summary***

In the biogeochemical cycle of chlorine, chlorinated compounds participate in natural and anthropogenically influenced processes forming also compounds, which can be identical to chlorinated pollutants and determined by AOX (adsorbable organic halogens) method. Volatile organochlorines are in the center of interest due to their toxicity and possible role in degradation of atmospheric ozone. Some volatile chlorinated hydrocarbons are both reactive and toxic, such as chloroform, which also has natural and anthropogenic sources and can be formed in abiotic and biotic processes. In this study the occurrence of chloroform and AOX is determined in a natural clean environment at the Hamry water reservoir, Czech Republic. Furthermore, AOX and chloroform concentrations will be evaluated in correlation with meteorological and physico-chemical conditions of water.

*Key words: chloroform, AOX, volatile chlorinated hydrocarbons, chlorine*

#### ***Souhrn***

V biogeochemickém cyklu chloru se chlorované sloučeniny podílí na přírodních i lidmi ovlivněných procesech vznikem sloučenin, které mohou být identické s chlorovanými polutanty, stanovovanými metodou AOX (adsorbovatelné organické halogeny). Těkavé chlorované uhlovodíky jsou v centru zájmu vzhledem k jejich toxicitě a možné úloze při rozpadu atmosférického ozonu. Některé těkavé chlorované uhlovodíky jsou reaktivní a zároveň toxické, např. chloroform, který má antropogenní i přírodní zdroje a může vznikat abiotickými i biotickými procesy. V této studii je sledován výskyt chloroformu a AOX v přírodně čistém prostředí v okolí vodní nádrže Hamry. Dále je koncentrace AOX a chloroformu vyhodnocena v korelaci s meteorologickými a fyzikálně-chemickými vlastnostmi vody.

*Klíčová slova: chloroform, AOX, těkavé chlorované uhlovodíky, chlor*

## **ÚVOD**

AOX – adsorbovatelné organicky vázané halogeny představují skupinu organických látek obsahující halogeny, především chlor, které se z vodního mírně kyselého roztoku adsorbují na aktivní uhlí a po spálení je stanoven obsah halogenů mikrocoulometrickou metodou. Původně měly jako skupinový parametr charakterizovat znečištění vod látkami antropogenního původu, především pesticidy (jako byly hojně používány insekticidy DDT, lindan, herbicid 2,4-D, atrazin nebo kyselina trichloroctová), nebo ukázat znečištění životního prostředí chlorovanými odpadními látkami třeba z bělení celulosy, v elektrotechnice používanými PCB nebo chlorovanými rozpouštědly jako je perchlorethylen a methylchloroform. Z toho je vidět, že látky stanovitelné metodou AOX byly dlouho považovány výlučně za průmyslové produkty.

V osmdesátých letech se začal klást velký důraz na kvalitu životního prostředí. Ve Skandinávii i jinde ve světě se zjistilo, že v povrchových vodách zalesněných a antropogenní činností nezatížených oblastí bez aplikací pesticidů a dalších xenobiotik se nacházejí vysoké hodnoty AOX, dosahující desítek až stovek  $\mu\text{g/L}$ . Podrobným šetřením se však prokázalo, že chlorace probíhá v lesní půdě především za katalýzy mikrobiálními exoenzymy, zejména chloroperoxidázami, v přítomnosti chloridových iontů. Mezi tyto enzymy patří chloroperoxidázy mikroorganismů, hub i nižších rostlin, které způsobí přeměnu chloridu na kyselinu chlornou. Chlorid se sem dostává atmosférickým přenosem z oceánů nebo pochází z antropogenních zdrojů (spalování uhlí, solení silnic). Není chemicky inertní látkou, jak se dříve předpokládalo a je relativně brzy vázán v organických látkách. Tvorba různých typů chlorovaných látek v lesní půdě vede ke vzniku sloučenin nebo struktur snadněji degradovatelných a lépe rozpustných ve vodě.

Detailní kvalitativní analýza přírodních chlorovaných látek ukazuje, že pod pojmem AOX jsou zahrnuty jak velké molekuly: chlorované humínové a fulvokyseliny, tak chemicky jednodušší látky, jako jsou chloroctové kyseliny, chloroform, chlorfenoly, chloranisoly a další chlorované aromáty<sup>3,4</sup>. Velké molekuly pravděpodobně nejsou zdravotně závadné, ale některé z menších molekul mohou být toxické. Role chloru v přírodě je aktivní, chlorid reaguje s organickými látkami v půdě a tvoří součást komplexu bio-geochemického cyklu chloru.

Známé jednodušší chlorované sloučeniny jako třeba chloroctové kyseliny a chloroform jsou poměrně dobře detekovatelné<sup>3,5,6</sup>, jejich vznik byl prokázán v lesní půdě za pomoci radioizotopů chloru Cl-36 a uhlíku C-14. Další, v půdě vznikající chlorované sloučeniny, např. ve vodě rozpustné chlorované fulvokyseliny a chlorované aromatické látky pocházející z ligninu, bývají obsaženy v odtoku z lesních ekosystémů. Tyto látky jsou obtížně charakterizovatelné, a jsou měřené jejich celkový obsah pomocí metody AOX, v literatuře udávané v mezích 200-1000 mg Cl/kg půdy. Látky AOX jsou úměrné celkovému obsahu uhlíku v půdě. Ve vodě odtékající z lesního ekosystému do rezervoárů pitné vody mohou tak tyto látky přispívat ke zvyšování obsahu AOX a tak pravděpodobně ke zhoršování její kvality. Cílem této práce bylo sledovat chlorované látky vytékající z jehličnatého lesa do vodárenské nádrže, a zjistit jednotlivé faktory působící na jejich tvorbu i degradaci.

## MATERIÁL A METODY

Pro naše studie byly vybrána odběrová místa shodná s odběrovými místy pro dlouhodobý monitoring kvality vody laboratořemi Povodí Labe, s.p. na vodní nádrži Hamry a na jejích přítocích (Povodí Labe 2008<sup>2</sup>). Dvě místa byly na Krejcarském potoku (č. 13, 8), jedno na Chrudimce (č. 6) a na vodní nádrži Hamry (č. 1) před vstupem do úpravní vody (Obr. 1.). Z hlediska studia vzniku chlorovaných organických látek byly odběrová místa vybraná v řadě, od vzniku látek s předpokládaným vyšším obsahem celkového uhlíku i AOX až po vodu použitou do úpravárenského procesu. Pro stanovení AOX ve vzorcích vody byla použita metoda podle ČSN EN ISO 9562, stanovení celkového uhlíku (TOC) podle ČSN EN 1484, analýzy provedla zkušební laboratoř Povodí Labe akreditovaná ČIA č. 1264. Chloroform byl stanovován metodou plynové chromatografie s ECD detektorem SPME vzorkovací technikou (Supelco 100  $\mu\text{m}$  PDMS) na plynovém chromatografu Varian CP-3800 (Walnut Creek, USA), kapilární kolonou VF-1ms (15 m, ID 0,25 mm,  $d_f$  0,25  $\mu\text{m}$ ), při průtoku 1 ml/min He. SPME vzorky byly sbírány z head space prostoru nad 10 ml vzorku v 20 ml nádobce<sup>1</sup>.



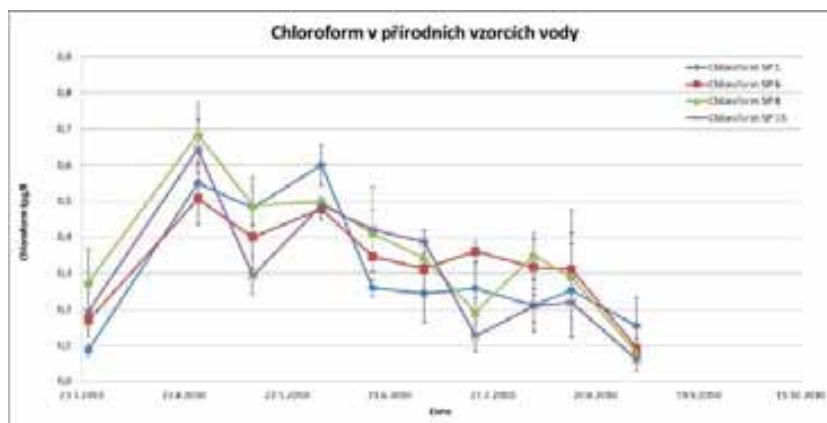
Obr. 1. Schéma profilů monitoringu jakosti vody na vodárenské nádrži Hamry a jejich přítocích

## VÝSLEDKY A DISKUSE

V sledovaném období došlo některých případech k překročení přípustných hodnot koncentrací AOX pro zdroje pitné vody, tj. 30  $\mu\text{g/l}$  (Obr. 2.). Nicméně odběrová místa 13, 8 a 6 neslouží k odběrům pro přípravu pitné vody, jsou jen přítoky vodní nádrže Hamry. Hodnoty AOX byly úměrné nalezeným hodnotám TOC. Nalezené koncentrace těkavého chloroformu vznikajícího chlorací půdní organické hmoty rovněž potvrzují nižší než maximálně přípustné hodnoty (30  $\mu\text{g/l}$  pro pitnou vodu, Obr. 3.), a zároveň také ukazují, že jeho těkavost dále snižuje jeho koncentraci v surové vodě. Mikrobiální chlorace půdní organické hmoty studovaná dříve také in vitro pomocí radiostopovací techniky s použitím chloridu-36 vede k tvorbě nízkomolekulárních látek, z nichž byly identifikovány dichlor- a trichloroctová kyselina<sup>6</sup> a těkavé látky jako např. chloroform. Přítomné vznikající chloroctové kyseliny jsou mikrobiálně rychle odbourávány, proto přítomnost těchto látek se v surové vodě nedá prokázat. Předmětem zájmu byly rovněž toxické chlorfenoly produkované mikroorganismy. Tyto jsou pravděpodobně v lesní půdě ihned degradovány anebo tvoří asociáty s humínovými látkami, v odebraných vzorcích vody nebyly nalezeny. Identifikace a obsah nízkomolekulárních těkavých látek<sup>3</sup> v povrchových vodách je předmětem dalšího výzkumu.



Obr. 2. Obsah AOX v povrchových vodách



Obr. 3. Obsah chloroformu v povrchových vodách

Dosavadní poznatky získané monitoringem AOX v povodí vodní nádrže Hamry u Hlinska vedou k závěru, že hodnoty AOX, které indikují občasné dosažení či překročení stanovených limitů, jsou způsobeny nejpravděpodobněji přírodními procesy. Je třeba porozumět a důsledně oddělovat biogeochemický cyklus chloru a přírodní procesy probíhající v lesním ekosystému od antropogenních vlivů a hrozeb, pocházejících z lidských aktivit, abychom byli schopni posoudit možná zdravotní rizika pro člověka při využití vodních nádrží, jako jsou Hamry a nádrží obdobných jako zdrojů pitné vody. Zároveň by to mělo umožnit snadnější posouzení nevhodnějších vodárenských technologií pro úpravu pitné vody.

## LITERATURA

- 1/ Cho DH, Kong SH, Oh SG (2003) Analysis of trihalomethanes in drinking water using headspace-SPME technique with gas chromatography. *Water Research* 37:402-408.
- 2/ Ferenčík M, Rederer L, Pešava J, (2008) Adsorbovatelné organické halogeny (AOX) a organické látky (CHSK<sub>Mn</sub>) v povodí vodárenské nádrže Hamry. *Povodí Labe, Hradec Králové*.
- 3/ Forczek ST, Laturus F, Doležalová J, Holík J, Wimmer Z (2015) Emission of Climate Relevant Volatile Organochlorines by Plants Occurring in Temperate Forests. *Plant Soil Environ* 61:1-10.
- 4/ Haselmann KF, Ketola RA, Laturus F, Lauritsen FR, Gron C (2000a) Occurrence and formation of chloroform at Danish forest sites. *Atmos Environ* 34:187-193.
- 5/ Laturus F, Haselmann KF, Borch T, Gron C (2002) Terrestrial natural sources of trichloromethane (chloroform, CHCl<sub>3</sub>) - An overview. *Biogeochemistry* 60:121-139.
- 6/ Matucha M, Clarke N, Lachmanová Z, Forczek ST, Fuksová K, Gryndler M (2010) Biogeochemical cycles of chlorine in the coniferous forest ecosystem: practical implications. *Plant Soil Environ* 56:357-367.

## Poděkování

Uvedená práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury České republiky 13-11101S, Akademie věd České republiky, Krajského úřadu Pardubice, Vodárenské společnosti Chrudim, a.s. a Vodovodům a kanalizacím Chrudim, a.s. Děkujeme laboratořím Povodí Labe, s.p. za provedení analýz AOX a TOC.

## SEZÓNNA DYNAMIKA TRANSPIRAČNÉHO PRÚDU SMREKA OBYČAJNÉHO V REAKCII NA SUCHO V PODMIENKACH RIADENÉHO EXPERIMENTU V KOSTELCI NAD ČERNÝMI LESY

### *SEASONAL SAP FLOW DYNAMICS OF NORWAY SPRUCE IN RESPONSE TO DROUGHT UNDER CONDITIONS OF CONTROLLED ROOF EXPERIMENT IN KOSTELEEC NAD ČERNÝMI LESY*

Marek Ježík, Miroslav Blaženec, Denisa Sedmáková, Rastislav Jakuš  
Ústav ekológie lesa SAV, Štúrova 2, 960 53 Zvolen, Slovenská republika, jezik@savzv.sk

#### *Summary*

One part of mature spruce stand was covered by roof and the second one was left as the control plot. On the selected 6 Norway spruce individuals for each part we performed the continuous sap flow measurements. The measurements of basic meteorological variables were performed on nearby clearing. During the whole season the sap flow of roof covered individuals was markedly suppressed. On the control plot we recorded very tight positive relations of sap flow to increasing potential evapotranspiration and vapour pressure deficit, which were reduced with decreasing soil water potential. These relations mostly disappeared on roof covered plot.

*Key words: Picea abies, sap flow, soil water potential, water stress*

#### *Súhrn*

V dospelom smrekovom poraste bola jedna jeho časť zastrešená a druhá ponechaná ako kontrolná plocha. Počas sezóny 2011 v rámci oboch plôch prebiehali na vybraných 6 jedincoch kontinuálne merania transpiračného prúdu. Merania základných meteorologických charakteristík prebiehali na blízkej otvorenej ploche. Transpiračný prúd zastrešených jedincov bol počas celej sezóny výrazne utlmený. Na kontrolnej ploche sme zaznamenali tesnú závislosť a nárast transpiračného prúdu so zvyšujúcou sa potenciálnou evapotranspiráciou a sýtoštným doplnkom, ktorý sa zmiernoval s klesajúcim vodným potenciálom pôdy. Na zastrešenej ploche sa tieto vzťahy prakticky vytrácali.

*Kľúčové slová: Picea abies, transpiračný prúd, vodný potenciál pôdy, vodný stres*

## ÚVOD

V stredoeurópskych podmienkach je hospodársky najdôležitejšou drevinou smrek obyčajný, najmä pre jeho vysokú produkciu, krátku obnovnú dobu a širokú využiteľnosť dreva. Z uvedených dôvodov smrekové porasty majú často vysoké zastúpenie aj na nepôvodných stanovištiach v nižších nadmorských výškach. Narastajúca frekvencia a intenzita období sucha, spájaných s prebiehajúcou klimatickou zmenou, negatívne ovplyvňuje produktivitu a stabilitu lesných ekosystémov, vrátane smrekových. Pochopenie vzťahov medzi dynamikou pôdnej vody a konzumpciou vody stromom je tak esenciálnou pre súčasný aj budúci manažment lesa [5]. Z uvedených dôvodov sme sledovali reakcie transpiračného prúdu smreka na vodný deficit v podmienkach riadeného experimentu.

## MATERIÁL A METÓDY

Pokus bol založený ako riadený, keď v poraste smreka obyčajného (*Picea abies* L.) č. 446 G12 na území školského lesného podniku v Kostelci nad Černými Lesy bola časť porastu zastrešená aby sa zabránilo prenikaniu zrážkovej vody do pôdy. Druhá časť porastu slúžila ako

kontrolná plocha. Jednalo sa o smrekovú monokultúru s hrúbkou stredného kmeňa 39,1 cm a výškou stredného kmeňa 30,6 m na kontrolnej ploche, resp. 33,5 cm a 30,6 na zastrešenej ploche /7/. Počas sezóny 2011 sme rámci obidvoch plôch na vybraných 6 jedincoch prebiehali kontinuálne merania transpiračného prúdu ( $Q_s$ ) v 20 min. (priemer z 5 min. meraní) intervaloch metódou tepelnej bilancie /2/. Na blízkej otvorenej ploche prebiehali merania úhrnov zrážok, radiácie, teploty a vlhkosti vzduchu, z ktorých sme následne vypočítali hodnoty sýtošného doplnku (VPD) a potenciálnej evapotranspirácie (PET) podľa Penmana /6/ za 1 hodinu. Vodný potenciál pôdy ( $\Psi_w$ ) bol na obidvoch plochách meraný sieťou sadrových sacích bločkou s minimálnou merateľnou hodnotou -1,1 MPa.

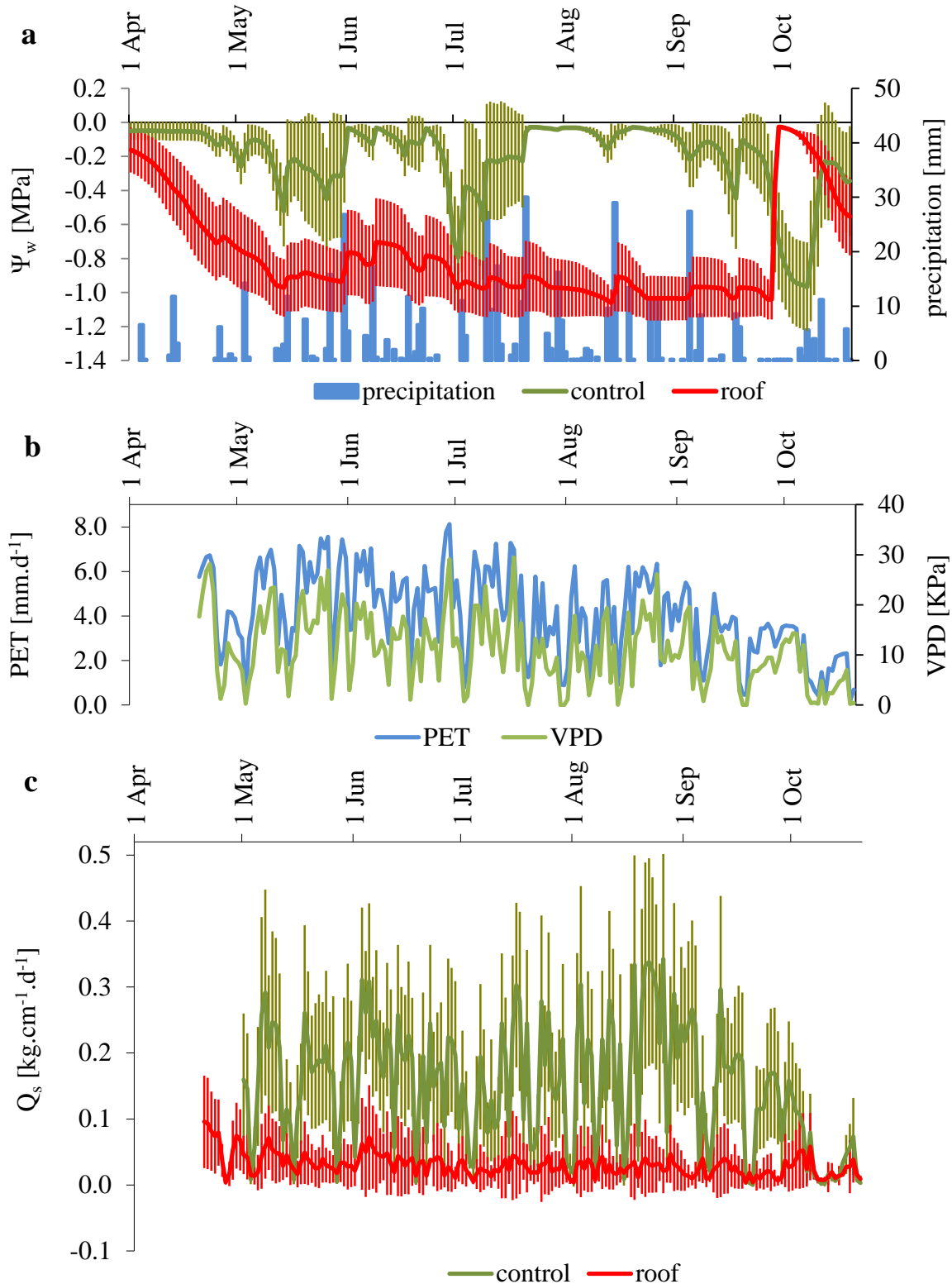
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celkovo bolo vegetačné obdobie 2011 zrážkovo normálne (Obr. 1a), keď v období apríl - september sme zaznamenali 478 mm zrážok, rovnako ako v období máj - 20. október. Vypočítané hodnoty PET predstavovali za obdobie máj-20.september 697 mm (Obr. 1b). Sezónny priebeh  $\Psi_w$  na kontrolnej a zastrešenej ploche bol výrazne odlišný. Môžeme si všimnúť aj irigáciu zastrešenej plochy dňa 29. septembra, práve v období keď dochádzalo k preschýnaniu pôdy na kontrolnej ploche. Priemerný  $\Psi_w$  na kontrolnej ploche dosahoval od mája do 20. októbra -0,23 MPa, na zastrešenej ploche -0,83 MPa.

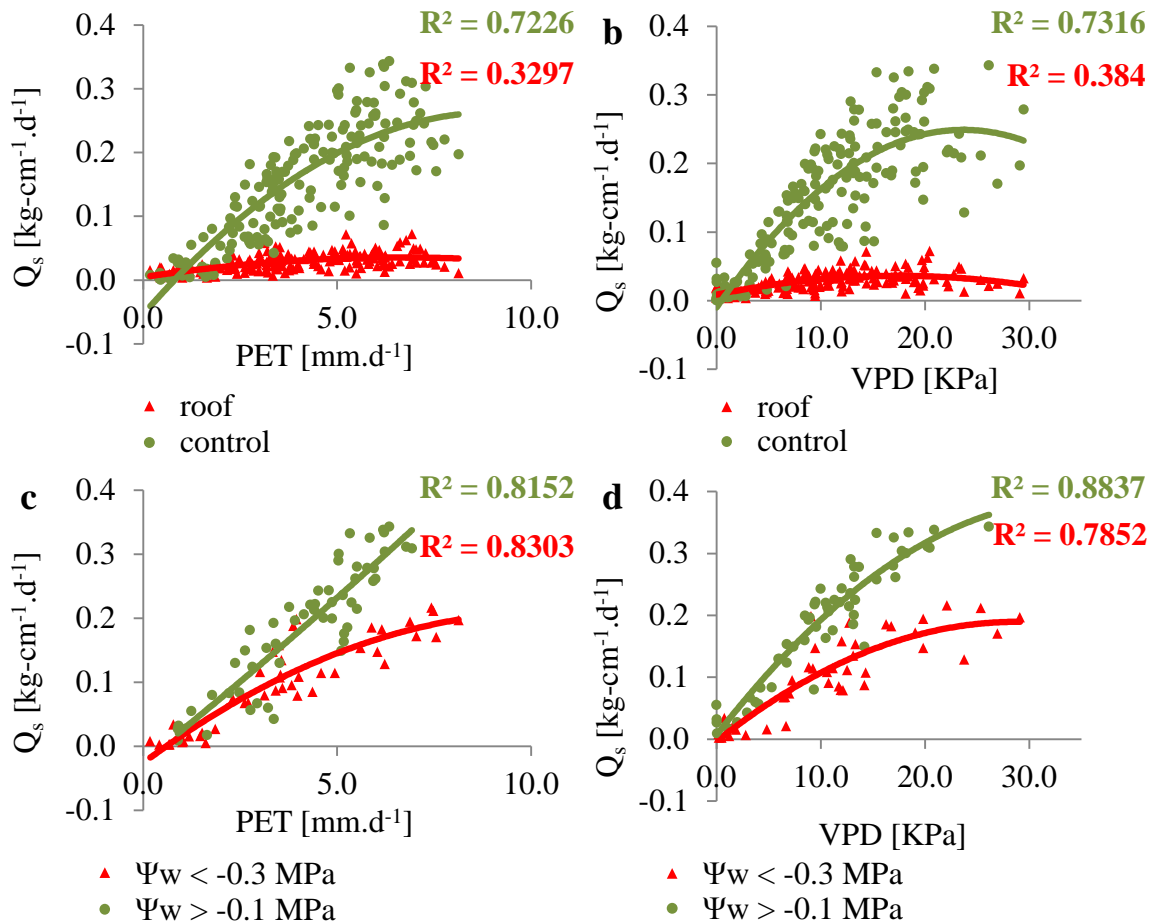
Denné hodnoty transpiračného prúdu jedincov na kontrolnej ploche boli približne na úrovni uvádzanej /3, 4/ (Obr. 1c). Transpiračný prúd jedincov na zastrešenej ploche bol počas celej sezóny výrazne utlmený. Celkovo merané jedince na kontrolnej ploche v období od mája do 20. októbra pretranspirovali 3187 litrov vody, na zastrešenej ploche iba 469 litrov, čo predstavuje iba 14,7 % z kontrolnej plochy. Pri hodnotách mediánu bol rozdiel ešte vyšší, 3114 resp. 246 litrov (7,9 % z kontrolnej plochy).

Zároveň sme zaznamenali výrazné rozdiely vo vzájomných vzťahoch medzi PET, VPD a  $Q_s$  (Obr. 2a, b). Zatiaľ čo na kontrolnej ploche dochádzalo ku kontinuálnemu nárastu transpiračného prúdu so zvyšujúcim sa PET a VPD, ktorý sa zmierňoval s ich narastajúcimi hodnotami, na zastrešenej ploche boli tieto vzťahy zanedbateľné. Na kontrolnej ploche sme zaznamenali na rôznych hladinách  $\Psi_w$  (Obr. 2c, d) veľmi tesné a odlišné reakcie. Pri hodnotách  $\Psi_w > -0.1$  MPa bol vzťah medzi PET a  $Q_s$  lineárny. Pri nižšom  $\Psi_w$  bol nárast transpiračného prúdu s nárastom PET a VPD miernejší. K zmierňovaniu tohto nárastu dochádzalo už pri nižších hodnotách PET a VPD aj keď zďaleka nedošlo k prakticky vytrateniu tohto vzťahu ako v prípade zastrešenej plochy ktorá bola vystavená dlhodobému kontinuálnemu deficitu pôdnej vody. Tieto výsledky sú v súlade s prácami napr. /1, 3, 4/.





Obr. 1. Sezónny priebeh denných úhrnov zrážok a vodného potenciálu pôdy ( $\Psi_w$ ) na kontrolnej a zastrešenej ploche (a), potenciálnej evapotranspirácie (PET) a sýtostného doplnku (VPD) (b) a priemerných denných hodnôt transpiračného prúdu kontrolných a zastrešených jedincov (c). Vertikálne čiary reprezentujú 95% intervaly spoľahlivosti.



Obr. 2. Vzájomné vzťahy medzi transpiračným prúdom, potenciálnou evapotranspiráciou a sýtoštným doplnkom v období od 1. mája do 20. októbra na kontrolnej a zastrešenej ploche (a, b) a vo vybraných dňoch na kontrolnej ploche kedy vodný potenciál pôdy ( $\Psi_w$ ) bol nad hladinou  $-0.1$  MPa resp. pod hladinou  $-0.3$  MPa.

## LITERATÚRA

- /1/ Cienciala E, Lindroth A, Čermák J, Hällgren JE, Kučera J.: The effects of water availability on transpiration, water potential and growth of *Picea abies* during a growing season. *Journal of Hydrology*, 155, 1994: 57–71.
- /2/ Čermák J, Kučera J, Nadezhkina N.: Sap flow measurements with some thermodynamic methods, flow integration within trees and scaling up from sample trees to entire forest stands. *Trees* 18, 2004: 529–546.
- /3/ Ježík, M., Blaženec, M., Letts, G. M., Ditmarová, E., Sitková, Z., Střelcová, K.: Assessing seasonal drought stress response in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) by monitoring stem circumference and sap flow. *Ecohydrology*, 2014: DOI: 10.1002/eco.1536.
- /4/ Ježík, M., Blaženec, M., Střelcová, K., Kovalčíková, D.: Sezónna dynamika transpirácie, rastových procesov a zmien obvodu kmeňov smreka v rastových fázach žrdoviny a kmeňoviny v podmienkach zavlažovacieho pokusu. In *Stres suchom a lesné porasty : aktuálny stav a výsledky výskumu*. TU vo Zvolene, NLC - Lesnícky výskumný ústav, ÚEL SAV, 2011: 154–171.
- /5/ Klein T, Rotenberg E, Cohen-Hilaleh E, Raz-Yaseef N, Tatarinov F, Preisler Y, Ogée J, Cohen S, Yakir D.: Quantifying transpirable soil water and its relations to tree water use dynamics in a water-limited pine forest. *Ecohydrology*, 2012: DOI:10.1002/eco1360.
- /6/ Penman HL.: Natural evaporation from open water, bare soil, and grass. *Proceedings of the Royal Society London Ser A*, 193, 1948: 120–146.
- /7/ Stolariková, R.: Závěrečná zpráva projektu CIGA č. 43150/1313/3109. 2011: s. 40.

## ZMĚNY VODNÍHO POTENCIÁLU U SADEBNÍHO MATERIÁLU BOROVICE LESNÍ PŘI VYSYCHÁNÍ

### *CHANGES OF WATER POTENTIAL OF SCOTS PINE SEEDLINGS DURING DESICCATION*

Jan Leugner, Jarmila Martincová, Evelína Erbanová

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v.v.i., výzkumná stanice Opočno, Na Olivě 550,  
Opočno, leugner@vulhmop.cz

#### *Summary*

Water potential  $\psi$  is an important characteristic physiological quality of planting stock of forest trees. In forestry is often used feature "plant moisture stress" (PMS) which has the same value, but unlike the negative  $\psi$  has a positive sign. Water stress of stem was evaluated in fresh seedlings of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and after 2, 4 and 6 hours of desiccation at the same time with the determination of water content in shoots and roots. PMS has increased in close correlation with decreasing water content during exposure ( $r = -0.775$  for the aboveground part,  $r = -0.830$  for roots). After a two-hour exposure reached moisture stress in most of the seedlings more than 15 bars, which means severe stress. Damage of seedlings was confirmed by results of the root growth potential, where in most of the exposed seedlings no growth of new roots occurred during three weeks in favorable conditions.

*Key words: Scots pine, water potential, plant moisture stress, root growth potential, desiccation*

#### *Souhrn*

Vodní potenciál  $\psi$  je důležitým znakem fyziologické kvality sadebního materiálu lesních dřevin. V lesnictví je často používán znak „vodní stres rostliny - PMS“, který má stejnou hodnotu, ale na rozdíl od záporného  $\psi$  má kladné znaménko. Vodní stres stonku byl hodnocen u čerstvých dvouletých semenáčků borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.) a po 2, 4 a 6hodinovém vysychání zároveň se stanovením obsahu vody v nadzemních částech a v kořenech. Vodní stres se zvyšoval v těsné korelaci s klesajícím obsahem vody během expozice ( $r = -0,775$  pro nadzemní části a  $r = -0,830$  pro kořeny). Po dvouhodinové expozici již vodní stres u většiny semenáčků přesáhl 15 barů, což znamená silný stres. Narušení sazenic potvrzují i výsledky hodnocení růstového potenciálu kořenů, kdy u většiny exponovaných semenáčků nedošlo během 3 týdnů v příznivých podmínkách k žádné obnově růstu kořenů.

*Klíčová slova: borovice lesní, vodní potenciál, vodní stres, růstový potenciál kořenů, vysychání*

## ÚVOD

Vodní potenciál  $\psi$  je důležitým znakem fyziologické kvality sadebního materiálu lesních dřevin. Při pěstování semenáčků v některých zahraničních lesních školkách je měření vodního potenciálu součástí nastavení režimu závlahy. Využíván je i pro načasování otužování a vyzvedávání sadebního materiálu a pro zjištění vodního stresu během manipulace /3/. Nejčastěji používanou metodou je měření vodního potenciálu pomocí tlakové komory. Pro praktické účely je v lesnictví častěji uváděn vodní stres rostliny (PMS), jehož hodnoty odpovídají hodnotám vodního potenciálu xylému. Liší se pouze znaménkem – zatímco vodní potenciál  $\psi$  má hodnoty záporné, vodní stres PMS má stejně veliké hodnoty kladné. Představuje sílu, jakou je voda poutána v pletivech rostlin /5/. Hodnoty vodního potenciálu nebo vodního stresu jsou uváděny v barech nebo MPa, kdy 1 MPa = 10 barů /2/. Problematickou otázkou je stanovení limitních hodnot

vodního stresu, protože jeho hodnoty se mohou lišit podle druhů dřevin a vykazují denní i sezonní dynamiku.

Základním kvalitativním znakem sadebního materiálu je růstový potenciál kořenů (RGP). Hodnotí intenzitu obnovy růstu nových kořenů po přesazení semenáčků do optimálních růstových podmínek /4/. Poskytuje nejspolehlivější představu o vitalitě rostlin. Nevýhodou zjišťování růstového potenciálu kořenů je doba trvání testů. Vzhledem k tomu, že výsledky jsou známy až během několika týdnů, není možno adekvátně a rychle reagovat na okamžitý fyziologický stav rostlin. Velmi často je používán jako srovnávací metoda při hodnocení různých znaků kvality sadebního materiálu.

Na jaře 2015 byl uskutečněn rozsáhlý pokus s hodnocením fyziologického stavu semenáčků a sazenic jehličnatých dřevin různými metodami při aplikaci stresů (vysychání, mraz) v souvislosti s jarním uvolňováním dormance. Následující příspěvek zahrnuje hodnocení obsahu vody a vodního stresu PMS dvouletých dormantních semenáčků borovice lesní vystavených po různé dlouhou dobu vysychání. U stejných variant expozice byla hodnocena vitalita semenáčků pomocí měření růstového potenciálu kořenů (RGP).

## MATERIÁL A METODY

Pro hodnocení reakce na stres suchem byly použity dvouleté semenáčky borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.) vyzvednuté ze záhonu v lesní školce 4. 3. 2015. Varianty představovaly čerstvé rostliny a rostliny vystavené osychání - volně rozložené na policích v místnosti po dobu 2, 4 a 6 hodin. Každá varianta obsahovala 20 jedinců pro hodnocení vodního stresu a 20 jedinců pro hodnocení růstového potenciálu kořenů. Teplota místnosti během expozice semenáčků byla  $23 \pm 1,5$  °C, vlhkost vzduchu  $38 \pm 8$  %. Po ukončení expozice byly semenáčky uloženy do PE pytle a jednotlivě odebírány pro měření. Horní část terminálního výhonu byla vždy použita pro měření PMS tlakovou komorou (Model 1000 od PMS Instrument Company, Oregon, USA), spodní část výhonu a kořenový systém byly použity pro gravimetrické stanovení obsahu vody.

Odříznutá terminální část byla umístěna pomocí pryžového těsnění do tlakové komory přístroje s řeznou plochou vyčnívající přes komorové víko. Redukčním ventilem byl pomalu zvyšován tlak v komoře, dokud se na řezu neobjevila první kapička vody. Tlak plynu potřebný pro vytlačení kapky vody byl zaznamenán jako hodnota vlhkostního stresu rostliny PMS.

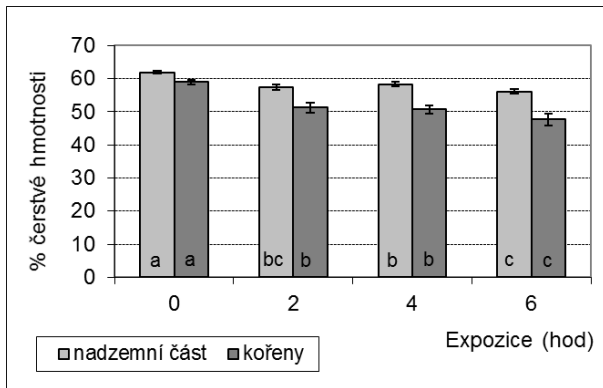
Protože měření PMS u dvouletých semenáčků borovice bylo destruktivní, pro zjišťování růstového potenciálu kořenů bylo použito jiných 20 jedinců z každé varianty expozice. Tyto semenáčky byly vysazeny do přepravek se substrátem umístěných do příznivých růstových podmínek v klimatizované místnosti (teplota  $23 \pm 5$  °C, vlhkost vzduchu 65 - 90 %, světelná perioda upravena přisvětlováním 45W výbojkami na 16 hodin, vlhkost substrátu 60 – 80 %). Růstový potenciál kořenů byl hodnocen po 3 týdnech standardní metodou používanou v akreditované laboratoři Školkařská kontrola. Po vyzvednutí a promytí byl zjištěn počet nově rostoucích kořenů delších než 5 mm, délka nejdelšího nového kořene a počet nových kořenů kratších než 5 mm. Zároveň bylo hodnoceno i rašení terminálních pupenů.

Pro statistické hodnocení byly použity výpočty intervalů spolehlivosti (confidence) a lineární regrese v aplikaci Excel, průkaznost rozdílů byla hodnocena jednofaktorovou analýzou variance a párovým porovnáváním Sheffého metodou v aplikaci QC expert.

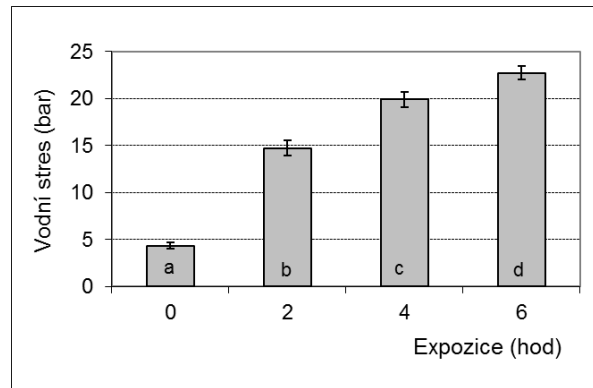
## VÝSLEDKY A DISKUSE

S prodlužující se dobou expozice semenáčků klesal obsah vody v nadzemních částech a ještě výrazněji v kořenech (obr. 1). Kořeny jsou mnohem citlivější k vysychání, protože, na rozdíl od jehlic a listů, nemají žádnou ochrannou voskovou vrstvu a průduchy, které by je chránily před ztrátami vody /6/. Bylo zjištěno, že vystavení kořenů vysychání snížilo vodní potenciál nadzemních částí více než expozice nadzemních částí samotných /1/.

S prodlužující se dobou expozice se zvyšoval tlak potřebný pro vytlačení vody z řezné plochy semenáčků v tlakové komoře - PMS (obr. 2). U všech čerstvých (neexponovaných) semenáčků byly hodnoty PMS nižší než 5 barů, což jsou hodnoty uváděné jako nízký stres s předpokladem následného rychlého růstu /2/. Po 2 hodinách expozice dosahovaly hodnoty PMS 10 až 17 barů, po 4 hodinách se blížily k 20 barům a po 6 hodinách dosahovaly 20 až 25 barů. Podle dostupných údajů hodnoty vyšší než 10 barů mohou indikovat zpomalení růstu a hodnoty nad 15 barů jsou považovány za silný stres naznačující potenciální poškození rostlin /2, 5/.



Obr. 1: Změny obsahu vody v nadzemních částech a kořenech semenáčků borovice během expozice. Úsečky znamenají intervaly spolehlivosti. Rozdílná písmena ve sloupcích znamenají rozdíly mezi dobami expozice průkazné na 5% hladině významnosti.



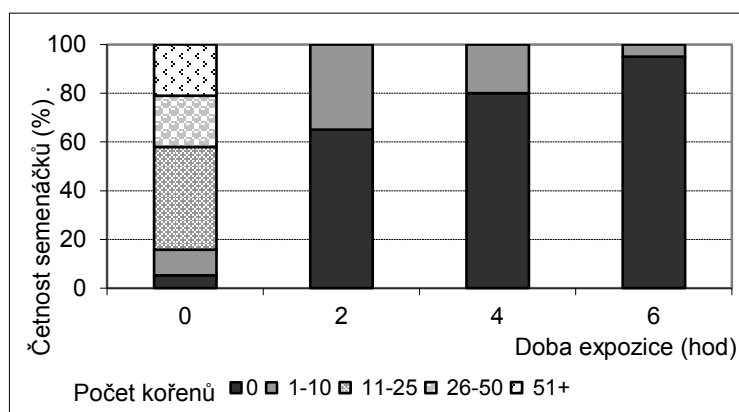
Obr. 2: Změny PMS semenáčků borovice během expozice. Úsečky znamenají intervaly spolehlivosti. Rozdílná písmena ve sloupcích znamenají rozdíly mezi dobami expozice průkazné na 5% hladině významnosti.

Vysoce průkazný vztah byl zjištěn mezi vodním stresem a obsahem vody v nadzemních částech ( $r = -0,775$ ) a v kořenech ( $r = -0,830$ ).

Předpokládané omezení růstu rostlin se zvýšenými hodnotami PMS potvrdily výsledky hodnocení růstového potenciálu kořenů (obr. 3). Uvádí se, že vodní stres PMS není v korelaci s růstovým potenciálem kořenů /2/. U dvouletých semenáčků borovice v našem pokuse nebyly tyto charakteristiky měřeny na stejných jedincích, hodnoceny proto byly pouze souhrnné údaje z jednotlivých variant expozice.

V porovnání s čerstvými nestresovanými jedinci vytvořily semenáčky vystavené dvouhodinové expozici (PMS vyšší než 10 barů) během tří týdnů v příznivých podmínkách jen minimální množství nových kořenů. U variant vystavených 4 a 6hodinové expozici pak byl růst nových kořenů ještě slabší. Po výsadbě takto stresovaných semenáčků při běžném zalesňování je možno očekávat vysoký úhyn a ztráty na přírůstu.

Výsledky potvrzují údaje o tom, že hodnoty vodního stresu PMS jsou účinným indikátorem zhoršené kvality sadebního materiálu zejména v případech, kdy byly sazenice vystaveny delšímu vysychání nebo je vodní stres velmi vysoký /2, 5/.



Obr. 3: Podíl semenáčků s různou obnovou kořenů v příznivých podmínkách (růstový potenciál kořenů) v závislosti na době expozice

### LITERATURA

- /1/ Coutts, M. P.: Effects of root or shoot exposure before planting on the water relations, growth, and survival of Sitka spruce. Canadian Journal of Forest Research, 11, 1981: 703 - 709.
- /2/ Lopushinski, W.: Seedling moisture status. In: Target Seedling Symposium: Proc., Comb. Meet. West. For. Nursery Assoc. August 13-17, 1990. Rosenberg, Oregon. Gen. Techn. Rep. RM-200. Ed. R. Rose, S. J. Campbell, T. D. Landis. Fort Collins (Colorado), Rocky Mount. For. and Range Exp. Stat. 1990: 123 – 138.
- /3/ Mohammed, G. H.: The status and future of stock quality testing. New Forests 13, 1997: 491 – 514.
- /4/ Ritchie, G. A., Landis, T. D.: Seedling quality tests: Root growth potential. Forest Nursery Notes, Winter 2003. USDA Forest Service Cooperative Forestry. Portland, Oregon (USA) 2003: nestr.
- /5/ Ritchie, G. A., Landis, T. D.: Seedling Quality Tests: Plant Moisture Stress. Forest Nursery Notes, Summer 2005. USDA Forest Service Cooperative Forestry. Portland, Oregon (USA) 2005: 6 – 12.
- /6/ The Container Tree Nursery Manual. Volume 7: Seedling Processing, Storage, and Outplanting. Dostupné na: <http://www.rngr.net/publications/ctnm/volume-7>

### Poděkování

Příspěvek vznikl na základě výzkumu, který je podporován podnikem Lesy České republiky, s. p. („Nalezení provozní metody na ověřování životaschopnosti sazenic při a po výsadbě – aktuální fyziologický stav“.)

## Postery

## VLIV HNOJENÍ NA MRAZUVZDORNOST ČTYŘ ODRŮD PŠENICE OZIMÉ

### *EFFECT OF FERTILIZATION ON COLD HARDINESS OF FOUR WINTER WHEAT VARIETIES*

Mikuláš Madaras, Markéta Mayerová, Ilja Tom Prášil

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně, madaras@vurv.cz

#### *Summary*

Influence of fertilization on cold hardiness of four winter wheat varieties was tested by the method of direct freezing. Plants were grown and acclimated outdoor in a nutrient-poor soil with treatments: unfertilized control, N, K, NK and NPK. Differences between varieties, as well as between treatments were statistically significant. The highest cold hardiness was observed in control treatment. On general, fertilization had a negative effect on cold hardiness. Varietal differences in cold hardiness decreased with increasing fertilizer application rate.

*Key words: Triticum aestivum, nitrogen, potassium, salinity, stress*

#### *Souhrn*

Metodou přímého mrazového testu jsme testovali vliv hnojení na mrazuvzdornost rostlin čtyř odrůd pšenice ozimé. Rostliny byly předpěstovány v živinově chudé půdě ve variantách kontrola, N, K, NK a NPK. Statisticky průkazně se projevíly jak rozdíly mezi odrůdami, tak i mezi variantami hnojení. Nejvyšší mrazuvzdornost vykazovala nehnojená kontrola. Hnojení ovlivnilo mrazuvzdornost rostlin ve všech variantách negativně, přičemž se zvyšující se dávkou hnojiv se odrůdové rozdíly v mrazuvzdornosti snižovaly.

*Klíčová slova: Triticum aestivum, dusík, draslík, hnojiva, zasolení, stres*

## ÚVOD

Odolnost pšenice ozimé vůči zimním stresům není statická vlastnost, ale závisí na mnoha faktorech, a v průběhu zimy se postupně vytváří procesem otužování /8/. Při otužování jsou důležité jak změny povětrnostních podmínek, tak i další faktory, z nichž jedním je zásobenost půdy živinami. Pokud během otužování působí na rostliny jakýkoliv další druh stresu (deficit živin, salinita, sucho apod.), jeho interference s procesem otužování může způsobit, že u rostliny není dosažena maximální, potenciální mrazuvzdornost, která je geneticky založena /7/. Mezi jednotlivými odrůdami pšenice existují významné rozdíly v odolnosti vůči působení mrazu /6/. U neotužených rostlin se tyto rozdíly nemusí projevit, ale významně se ukáží po plném otužení /8/. Z předchozího vyplývá, že stres z nedostatku či nadbytku živin, omezující proces otužování, může snižovat aktuální úroveň mrazuvzdornosti jednotlivých odrůd pšenice.

Literatura uvádí, že hnojení ovlivňuje mrazuvzdornost ozimé pšenice jak pozitivně, tak i negativně /2,3/. V polních podmínkách je při podzimním hnojení ozimé pšenice obvykle uváděn pokles mrazuvzdornosti při aplikaci N, zatímco při hnojení P a K její nárůst /2, 4/. Cílem našeho výzkumu bylo prozkoumat vliv hnojení N, P a K na mrazuvzdornost ozimé pšenice při jejím pěstování v dlouhodobě nehnojené půdě a zjistit, jaká je reakce na hnojení u odrůd lišících se svou potenciální mrazuvzdorností.



## MATERIÁL A METODA

Nádobový pokus byl založen 15.10.2012. Použity byly nádoby s objemem 5l, půda byla odebraná z 35 let nehnojené parcely dlouhodobého pokusu v Kostelci nad Orlicí (písčitohlinitá hnědozem,  $\text{pH}_{\text{KCl}}=5,0$ ,  $\text{P}_{\text{příst}}=94$  mg/kg,  $\text{K}_{\text{příst}}=45$  mg/kg,  $\text{C}_{\text{ox}}=1,0\%$ ,  $\text{N}_t=0,08\%$ ). Pokus zahrnoval pět variant hnojení: 1. nehnojená kontrola (C), 2. hnojení K – 1,5g KCl/nádoba, 3. hnojení N - 0,5g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ /nádoba, 4. hnojení NK (dávky jako předchozí) a 5. hnojení NPK – dávky jako předchozí + 0,5g  $\text{Ca}_2(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$ /nádoba. Hnojiva byla aplikována zálivkou v ca. 300 ml vody před setím. 4 dny po hnojení byly do nádob vysety odrůdy ozimé pšenice s geneticky rozdílnou mrazuvzdorností: nízko odolný Potenzial, středně odolné Mulan, Elly a vysoce odolná Bohemia. Výsev byl 25 semen na nádobu. Všechny kombinace (hnojení x odrůda) byly provedeny v 3-4 opakováních (samostatných nádobách). Nádoby byly zapuštěny do vnějšího odkrytého záhonu. Dne 4.2.2013 byly rostliny ve fázi 3-4 pravých listů odebrány a uspořádány do svazků po 10ti rostlinách. Po dobu dvou dní byly umístěny v chladicí komoře při 0 °C. Mrazuvzdornost rostlin byla testována formou přímého mrazového testu /9/ v 5-ti boxech s rozdílnou intenzitou mrazu -8 až -18 °C (po dvou svazcích pro každou kombinaci odrůda x hnojení). Po mrazovém testu byly rostliny regenerovány v pěstebním substrátu po dobu 3 týdnů ve skleníku při teplotě 21 °C. Následně bylo hodnoceno přežití rostlin a vypočtena teplota přežití 50% rostlin ( $\text{LT}_{50}$ ). Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu Statistica 12 metodou analýzy variance hlavních efektů.

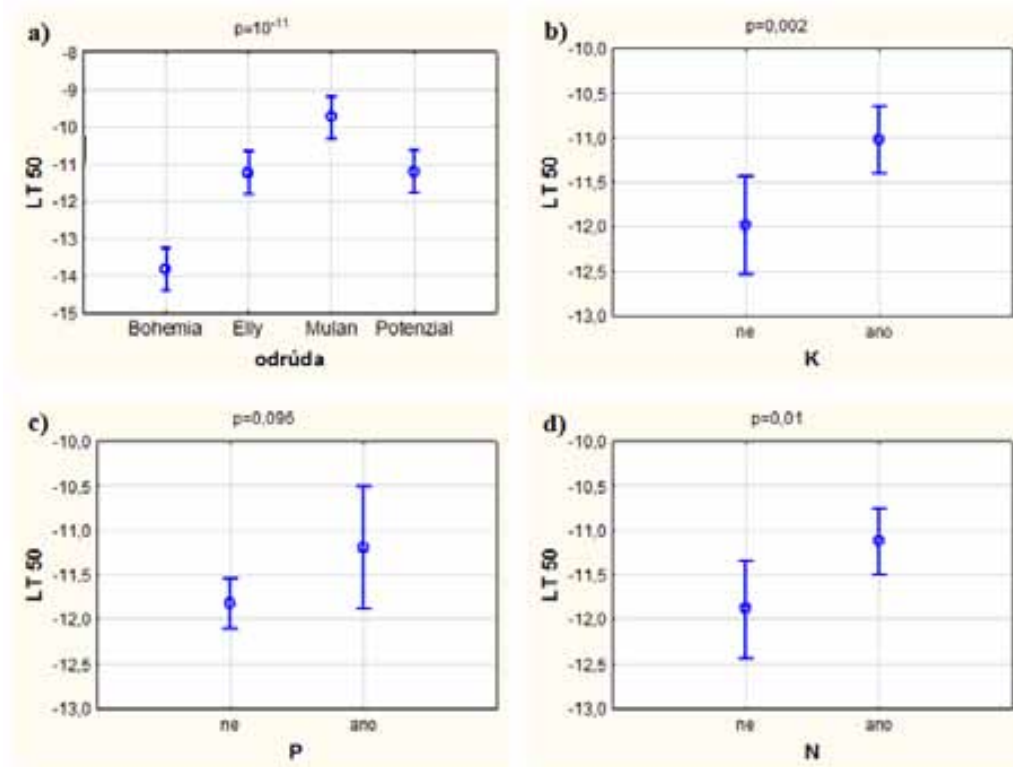
## VÝSLEDKY A DISKUSE

Rozdíly v mrazuvzdornosti se u čtyř testovaných odrůd projevíly vysoce statisticky průkazně (Graf 1a), a to víceméně dle jejich předpokládaných dispozic /6/. Rozdíly mezi odrůdami byly nejvýraznější v případě kontroly resp. v případě hnojení jedinou živinou. Při variantách s kombinací živin NK a NPK byly tyto rozdíly mnohem menší. Vliv kombinace živin na snížení mrazuvzdornosti byl nejmarkantnější u nejodolnější odrůdy Bohemia, u níž varianta NK měla až o 3 °C nižší mrazuvzdornost než varianty s jedinou živinou (Tab.1).

Celkově byla mrazuvzdornost rostlin hnojením ovlivněna negativně ( $p=0,003$ ), což pravděpodobně souviselo s poměrně vysokou dávkou živin. Nejvyšší mrazuvzdornost bývá totiž dosažena při vyrovnané výživě, ale při nadbytku N, P a K mrazuvzdornost klesá /3/. V případě aplikace dusíku a draslíku vzrostly  $\text{LT}_{50}$  v průměru o ca. 1 °C (Graf 1b/1d). Totéž platí i pro fosfor. V případě této živiny však vliv nebyl statisticky průkazný (Graf 1c). V polních podmínkách je při podzimním hnojení ozimé pšenice obvykle uváděn pokles mrazuvzdornosti při aplikaci N v souvislosti se stimulací růstových pochodů a zvýšením citlivosti rostlinných pletiv k mrazu, zatímco hnojení P a K působí spíše na vyžrání pletiv /2, 4/. V našem případě se negativní efekt N projevil až v kombinaci s dalším hnojením P a K.

Reakce mrazuvzdornosti odrůd na hnojení byla odrůdově specifická. Zatímco u nejméně odolné odrůdy Potenzial byla mrazuvzdornost napříč variantami hnojení téměř konstantní, u zbývajících tří odrůd byl pokles mrazuvzdornosti při aplikaci hnojiv již zjevný a statisticky průkazný (Tab. 1). Analýza rozptylu potvrdila významnost interakcí odrůda x N ( $p=3 \cdot 10^{-5}$ ) a odrůda x K ( $p=10^{-4}$ ). Nejvýraznější pokles mrazuvzdornosti v důsledku hnojení nastal u odrůdy Bohemia, a to o více než 4 °C (kontrola vs. NPK), čímž se tato vysoce odolná odrůda téměř dostala na úroveň nízko odolné odrůdy Potenzial.

Pozorované negativní ovlivnění mrazuvzdornosti hnojením NPK je možné vysvětlit také mechanismem souvisejícím s hnojením obecně. U hnojiv se ve všech případech jednalo o roztoky rozpustných solí, takže zvýšené celkové dávky zároveň vyvolávaly v půdním roztoku zasolení spojené se zvýšeným osmotickým tlakem. Pokud bychom hodnotili hodnoty  $\text{LT}_{50}$  ve vztahu k množství aplikovaných hnojiv (Graf 2), je patrné, že s rostoucím množstvím aplikovaných solí lineárně klesala odolnost rostlin vůči nízkým teplotám.

Graf 1: Statistická významnost jednotlivých faktorů pro  $LT_{50}$  ( $^{\circ}C$ , ANOVA hlavních efektů).Tab. 1 Teplota přežití 50% rostlin ( $LT_{50}$  -  $^{\circ}C$ ) při jejich přímém zmrazování v boxech u jednotlivých variant hnojení a odrůd. Různá písmena značí signifikantní rozdíl ( $p < 0,05$ ).

	C	K	N	KN	NPK
BOHEMIA	-15,6 <sup>a</sup>	-15,4 <sup>a</sup>	-14,9 <sup>a</sup>	-11,9 <sup>c</sup>	-11,4 <sup>cd</sup>
ELLY	-12,7 <sup>b</sup>	-11,1 <sup>de</sup>	-11,6 <sup>cd</sup>	-10,5 <sup>fg</sup>	-10,4 <sup>g</sup>
MULAN	-10,8 <sup>efg</sup>	-9,7 <sup>h</sup>	-10,4 <sup>g</sup>	-9,5 <sup>h</sup>	-8,4 <sup>i</sup>
POTENZIAL	-11,0 <sup>def</sup>	-11,3 <sup>de</sup>	-11,4 <sup>cd</sup>	-11,3 <sup>de</sup>	-11,1 <sup>def</sup>

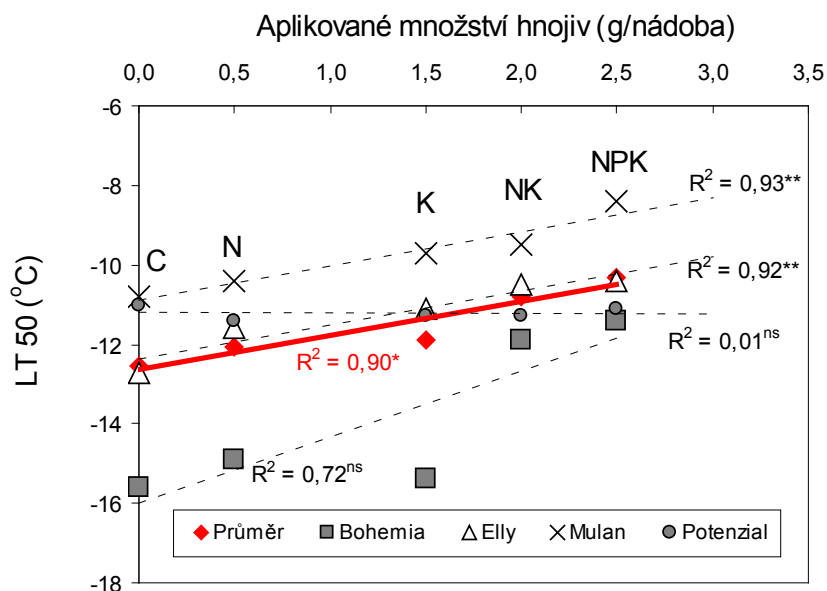
Stav půdního roztoku v průběhu pokusu nebyl sledován. Molární koncentrace aplikovaných solí v půdním roztoku těsně po aplikaci lze odhadnout na přibližně 6 mM ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), 20 mM (KCl) a 2 mM ( $\text{Ca}_2(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$ ) při předpokládané půdní vlhkosti 33 obj. %. Tento výpočet je ale pouze hypotetický, protože nezohledňuje možnou sorpci určitého podílu kationtů, čímž by reálné koncentrace kationtů v půdním roztoku byly zřejmě nižší. Nicméně negativní vliv KCl na růst mladých rostlin pšenice byl popsán již od 15 mM KCl, přičemž šlo také o roztoky aplikované do půdy /10/.

Kombinovaný efekt zasolení a nízké teploty není v literatuře dostatečně popsán /1/. Při pěstování ozimů s rozdílnou přirozenou mrazuvzdorností (žita a pšenice) na gradientu půdního zasolení však bylo pozorováno, že při vysokém zasolení se již rozdíly v odolnosti obou plodin neprojeví /5/. Reakce mrazuvzdornosti na rostoucí salinitu v našem pokusu byla odrůdově specifická, korelace mezi obsahem solí a  $LT_{50}$  byla ale v rámci celého hodnoceného souboru průkazná ( $R^2=0,18$ ,  $p=0,006$ ).

Při aplikaci živin může docházet jak k pozitivnímu (zlepšení fyziologické kondice rostlin), tak i k negativnímu ovlivnění (zasolení). Ze získaných výsledků lze vyvodit, že (1) přístupnost živin v dlouhodobě nehnojené půdě zřejmě nebyla tak nízká, aby rostlinám způsobovala významnější stres nedostatku živin v nehnojené kontrole (2). Je pravděpodobné, že hnojení v uvedených aplikovaných dávkách představovalo pro rostliny spíše stres (3). Mezi odrůdami

pšenice ozimé existují značné rozdíly v jejich reakci na kombinované působení nadbytku hnojení a mrazu.

Graf 2 Vztahy mezi přežitím rostlin ( $LT_{50}$ ) a celkovým aplikovaným množstvím hnojiv (\* - korelace statisticky signifikantní na hladině  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , ns – statisticky nesignifikantní).



Pro zobecnění vlivu působení více faktorů by bylo nutné provedené pokusy doplnit o varianty s nižší aplikační dávkou živin (tj. omezení efektu zasolení) a o varianty s použitím živinově neutrálního zasolení (např. NaCl).

## LITERATURA

- /1/ Mittler, R.: Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, 11, 2006: 15-19
- /2/ Freyman, S., Kaldy, M.S.: Relationship of soil fertility to cold hardiness of winter wheat crowns. *Canadian Journal of Plant Science*, 59, 1979: 853-855
- /3/ Tyler, N.J., Gusta, L.V., Fowler, D.B.: The influence of nitrogen, phosphorus and potassium on cold acclimation of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Canadian Journal of Plant Science*, 61, 1981: 879-885
- /4/ Knapp, W.R., Knapp, J.S.: Response of Winter Wheat to Date of Planting and Fall Fertilization. *Agronomy Journal*, 70, 1978: 1048-1053
- /5/ Fowler, D.B., Hamm, J.W.: Crop response to saline soil conditions in the parkland area of Saskatchewan. *Canadian Journal of Soil Science*, 60, 1980:439-449
- /6/ Prášilová, P., Prášil, I.T.: Zimovzdornost současného sortimentu odrůd ozimé pšenice. *Úroda* 9, 2011: 20-23
- /7/ Gusta, L.V., Fowler, D.B., Tyler, N.J.: Factors influencing hardening and survival in winter wheat. In: Li, P.H., Sakai, A. (eds.): *Plant cold hardiness and freezing stress – mechanisms and crop implications – volume 2*. Academic Press, Inc. (London), 1982: 714 pp.
- /8/ Săulescu, N.N., Braun, H.-J.: Cold Tolerance. In: Reynolds, M.P., Ortiz Monasterio, J.I., McNab, A. (eds.): *Application of physiology in wheat breeding*. CIMMYT 2001: 240 pp.
- /9/ Prášil I.T., Prášilová P., Mařík P.: Comparative study of direct and indirect evaluations of frost tolerance in barley. *Field Crops Research* 102, 2007: 1-8
- /10/ Adiloglu S., Adiloglu A., Ozkil M.: Effect of different levels of NaCl and KCl on growth and some biological indexes of wheat plant. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10, 2007: 1941-1943

## Poděkování

Uvedená práce vznikla za finanční podpory projektu MŠMT Kontakt LH12159 a MZE QI91C118.

## RATIO IMAGING OF TEMPORAL CHANGES IN LEAF APOPLASTIC pH OF *VICIA FABEA* (L.) PLANTS UNDER DROUGHT STRESS BY FLUORESCENCE MICROSCOPY TECHNIQUE

### MĚŘENÍ ZMĚN pH APOPLASTU LISTŮ ROSTLIN *VICIA FABEA* VYSTAVENÝM SUCHU POMOCÍ POMĚROVÉ FLUORESCENČNÍ METODY

Thirupathi Karuppanapandian<sup>1</sup>, Christoph-Martin Geilfus<sup>2</sup>, Karl Hermann Mühling<sup>2</sup>, Vít Gloser<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Science, Department of Experimental Biology, Masaryk University, Kamenice 5, 62500 Brno, Czech Republic, tkpandian@mail.muni.cz, vitgloser@sci.muni.cz

<sup>2</sup> Institute of Plant Nutrition and Soil Science, Christian Albrechts University, Hermann-Rodewald-Str. 2, 24118 Kiel, Germany

#### Summary

We observed temporal dynamics of changes in apoplastic pH as a general stress response signal in fully developed leaves of *Vicia faba* (L.) plants both in diurnal cycle and during progressive soil drying. Use of H<sup>+</sup>-sensitive fluorescence probe in combination with ratio imaging microscopy allowed in situ measurements of intact plants with fine time resolution. Gradual increase of pH in apoplast started after 2 d of drought stress simultaneously with significantly decreased soil water content whereas changes in leaf water potential occurred later – after 4d of drought stress. The maximum change of 1.32 pH units was observed in leaf apoplast after 11 d of soil drying. The changes of pH were observed both in younger (top) leaves and in older (bottom) leaves but the amplitude was bigger in older leaves. The leaf apoplastic pH proved as a useful marker of stress signaling in plants.

*Key words: drought stress, leaf apoplastic pH, ratio imaging, Vicia faba L.,*

#### Souhrn

Pozorovali jsme dynamiku změn pH v apoplastu jako obecný stresový signál u plně vyvinutých listů bobu německého (*Vicia faba*) v denní cyklu i při vysychání půdy. Pomocí pH citlivého fluorescenčního indikátoru a poměrové fluorescenční mikroskopie jsme měřili změny v intaktních rostlinách *in situ* v krátkých časových intervalech. Postupný vzestup pH začal po dvou dnech sucha současně s průkazným poklesem obsahu vody v půdě, zatímco ke změnám ve vodním potenciálu listů došlo až po 4 dnech sucha. Maximální změna pH o 1:32 nastala po 11 dnech sucha. Změny pH apoplastu byly pozorovány jak v mladších (horních), tak ve starších (dolních) listech, avšak ve starších listech byla amplituda změn větší. Detekce časně reakce rostlin na stresové faktory prostředí pomocí analýzy změn pH apoplastu *in situ* se ukázala jako užitečná metoda při objasňování procesů dálkové signalizace v rostlinách.

*Klíčová slova: Stres suchem, pH apoplastu, bob německý, fluorescenční indikátor, poměrové měření*

## INTRODUCTION

The apoplastic space plays a prominent role in the communication of plants with the outer environment and enables the plants to adapt for survival within the changing environmental conditions /10, 11/. The apoplastic pH of the leaf controls various metabolic processes and is related to signaling cascades. Diurnal variations as well as environmental conditions e.g. drought and salinity stresses /5, 8, 11/ can alter the leaf apoplastic pH, consequently affecting processes that depend upon the apoplastic H<sup>+</sup> concentration.

Plants experiencing soil water deficits frequently generate a high apoplastic pH, which drives abscisic acid (ABA) partitioning into the apoplast and away from the symplast. Leaf apoplastic pH can have a direct physiological impact on guard cells functioning and growing cells but it will also significantly interact with ABA. Increase in apoplastic pH will result in greater accumulation of ABA in the apoplast, which can ultimately close stomata /11/ and limit plant growth rates /1/, since it is considered that an apoplastic acidification is needed for cell wall extensibility. Under drought, pH can increase prior to changes in plant water status or growth rate and stomatal conductance /4/.

Precise measurement of pH in leaf apoplast is, however, challenging and precise information about dynamics of changes are very limited /6/. Also pH measurements based on sampling of xylem sap from leaves may not truly reflect the status of apoplast in leaf mesophyll. Therefore, the objective of this study was to analyze *in situ* the temporal changes of leaf apoplastic pH of *Vicia faba* plants under drought stress by ratio imaging fluorescence microscopy technique that provides clear insight into processes in intact plant leaf /8/.

## MATERIALS AND METHODS

*Vicia faba* L., minor cv. Fuego; Saaten-Union GmbH, Isernhagen, Germany) was grown in 2L of plastic pots (14x14x14 cm) filled with 1.82 kg of soil in a climate chamber (14/10 h L/D; 23/15°C; 60% humidity). After 30 d of growth, the young and/or fully developed leaves were used for *in situ* apoplastic pH analysis and various physiological parameters. Soil water content (SWC) was measured using ThetaProbe connected to HH2 meter (AT Soil Moisture Kit, Delta-T, Cambridge, UK). Leaf water potential (LWP) was estimated by pressure chamber technique (Skye Instruments Ltd, UK). Twenty five  $\mu\text{M}$  of  $\text{H}^+$  sensitive fluorescent probe Oregon green 488 dextran (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Germany) was used for apoplastic pH measurement. The Leica inverted microscope (DMI6000B; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) connected to a DFC camera (DFC 360FX, Leica microsystems) and coupled to a computer was used for ratio imaging analysis. The fluorescence ratio  $F_{490}/F_{440}$  was obtained as a measurement of pH on a pixel-by-pixel basis. Image analysis was carried out using LAS AF software (Version 2.3.5. Leica microsystems). The Boltzmann fit was chosen for fitting sigmoidal curves to calibration data as described by /9/.

## RESULTS AND DISCUSSION

Changes of apoplastic pH have been proposed as one of the key factors in transmitting information regarding stress to distant unaffected plant organs (shoots, leaves) as a part of complex signalling network /1, 11/. Ratio imaging by pH-sensitive fluorescent probe is an adequate technique for *in vivo* pH measurements /8/. We showed it can be useful for examination of diurnal changes of leaf apoplastic pH and time-course changes under progressive soil drying. Analysis of diurnal dynamics of young and old leaves disclosed the 0.4 pH unit increase in younger leaves compared to older leaves for 24 h after 6 d of drought (Fig. 1A). The decrease of 0.2 pH unit was observed during entire dark period compared to light period, both in younger and older leaves (Fig. 1A).

The maximum change of 1.3 pH unit was observed in leaf apoplast of *V. faba* 11 d under drought stress, and this increase was already significant after 2 d of drought (Fig. 1B) under controlled conditions. This is in line with findings of /7/ that confirmed an apoplastic alkalization in bean plants under various stress conditions by pH micro electrodes. Proton pumps (ATPases) are hypothesized to play a key role in control of apoplastic pH by driving  $\text{H}^+$  ions into the sap in well-watered conditions. Transport and metabolism of nitrate anions has also an effect on apoplastic pH in drying soil /10/.

Under drought, water potential (WP) becomes more negative throughout the plant and is considered as a reliable marker for quantifying plant water stress response. The SWC in our

experiment was significantly reduced after 2 d of soil drying (Fig. 2A) and was followed by significant decrease in LWP after 4 d (Fig. 2B). This is in agreement with previous results /2/. /3/ also found that similar decrease of LWP in pepper plants in response to drought stress. The changes in LWP might be attributed to a change in osmotic pressure—the osmotic component of water potential.

Acidification of the leaf apoplast by the plasma membrane  $H^+$ -ATPase is a premise to cell wall extensibility and cell growth. Thus alkalization of leaf apoplast under stress by less than 0.5 unit is sufficient to inhibit plant growth, particularly leaves. Drought-induced growth reduction was consistent with apoplastic alkalization in maize leaves /5/ or resulted in apoplastic alkalization of up to half pH units in barley and bean leaves /7/.

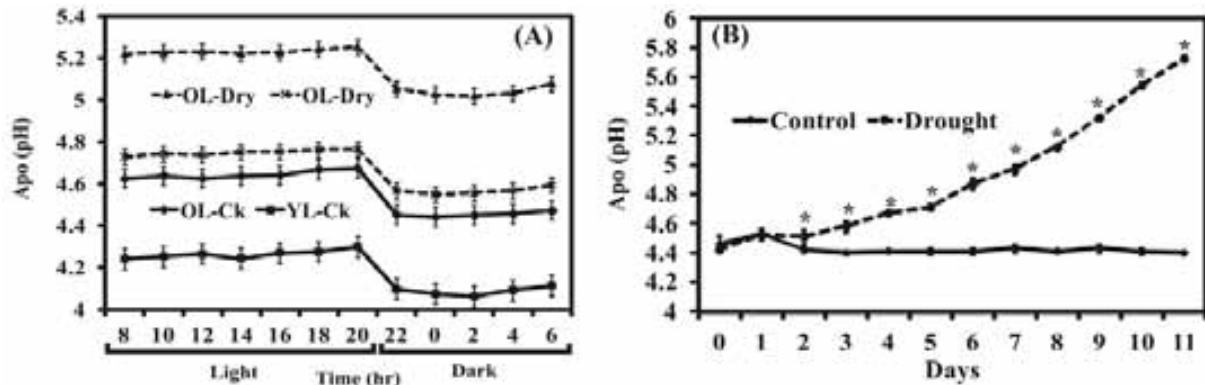


Fig. 1: Effect of drought stress on apoplastic pH in intact leaves of *V. faba*. Diurnal dynamics of young and old leaves after 6 d of drought (A), and temporal changes in leaf apoplastic pH 11 d of drying (B). Means  $\pm$  SE ( $n=5$ ). Significant differences ( $p \leq 0.05$ ) indicated by (\*). OL-Ck; old leaf-control; YL-Ck; young leaf-control; OL-Dry; old leaf-drought, YL-Dry; young leaf-drought.

Our results show that ratio imaging fluorescence microscopy technique allows sensitive detection of changes of pH in leaf apoplast of *Vicia faba* plants. The time-course analysis of pH indicates pH increase starting with significant reduction in SWC on day 2. This suggests very early stress perception. Hence, early increase of pH in apoplast likely belongs to the early long -distance signaling sequence in plants under progressive soil drying.

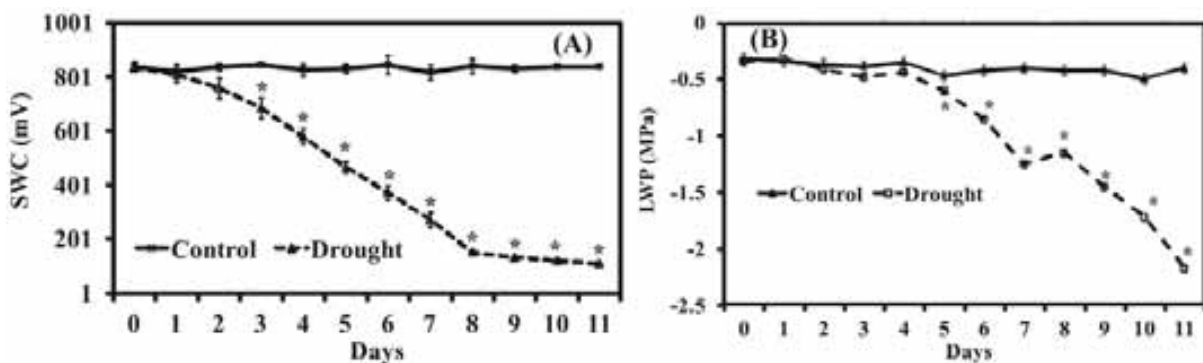


Fig. 2. Effect of drought on soil water content (SWC) (A) and leaf water potential (LWP) (B) in *V. faba* plants under controlled conditions. Means  $\pm$  SE ( $n=5$ ). Significant differences ( $p \leq 0.05$ ) are indicated by (\*).

## REFERENCES

- /1/ Bacon, M.A., Wilkinson, S., Davies, W.J. pH-regulated leaf cell expansion in droughted plants is abscisic acid dependent, *Plant Physiology*, 118, 1998: 1507-1515.

- /2/ Blackman, C.J., Brodribb, T.J., Jordan, G.J. Leaf hydraulics and drought stress: response, recovery and survivorship in four woody temperate plant species. *Plant, Cell & Environment*, 32, 2009: 1584-1595.
- /3/ Delfine, S., Loreto, F., Alvino, A. Drought-stress effects on physiology, growth and biomass production of rainfed and irrigated bell pepper plants in the Mediterranean region. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 126, 2001: 297-304.
- /4/ Dodd, I.C., Tan, L.P., He, J. Do increases in xylem sap pH and/or ABA concentration mediate stomatal closure following nitrate deprivation? *Journal of Experimental Botany*, 54, 2003: 1281-1288.
- /5/ Fan, L., Neumann, P.M. The spatially variable inhibition by water deficit of maize root growth correlates with altered profiles of proton flux and cell wall pH. *Plant Physiology*, 135, 2004: 2291-2300.
- /6/ Felle, H.H. pH: signal and messenger in plant cells. *Plant Biology*, 3, 2001: 577-591.
- /7/ Felle, H.H. Hanstein, S. The apoplastic pH of the substomatal cavity of *Vicia faba* leaves and its regulation. *Journal of Experimental Botany*, 53, 2002: 73-82.
- /8/ Geilfus, G-M., Mühlhling K-H. Ratiometric monitoring of transient apoplastic alkalizations in the leaf apoplast of living *Vicia faba* plants: chloride primes and PM-H<sup>+</sup>-ATPase shapes NaCl-induced systemic alkalizations. *New Phytologist*, 197, 2013: 1117-1129.
- /9/ Schulte, A., Lorenzen, I., Bötcher, M., Plieth, C. A novel fluorescent pH probe for expression in plants. *Plant Methods*, 2, 2006: 7.
- /10/ Wilkinson, S., Bacon, M.A., Davies, W.J. Nitrate signalling to stomata and growing leaves: interactions with soil drying, ABA and xylem sap pH in maize. *Journal of Experimental Botany*, 58, 2007: 1705-1716.
- /11/ Wilkinson, S., Davies, W.J. Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. *Plant Physiology*, 113, 1997: 559-573.

### Acknowledgement

This work was financially supported by “Employment of Best Young Scientists for International Cooperation Empowerment” (CZ.1.07/2.3.00/30.0037) co-financed from European Social Fund and the state budget of the Czech Republic.

## VLIV STRESU SUCHEM V RŮZNÝCH FENOLOGICKÝCH FÁZÍCH NA TŘI ODRŮDY PŠENICE

### *INFLUENCE OF DROUGHT STRESS IN DIFFERENT PHENOLOGICAL GROWTH STAGES ON THREE WHEAT GENOTYPES*

Markéta Mayerová, Iva Stehlíková, Mikuláš Madaras

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně, mayerova@vurv.cz

#### *Summary*

Drought stress response of one Czech winter wheat genotype Mulan and two Chinese genotypes was examined in a greenhouse pot experiment. A drought period was induced in three different growth stages (i.e. variants). We evaluated yield and morphological parameters. Results suggest that the stress response of genotypes depended on growth stages in which it began. There were also significant genotype x variant interactions for all observed characteristics. The largest negative effect of temporary water stress on crop development occurred in the first period BBCH 31-59. The highest significant differences were observed for the genotype Mulan, especially for grain yield, dry weight of biomass and 1000-grain weight.

*Key words: drought resistance, genotypes, growth stages, winter wheat*

#### *Souhrn*

V nádobovém skleníkovém pokusu jsme testovali odolnost vybraných odrůd pšenice ozimé (2 čínské odrůdy a českou odrůdu Mulan) vůči suchu ve třech růstových fázích (variantách). Byly hodnoceny výnosové a morfologické parametry. U všech sledovaných parametrů se prokázala statisticky významná interakce odrůdy a varianty a zároveň se prokázal význam růstové fáze při hodnocení odolnosti rostlin vůči suchu. Největší negativní vliv na vývoj rostlin měl stres suchem v periodě BBCH 31-BBCH 59. Česká odrůda Mulan se významně lišila od odrůd čínských, protože vykazovala výrazné rozdíly mezi všemi variantami, zejména u parametrů výnos zrna, sušina nadzemí biomasy a HTZ.

*Klíčová slova: odrůdy, pšenice ozimá, růstové fáze, suchovzdornost*

## ÚVOD

V souvislosti se změnami klimatu, doprovázenými častějším výskytem déletrvajících sucha i v našich klimatických podmínkách, stoupá potřeba hledání vhodných genetických materiálů, které by byly schopné těmto nepříznivým podmínkám odolávat /2,4/. Schopnost rostlin odolávat stresu suchem zahrnuje širokou škálu fyziologických a biochemických mechanismů, které mohou být rozdílné pro jednotlivé genotypy /12/. Jeden typ strategie spočívá ve vyhnutí se dehydrataci díky prodloužení kořenů a snížení výparu vody nebo vyšší citlivosti průduchů ke ztrátě vody, což se projeví zvýšenou aktivitou kyseliny abscisové. Druhý typ strategie je založen na osmotickém přizpůsobení rostlin a je spojován se zahuštěním cytoplasmy, s kompatibilními solutony (např. prolíny) a specifickými bílkovinami (např. dehydriny) /2/. Testování vhodných genotypů proto zahrnuje celou škálu různých parametrů, založených např. na měření velikosti kořenového systému /6/, hodnocení diskriminace izotopu  $^{13}\text{C}$  /1/, hodnocení vlastností semen a klíčících rostlin /3/, měření fyziologických a morfologických parametrů v hydroponických a nádobových pokusech /8/, sledování fyziologické odezvy rostliny během stresu /14/.

Testování fyziologických mechanismů reakce na suchu je často prováděno v určité fázi růstu rostlin, i když je známo, že reakce na stres suchem je silně závislá na fázi, ve které se rostlina



nachází /4/, což souvisí s různými mechanismy reakce rostliny. Cílem nádobového pokusu proto bylo ověřit schopnost vybraných odrůd ozimé pšenice odolávat stresu suchem, působícím v různých fenologických fázích.

## MATERIÁL A METODA

Na základě předchozího testování čínských odrůd pšenice ozimé získaných díky spolupráci se zemědělským institutem v Dong-Yingu (provincie Shan Dong, východní Čína) jsme vybrali dvě potenciálně suchovzdorné odrůdy Dong 3 a Dong Ying 3, u kterých jsme spolu s kontrolní českou odrůdou Mulan testovali odolnost vůči suchu.

21.4.2014 jsme z polního odrůdového pokusu založeného na podzim 2013 v Praze - Ruzyni odebrali rostliny testovaných odrůd ve fázi odnožování BBCH 22-23. Rostliny jsme zasadili do nádob s odváženou zemínou (4 kg) po pěti jedincích, každá odrůda a varianta po pěti opakováních. Pokus byl umístěn ve fytotronu s nastaveným režimem 12 hod.den/12 hod.noc, při teplotě 20°C/14°C. Vzhledem k tomu, že rostliny reagují na stres suchem v různých růstových fázích rozdílně, zvolili jsme tři varianty postihující hlavní růstové fáze, po dobu kterých jsme vystavovali rostliny stresu suchem. Kvůli nestejněměrnému nástupu fenologických fází se časově lišily jednotlivé periody u čínských odrůd a českého Mulanu.

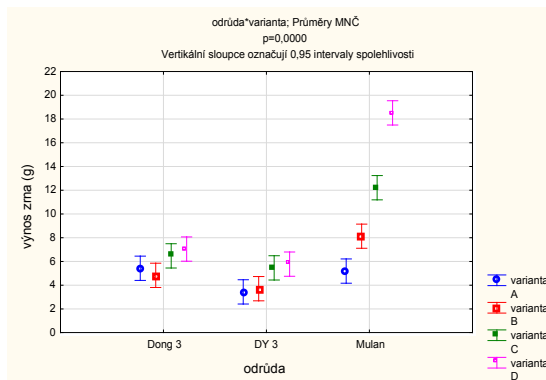
- A. perioda sucha od BBCH 31 (prodlužovací růst - 1.kolénko) do BBCH (55)59 (metání), čínské odrůdy 31.3.-8.4., Mulan 31.3.-19.5.
- B. perioda sucha od BBCH 51 (počátek metání) do BBCH 69-71(konec kvetení), čínské odrůdy 22.4.-19.5., Mulan 16.5.-4.6.
- C. perioda sucha od BBCH 71 do ukončení pokusu (perioda vývoje plodů a zrání), čínské odrůdy 16.5.-20.6., Mulan 3.6.-16.7.
- D. kontrola zalévání po celou dobu pokusu

Kontrolní variantu a varianty mimo periodu sucha jsme udržovali v režimu optimální závlivky (ca. 75% plného nasycení půdy), variantu v období periody sucha jsme v průběhu této periody zalili 80 ml vody vždy při dosažení bodu vadnutí u více než poloviny rostlin, v červnu jsme závlivku zvýšili na 120 ml. V průběhu pokusu jsme hodnotili fenologické fáze a kondici variant v periodě sušení. Pro zjištění příjmu vody rostlinami a hospodaření vodou jsme vážili jednotlivé nádoby před závlivkou aktuálně sušené varianty a hodnotili úbytek vody vzhledem k variantě D. Po ukončení pokusu jsme zhodnotili následující parametry: délka rostliny, délka klasu, počet odnoží, hmotnost sušiny nadzemní části, hmotnost zrna, počet zrn.

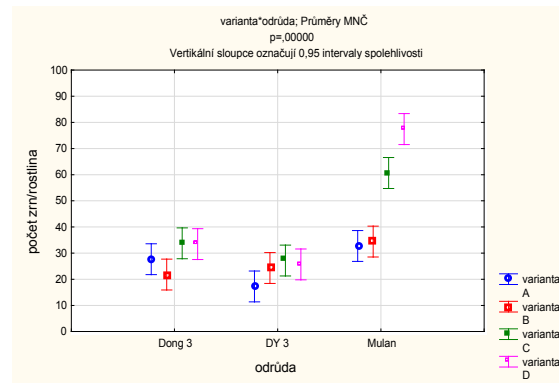
Vliv odrůdy a varianty na sledované parametry jsme zhodnotili vícefaktorovou analýzou variance v programu STATISTICA 12.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

U všech sledovaných parametrů se prokázala statisticky významná interakce odrůdy a varianty. Co se týká výnosu zrna a sušiny nadzemní části rostlin, česká odrůda Mulan se významně lišila od odrůd čínských, neboť vykazovala výrazné rozdíly mezi všemi variantami. Nejvíce negativně ovlivnila výnosy varianta A, tj. perioda sucha v období od BBCH 31 do metání (BBCH 55-59). Obě čínské odrůdy měly ve všech variantách nižší výnos než Mulan, ale rozdíl mezi variantami byl malý, varianty A a B vykazovaly stejný vliv a lišily se od variant C a D. Perioda sucha v období vývoje plodů a zrání (varianta C) měla u čínských odrůd na výnos zanedbatelný vliv (Graf 1). /9/ uvádí u pšenice jarní největší vliv stresu suchem na výnos zrna v období od metání po kvetení, které se projevilo redukcí počtu zrn v klase, stres v období prodlužovacího růstu byl kompenzován vyšším počtem zrn na dodatečně vytvořených odnožích. V našem případě také došlo po obnovení závlivky k nárůstu počtu odnoží u varianty A u všech odrůd (Tab.1), počet zrn na rostlinu se ale významně nezvýšil (Graf 2). Statisticky nejnižší počet odnoží jsme zaznamenali u varianty B, kde po obnovení závlivky ve fázi kvetení nedošlo k dalšímu vytváření odnoží.



Graf 1 Vliv interakce odrůdy a varianty na výnos zrna



Graf 2 Vliv interakce odrůdy a varianty na počet zrn

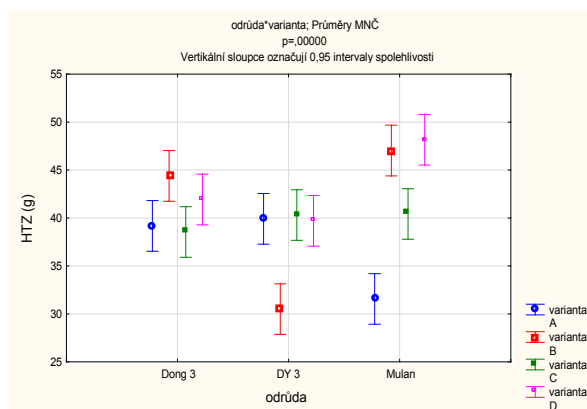
Na HTZ měla varianta odlišný vliv než na výnosy (Graf 3). U odrůdy Dong 3 nebyly významné rozdíly v hmotnosti zrna mezi variantami, u odrůdy Dong Ying 3 byla nejnižší hmotnost zrna u varianty B, kdežto v případě odrůdy Mulan u varianty A. Nízká HTZ varianty B u odrůdy Dong Ying 3 se ale díky zvýšení počtu zrn nepromítla do výnosu, kdežto u odrůdy Mulan ano. Rozdílnou reakcí odrůd na stres suchem v různých fázích vývoje, která se projevila v počtu zrn v klasu a HTZ potvrzuje také práce /9/. /10/ uvádí statisticky významný vliv interakce odrůdy a varianty (zavlažovaná/stresovaná) na HTZ a počet zrn v klasu v nádobovém pokuse s 10 chorvatskými kultivary pšenice ozimé. Pro výnos zrna a hmotnost sušiny však statisticky významný vliv interakce a odrůdy práce /10/ nepotvrzuje.

Délka rostlin, stejně jako délka klasu, byla významně nejnižší u varianty A u všech odrůd, ostatní varianty se od sebe významně nelišily (Graf 4). Ke stejnému zjištění dospěl i /9/.

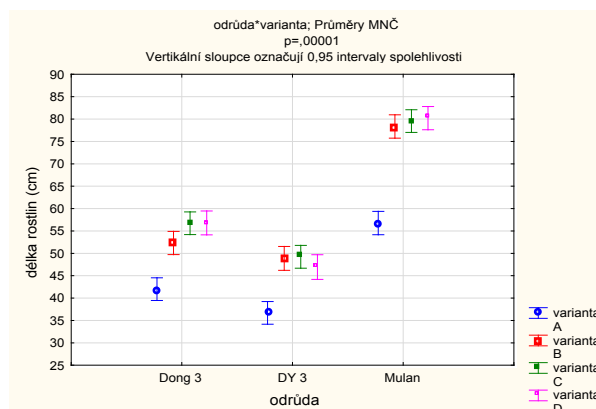
Tab. 1 Počet odnoží na odrůdu a variantu, různá písmena značí signifikantní rozdíl ( $p < 0,05$ )

Odrůda/ varianta	Dong 3	DY 3	Mulan
	Průměr ± směrodatná odchylka		
A	1,30 ± 0,57 <sup>ab</sup>	0,90 ± 1,07 <sup>ab</sup>	1,53 ± 0,7 <sup>b</sup>
B	0,26 ± 0,65 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,71 <sup>a</sup>	0,84 ± 0,96 <sup>ab</sup>
C	1,00 ± 0,79 <sup>ab</sup>	0,5 ± 0,61 <sup>ab</sup>	1,0 ± 0,86 <sup>ab</sup>
D	0,89 ± 0,47 <sup>ab</sup>	0,71 ± 0,85 <sup>ab</sup>	1,58 ± 0,9 <sup>b</sup>

Pokus potvrdil význam růstové fáze, při které dochází u rostlin ke stresu suchem /9, 13/, přičemž jednotlivé genotypy se liší v reakci na tento stres /7, 9, 10/. V našem případě jsme zjistili signifikantní rozdíly mezi čínskými genotypy a českou odrůdou Mulan, která sice dosahovala v ideálních podmínkách (varianta D) mnohem vyššího výnosu než odrůdy čínské, ale na stres suchem reagovala snížením počtu zrna a nízkou HTZ, což se následně projevilo ve výnosu zrna i nadzemní biomasy. Přestože reakce odrůd byla různá, lze zároveň konstatovat, že nejvýznamnější negativní vliv na vývoj rostlin a výnos měl stres suchem ve fázi prodlužovacího růstu, naopak nástup sucha po ukončení kvetení se projevilo nejméně, statisticky významně pouze u české odrůdy. Vybrané čínské odrůdy se ukázaly jako vhodné materiály pro případné šlechtění odrůd pšenice ozimé odolné vůči suchu, což prokázaly i naše předchozí výzkumy /11/.



Graf 3 Vliv interakce odrůdy a varianty na HTZ



Graf 4 Vliv interakce odrůdy a varianty na délku rostlin

## LITERATURA

- /1/ Araus, J.L., Slafer, G.A., Reynolds, M.P., Royo, C.: Plant breeding and drought in C<sub>3</sub> cereals: what should we breed for? *Annals of Botany* 89, 2002: 925-940
- /2/ Bláha, L., Zelenková, S., Vyvadilova, M.: Vzdávající význam klimatických změn na produkci zemědělských plodin. In: Sborník příspěvků ze semináře ke Světovému dni výživy, Praha, 2008.
- /3/ Bláha, L., Vyvadilová, M.: Metodika testování vlastností semen a klíčnic rostlin na odolnost vůči fyzikálním stresorům pro selekci genetických zdrojů řepky ozimé. VÚRV v.v.i., 2012, Praha
- /4/ Blum A: Towards standard assays of drought resistance in crop plants. In: Ribaut J.M., Poland D. (ed.): *Molecular Approaches for the Genetic Improvement of Cereals for Stable Production in Water-Limited Environments*, Mexico, 1999: 29-35
- /5/ Cattivelli L., Rizza F., Badeck F.W., Mazzucotelli E., Mastrangelo A.M., Francia E., Marè C., Tondelli A., Stanca A.M.: Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crop Research* 105, 2008:1-14
- /6/ Chloupek, O., Dostál, V., Středa, T., Psota, V., Dvořáčková, O.: Drought tolerance of barley varieties in relation to their root system size. *Plant Breeding* 129, 2010: 630-636
- /7/ Dhanda, S.S., Sethi, G.S.: Tolerance to drought stress among selected Indian wheat cultivars. *Journal of Agricultural Science*, 139, 2002: 319-326
- /8/ Hnilička, F., Petr, J.: The effect of abiotic stresses on the rate of photosynthesis, transpiration and water use efficiency (WUE) in wheat plants during ontogeny. *Scientia Agriculturae Bohemica* 34, 2003: 41-47
- /9/ Christen, O., Sieling, K., Richter-Harder, H., Hanus, H. : Effects of temporary water stress before anthesis on growth, development and grain yield of spring wheat. *Europ. J. Agron.* 4(1), 1995: 27-36
- /10/ Kovačević, J., Kovačević, M., Cesar, V., Drezner, G., Lalić, A., Lepduš, H., Zdunić, Z., Jurković, Z., Dvojkić, K., Katanić, Z., Kovačević, V.: Photosynthetic efficiency and quantitative reaction of bread winter to mild short-term drought condition. *Turk. J. Agric. For.* 37, 2013:385-393
- /11/ Madaras, M., Mayerová, M., Stehlíková, I., Dvořáček, V.: Čínské genotypy pšenice ozimé se zvýšenou tolerancí vůči zasolení - hodnocení v klimatických podmínkách ČR. *Úroda* 62(12 věd.př.), 2014: 219 - 222
- /12/ Ryšková, T., Truhlářová, E., Klimešová, J., Smutná, P.: The use of physiological and morphological parameters for evaluation of drought stress response of winter wheat during plant wilting. In: MendelNet konference, Brno, 2012: 874-880.
- /13/ Szira, F., Bálint, A.F., Börner, A., Galiba, G.: Evaluation of drought-related traits and screening methods at different developmental stages in spring barley. *J.Agronomy&CropSci* 194, 2008:334-34
- /14/ Vlasáková, E., Prášil, I., Melišová, L.: Hodnocení obsahu ABA během několika růstových fází rostlin pšenice ozimé v podmínkách dlouhotrvajícího sucha In: Bláha, L., Hnilička, F. (ed.): *Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin*, Praha, 2011: 113 - 116

## Poděkování

Uvedená práce vznikla za finanční podpory projektu LH 12159.

## VPLYV ZRÁŽOK A TEPLoty NA RAST A PRIMÁRNU PRODUKCIU MONOKULTÚRY *FESTULOLIUM* A ĎATELINOTRÁVNÝCH MIEŠANIEK

### ***INFLUENCE OF RAINFALL AND TEMPERATURE ON GROWTH AND PRIMARY- PRODUCTION OF MONOCULTURE OF FESTULOLIUM AND LEGUME/GRASS MIXTURES***

Miriám Kizeková<sup>1</sup>, Ľubica Jančová<sup>1</sup>, Jana Martincová<sup>1</sup>, Mariana Jančová<sup>1</sup>, Zuzana Dugátová<sup>1</sup>, Štefan Pollák<sup>1</sup>, Radoslava Kanianska<sup>2</sup>, Jarmila Makovníková<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum – Výskumný ústav trávnych porastov a horského poľnohospodárstva, Mládežnícka 36, 974 21 Banská Bystrica, kizekova@vutphp.sk,

<sup>2</sup> Univerzita Mateja Bela, Katedra prírodných vied, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica,

<sup>3</sup> Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum – Výskumný ústav pôdoznanectva a ochrany pôdy, Mládežnícka 36, 974 04 Banská Bystrica

#### ***Summary***

In the field trial, dependency among weather variable (rainfall and mean air temperature) and primary production, parameters of growth analysis (RGR, RGR<sub>A</sub>, NAR, CGR) were analysed at monoculture of intergeneric hybrid *Festulolium braunii* cv. Achilles, red clover/grass and lucerne/grass mixtures during growing season 2014. With monoculture of *Festulolium* the results confirmed significant negative correlation between observed factors and mean air temperature (RGR:  $r = -0,94$ ,  $P = 0,0002$ , NAR:  $r = -0,94$ ,  $P = 0,0001$ , CGR:  $r = -0,89$ ,  $P = 0,0046$ ) and rainfall (RGR:  $r = -0,77$ ,  $P = 0,014$ , NAR:  $r = -0,84$ ,  $P = 0,0043$ ). On the contrary, production parameters at alfalfa-grass monoculture showed the lowest dependency on rainfall (RGR:  $r = -0,52$ ,  $P = 0,1827$ , NAR:  $r = -0,62$ ,  $P = 0,0992$ , CGR:  $r = -0,32$ ,  $P = 0,4303$ ).

*Key words: temporary grasslands, primary production, photosynthesis, rainfall, temperature*

#### ***Souhrn***

V poľných pokusoch sa počas vegetačného obdobia 2014 analyzovala závislosť medzi poveternostnými faktormi (úhrn zrážok a priemerná teplota ovzdušia) a primárnou produkciou, parametrami rastovej analýzy (RGR, RGR<sub>A</sub>, NAR, CGR) pri monokultúre medziodového hybridu *Festulolium braunii* cv. Achilles, ďatelinotrávnej a lucernotrávnej miešanke. Pri monokultúre *Festulolium braunii* výsledky potvrdili významnú negatívnu koreláciu medzi parametrami rastovej analýzy a priemernou teplotou ovzdušia (RGR:  $r = -0,94$ ,  $P = 0,0002$ , NAR:  $r = -0,94$ ,  $P = 0,0001$ , CGR:  $r = -0,89$ ,  $P = 0,0046$ ) ako aj úhrnom zrážok za rastové obdobie (RGR:  $r = -0,77$ ,  $P = 0,014$ , NAR:  $r = -0,84$ ,  $P = 0,0043$ ). Naopak parametre lucernotrávnej miešanke preukázali slabú závislosť od úhrnu zrážok za rastové obdobie (RGR:  $r = -0,52$ ,  $P = 0,1827$ , NAR:  $r = -0,62$ ,  $P = 0,0992$ , CGR:  $r = -0,32$ ,  $P = 0,4303$ ).

*Klíčovú slova: dočasné trávne porasty, primárna produkcia, fotosyntéza, zrážky, teplota*

## **ÚVOD**

Zmeny klímy, zmeny využívania pôdy a krajiny podmieňujú hľadanie optimálnych technologických systémov rastlinnej a živočíšnej výroby. Autori /6/ uvádzajú, že parametre rastovej analýzy sú kľúčovými ukazovateľmi pre kvantitatívne meranie štruktúry vegetácie a majú široké uplatnenie v poľnohospodárskych aj ekologických štúdiách vrátane hodnotenia stresov, transpirácie, cyklov živín a uhlíka. Súčasne sú dôležitými premennými pre rôzne modely, ktoré umožňujú predikovať manažment tvorby biomasy trávnych porastov /5/.

## MATERIÁL A METODA

Na jar v roku 2013 bol na stanovišti Suchý vrch založený maloparcelkový pokus. Stanovište sa nachádza v Banskej Bystrici, časť Radvaň v nadmorskej výške 480 m n.m., s priemernou ročnou teplotou 9,2°C a priemerným úhrnom zrážok 759 mm. Geologický substrát stanovišťa tvoria zvetraliny andezitov, pôdnym typom je kambizem, pôdnym druhom je hlinitá pôda. Pokus bol založený blokovou metódou v troch opakovaníach. Do pokusu boli zaradené 3 varianty s nasledovným zložením: variant 1 - monokultúra medzirodového hybridu *Festulolium braunii* cv. Achilles, variant 2 - *Trifolium pratense* cv. Fresko + *Festulolium braunii* cv. Achilles, variant 3 - *Medicago sativa* cv. Tereza + *Festulolium braunii* cv. Achilles. Celá metodika pokusu je uvedená v práci /4/. Porasty sa využívali kosením 3-krát počas vegetačného obdobia. Na charakterizovanie rastovo-produkčného procesu sa pred každou kosbou odobrala z každého variantu nadzemná fytomasa z plochy 1 m<sup>2</sup> z troch opakovaní. Listová plocha bola stanovená deštrukčnou metódou a zmeraná na prístroji AREAMETER LI-3000 od firmy LI-COR. Výpočet parametrov rastovej analýzy : primárnej produkcie, špecifickej rýchlosti rastu (RGR), špecifickej rýchlosti rastu listovej plochy ( RGR<sub>A</sub>), čistého výkonu fotosyntézy (NAR) a rýchlosti prírastku sušiny na jednotku povrchu pôdy (CGR) sa uskutočnil podľa vzorcov uvedených v publikácii /7/. Chemické analýzy sa vykonali v laboratóriu VÚTPHP Banská Bystrica v zmysle platných legislatívnych predpisov - Výnos MP SR č. 2145/2004-100. Výsledky boli vyhodnotené pomocou programu Statitgraphic Centurion metódou analýzy variancie (ANOVA) s následným testovaním rozdielov na hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Vzájomné vzťahy medzi parametrami a faktormi boli hodnotené Pearsonovým korelačným koeficientom.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

Priemerná hodnota RGR za rastové obdobie 1. kosby bola 50,84 mg.g<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, zatiaľ čo v rastovom období 2. kosby priemerná hodnota dosiahla záporné hodnoty (-22,78 mg.g<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>). Znižovanie hodnôt RGR trávneho porastu počas vegetačného obdobia potvrdzujú štúdie viacerých autorov /1, 2, 3/. Najvyššie priemerné hodnoty RGR za vegetačné obdobie zaznamenala lucernotrávna miešanka (tabuľka 1).

Podobne ako pri RGR, najlepšie podmienky pre rast asimilačného aparátu boli v rastovom období 1. kosby. Analýza RGR<sub>A</sub> ukázala, že v priemere vyššiu rýchlosť rastu listovej plochy zaznamenali varianty s ďatelinotravnou a lucernotravnou miešankou (tabuľka 1). Signifikantne najnižšie hodnoty dosiahli porasty v rastovej perióde 2. kosby.

Hodnoty výkonu asimilačného aparátu (NAR) sa v rastovom období 1. kosby pohybovali od 5697,92 mg.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup> pri lucernotrávnej miešanke do 8229,31 mg.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup> monokultúre medzirodového hybridu. V nasledujúcom rastovom období sa NAR preukazne znížil na všetkých variantoch. Dynamika čistého výkonu asimilácie kopírovala trend signifikantného poklesu v rastovej perióde 2. kosby v porovnaní s rastovým obdobím 1. kosby (tabuľka 2). Pri ďatelinotrávnej a lucernotrávnej miešanke došlo v rastovom období 3. kosby k zvýšeniu NAR, avšak pri monokultúre medzirodového hybridu výkon asimilačného aparátu dosahoval aj v tomto období záporné hodnoty. Tieto výsledky sú v rozpore s autormi /3/, ktorí uvádzajú jednoznačnú tendenciu poklesu hodnôt NAR od 1. kosby k 3. kosbe na siatych trávnych porastoch.

V roku 2014 dosiahla priemerná primárna produkcia sušiny nadzemnej biomasy signifikantne najvyššie hodnoty na variantoch s monokultúrou medzirodového hybridu *Festulolium* a najnižšie pri lucernotrávnej miešanke (tabuľka 3). Pri všetkých variantoch rozdelenie tvorby úrody počas vegetačného obdobia korešponduje s dynamikou NAR a CGR.

Tab.1: Špecifická rýchlosť rastu (RGR,  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) a špecifická rýchlosť rastu listovej plochy ( $\text{RGR}_A$ )

Kosba	RGR ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )				$\text{RGR}_A$ ( $\text{mm}^2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ )			
	Variant			Priemer	Variant			Priemer
	1	2	3		1	2	3	
1.	45,95	57,97	48,60	50,84 <sup>c</sup>	44,31	45,97	43,78	44,68 <sup>b</sup>
2.	-19,47	-26,09	-22,79	-22,78 <sup>a</sup>	-12,36	-10,56	-10,96	-11,29 <sup>ab</sup>
3.	-8,56	3,03	15,26	1,44 <sup>b</sup>	-160,39	1,08	11,41	-56,89 <sup>a</sup>
Priemer	5,97 <sup>a</sup>	11,63 <sup>a</sup>	16,49 <sup>a</sup>	-	-42,81 <sup>a</sup>	12,16 <sup>a</sup>	15,16 <sup>a</sup>	-

Rozdielne písmená nasledujúce po hodnotách tolerančného indexu v rovnakom stĺpci poukazujú na hladiny významnosti rozdielov pri  $p < 0,05$

Tab.2: Čistý výkon fotosyntézy (NAR) a rýchlosť prírastku sušiny (CGR)

Kosba	NAR ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ )				CGR ( $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ )			
	Variant			Priemer	Variant			Priemer
	1	2	3		1	2	3	
1.	6617,04	8229,31	5697,92	6848,09 <sup>b</sup>	473,99	428,36	222,47	374,95 <sup>c</sup>
2.	-1262,10	-1658,12	-1170,71	-1363,69 <sup>a</sup>	-413,79	-430,45	-206,49	-380,26 <sup>a</sup>
3.	-1571,44	286,12	1606,83	-80,28 <sup>a</sup>	-79,86	23,31	117,88	9,39 <sup>b</sup>
Priemer	1261,17 <sup>a</sup>	2285,15 <sup>a</sup>	2099,39 <sup>a</sup>	-	-5,55 <sup>a</sup>	7,06 <sup>a</sup>	35,45 <sup>a</sup>	-

Rozdielne písmená nasledujúce po hodnotách tolerančného indexu v rovnakom stĺpci poukazujú na hladiny významnosti rozdielov pri  $p < 0,05$

Tab. 3: Primárna produkcia sušiny nadzemnej biomasy ( $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ )

Variant	1.kosba		2.kosba		3.kosba		Suma
	$\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$	%	$\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$	%	$\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$	%	$\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$
1	784,59	65	267,8	22	157,52	13	1 209,91 <sup>c</sup>
2	499,93	58	158,41	19	196,27	23	854,61 <sup>b</sup>
3	364,10	48	196,78	26	202,85	27	763,73 <sup>a</sup>

Rozdielne písmená nasledujúce po hodnotách tolerančného indexu v rovnakom stĺpci poukazujú na hladiny významnosti rozdielov pri  $p < 0,05$

Tab.4: Pearsonov korelačný koeficient medzi RGR,  $\text{RGR}_A$ , NAR, CGR, primárnou produkciou a úhrnom zrážok a priemernou dennou teplotou za rastové obdobia medzi kosbami

Parameter	Premenná	Variant		
		1	2	3
RGR [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ]	R [mm]	-0,77 <sup>+</sup>	-0,62	-0,52
RGR [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ]	T [°C]	-0,94 <sup>+</sup>	-0,84 <sup>+</sup>	-0,78 <sup>+</sup>
$\text{RGR}_A$ ( $\text{mm}^2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ )	R [mm]	-0,56	-0,74	-0,84
$\text{RGR}_A$ ( $\text{mm}^2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ )	T [°C]	-0,47	-0,92 <sup>+</sup>	-0,84 <sup>+</sup>
NAR ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ )	R [mm]	-0,84 <sup>+</sup>	-0,69 <sup>+</sup>	-0,62
NAR ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ )	T [°C]	-0,94 <sup>+</sup>	-0,85 <sup>+</sup>	-0,84 <sup>+</sup>
CGR ( $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ )	R [mm]	-0,60	-0,43	-0,32
CGR ( $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ )	T [°C]	-0,89 <sup>+</sup>	-0,62 <sup>+</sup>	-0,62
Primárna produkcia ( $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ )	R [mm]	-0,87 <sup>+</sup>	-0,63	-0,52
Primárna produkcia ( $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ )	T [°C]	-0,98 <sup>+</sup>	-0,90 <sup>+</sup>	-0,69

R – úhrn zrážok za rastové obdobie, T - priemerná denná teplota ovzdušia za rastové obdobie,

<sup>+</sup> - štatisticky preukazné pri hladine významnosti rozdielov pri  $p < 0,05$

V tabuľke 4 sú uvedené hodnoty Pearsonovho korelačného koeficientu, ktoré vyjadrujú silu vplyvu poveternostných faktorov na parametre rastovej analýzy a primárnej produkcie v našom pokuse. Pri monokultúre medzirodového hybridu bola evidovaná signifikantne negatívna korelácia medzi RGR, NAR, primárnou produkciou a obidvoma faktormi počasia, zatiaľ čo pri d'atelinotrávnej miešanke mala na rast a výkon asimilančného aparátu ako aj na primárnu produkciu štatisticky významný vplyv len priemerná denná teplota ovzdušia počas rastových období. Produkčné parametre lucernotrávnej miešanky preukázali najnižšiu závislosť od poveternostných faktorov. Primárna produkcia aj CGR boli negatívne ovplyvnené zrážkami aj teplotou ovzdušia, avšak hodnoty Pearsonovho korelačného koeficientu neboli signifikantne významné.

#### LITERATURA

- /1/ Gáborčík, N. (1983): Fotosynteticko-asimilačný proces v ovplyvňovanom trávnom poraste. Záverečná správa. Banská Bystrica : VÚLP, 1983. 106s.
- /2/ Gáborčík, N, Kašper, J. (1988): Kostrava trst'ovitá – štúdium morfológicko-fyziologických a produkčných vlastností na Výskumom ústave lúk a pasienkov. In *Vedecké práce VÚLP*. Banská Bystrica : VÚLP, 19, 1988: 149-164
- /3/ Ilavská, I., Rataj, D., Gáborčík N., Gonda L. (2001): Vplyv minerálneho hnojenia na niektoré parametre rastovo-produkčného procesu. In *Acta fytotechnica et zootechnica*,. 4, 2001: 5-9.
- /4/ Kizeková, M.: Udržateľné systémy pestovania krmovín v podhorských oblastiach. Priebežná správa. Banská Bystrica : NPPC-VÚTPHP.26s.
- /5/ Reich, P.B., Buschena, C., Tjoelker, M.G., Wrage, K., Knops, J, Tilman, D., Machado, J.L. (2003): Variation in growth rate and ecophysiology among 34 grassland and savanna species under contrasting N supply: a test of functional group differences. In *New Phytol*, roč. 157, 2003, s. 617–631.
- /6/ Shen, L., Li, Z., Guo, X. (2014) Remote sensing of leaf area index (LAI) and a spatiotemporally parameterized model for mixed grasslands. In *International Journal of Applied Science and Technology*, roč. 4, č. 1, s. 46-61.
- /7/ Šesták, Z., Čatský, J. (1966): *Metody studia fotosyntetické produkce rostlin*. Praha: Academia, 1966, 396s.

#### Pod'akovanie

Príspevok bol spracovaný vďaka podpore projektu APVV-0098-12 Analýza, modelovanie a hodnotenie agroekosystémových služieb a rezortného projektu výskumu.

## POŠKOZENÍ KOŘENOVÉHO SYSTÉMU OZIMÉ ŘEPKY PATOGENEM *PLASMODIOPHORA BRASSICAE* VE VZTAHU K DÉLCE HLAVNÍHO KOŘENE A ŠÍŘCE KOŘENOVÉHO KRČKU

### *DAMAGE OF ROOT SYSTEMS BY OILSEED RAPE PATHOGENS PLASMODIO-PHORA BRASSICAE WITH RESPECTS TO LENGHT OF MAIN ROOT AND WINDH OF HYPOCOTYLS*

Vojtěch Hlavjenka<sup>1</sup>, Aleš Dufek<sup>2</sup>, Hana Šefrová<sup>3</sup>, Marek Seidenglanz<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Agritec Plant Research, s.r.o., Oddělení technických plodin, Zemědělská 16, 787 01 Šumperk, Česká republika, hlavjenka@agritec.cz

<sup>2</sup> Agrovýzkum Rapotín, s.r.o., Výzkumníků 267, 788 13 Vikýřovice, Česká republika, ales.dufek@vuchs.cz

<sup>3</sup> Mendelova univerzita v Brně, Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství, Agronomická fakulta, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, hana.sefrova@mendelu.cz

<sup>4</sup> Agritec Plant Research, s.r.o., Oddělení ochrany rostlin, Zemědělská 16, 787 01 Šumperk, Česká republika, seidenglanz@agritec.cz

#### *Summary*

Club-root of rape (*Plasmodiophora brassicae* Woronin, 1877) is disease of cruciferous plants with gradually increasing importance in the Czech Republic. The pathogen damages adventitious and main root system with different intensity. Plants without tumors had significantly thinner hypocotyls in comparison with symptomatic plants. Plants without tumors had roots significantly longer in comparison of roots of hardly damaged plants. Even slightly damaged plants had significantly longer main roots than hardly damaged plants.

*Key words: Plasmodiophora brassicae, root systems, tumors, rapa*

#### *Souhrn*

Původce nádorovitosti kořenů košťálovin – *Plasmodiophora brassicae* Woronin, 1877 poškozuje s různou intenzitou kořenový systém ozimé řepky. Mezi rostlinami bez přítomného nádoru, byla průměrná šířka kořenového krčku signifikantně nižší, než u rostlin s nádorem na postranním a hlavním kořeni a celkovou deformovanou soustavou. Průměrná délka hlavního kořene rostlin bez přítomného nádoru byla signifikantně větší, než u rostlin s nádorem na hlavním kořeni a deformovanou celou soustavou. Signifikantně delší hlavní kořen měly též slaběji napadené rostliny (rostliny s nádory na postranních kořenech) v porovnání s rostlinami s poškozeným hlavním kořenem a celkovou deformací.

*Klíčová slova: Plasmodiophora brassicae, řepka ozimá, kořenový system, nádory*

## ÚVOD

Nádorovitost kořenů brukvovitých (též boulovitost, plasmodiofóra) je jednou z nejstarších, nejzávažnějších a nejrozšířenějších chorob brukvovitých plodin, jejímž původcem je mikroorganismus *Plasmodiophora brassica* /1/, /6/. Význam tohoto půdního organismu v poslední době narůstá, zejména proto, že je stále větším problémem dodržovat dostatečně dlouhé časové odstupy v zařazování brukvovitých rostlin do osevních postupů. Řepka ozimá se seje dříve, její osevní plochy narůstají a stále častěji se používají brukvovité meziplodiny /2/, /8/. Nejvýraznějším příznakem poškozených rostlin jsou abnormálně zvětšené deformované kořeny s výskytem nádorů, tvořících se na vedlejších i hlavních kořenech, nebo na stonkové části těsně pod povrchem půdy



/3/, /4/, /5/, /9/. Vzhledem k poškození, které patogen způsobuje, bylo cílem pokusu zjistit vliv intenzity napadení kořenů na délku hlavního kořene a šířku kořenového krčku.

## MATERIÁL A METODA

Intenzita (míra) napadení kořene rostlin byla na území Olomouckého kraje hodnocena na čtyřech lokalitách (Nový Malín, Zábřeh na Moravě, Libina, Bludov) na podzim v roce 2014 a na jaře roku 2015 v Bludově. Pro stanovení intenzity napadení byla využita stupnice podle Buczackiho a kol. (1975) /7/ v rozsahu 0 – 3, kde 0 = bez vizuálních příznaků napadení, 1 = nádory pouze na postranních kořenech, 2 = nádory na hlavním kořenu, 3 = deformovaná celá kořenová soustava. Celkově bylo odebráno 1161 rostlin, kterým byly přiřazeny jednotlivé stupně intenzity poškození, změřena délka hlavního kořene (cm) a šířka kořenového krčku (mm). K vyhodnocení vlivu intenzity poškození kořene na délku hlavního kořene a šíři kořenového krčku byla použita ANOVA s následným Tukeyho HSD testem. Faktor intenzita měl 4 hladiny (skupiny 0, 1, 2 a 3). Data byla před vlastní analýzou logaritmicky transformována, aby vyhověla požadavkům statistických testů, což bylo ověřováno Leveneho testem. Výpočty i grafická znázornění byla provedena v program SPSS 16.0.1 for Windows.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Vliv intenzity poškození na šířku krčku byl průkazný ( $p < 0,001$ ). Průměrné hodnoty šíře kořenového krčku (mm) pro jednotlivé stupně poškození jsou uvedeny v Tab. 1. Průměrná šířka kořenového krčku rostlin bez přítomných nádorů (stupeň 0) byla prokazatelně menší při srovnání s ostatními průměrnými hodnotami šíře krčků, jejichž kořenová soustava byla poškozena s různou intenzitou (viz Obr. 1, Tab. 2). U jednotlivých skupin rostlin, jejichž kořenová soustava byla postižena s různou intenzitou (stupeň 1, 2, 3), se průměrné hodnoty šíře krčku vzájemně statisticky nelišily (viz Obr. 1, Tab. 2). Vliv intenzity poškození na délku hlavního kořene byl průkazný ( $p < 0,001$ ). Průměrné hodnoty délky hlavního kořene (cm) pro jednotlivé stupně poškození jsou uvedeny v Tab. 1. Průměrné délky hlavního kořene u rostlin bez přítomných nádorů (stupeň 0) a rostlin, kde se nádor vyskytl pouze na postranním kořeni (stupeň 1), se mezi sebou nelišily (Tab. 2; Obr. 2). Průkazně se lišila průměrná délka kořene rostlin bez výskytu nádoru (stupeň 0) od průměrné hodnoty délky kořene rostlin s výskytem nádoru na hlavním kořeni (stupeň 2) a hodnoty naměřené u rostlin s celou deformací kořenové soustavy (stupeň 3) (Tab. 2; Obr. 2). Stejný průkazný rozdíl byl zjištěn mezi průměrnou délkou kořene s výskytem nádoru pouze na postranním kořeni (stupeň 1) a průměrnou hodnotou délky kořene rostlin s výskytem nádoru na hlavním kořeni (stupeň 2) a rovněž s hodnotou naměřenou u rostlin s celkovou deformací kořene (stupeň 3) (Tab. 2; Obr. 2). Rozdíl mezi průměrnou hodnotou délky kořene rostlin, u kterých byl zaznamenán nádor na hlavním kořeni (stupeň 2) a rostlinami, jejichž kořenová soustava byla celkově deformovaná (stupeň 3) nebyl průkazný (Tab. 2; Obr. 2).

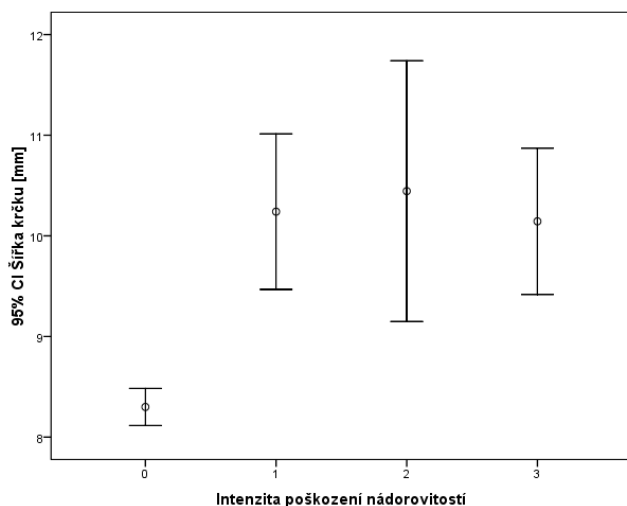
Na základě provedených analýz lze tvrdit, že přítomnost nádoru signifikantně ovlivňuje jak šířku kořenového krčku, tak i délku hlavního kořene. O schopnosti rostliny vypořádat se s přítomností nádoru a o jeho vlivu na rostlinu se můžeme pouze dohadovat. Rostliny, u kterých byl zjištěn nádor pouze na postranních kořenech, jsou schopny dalšího růstu a vývoje a ve výsledné fázi vytvořit i semena. I u rostlin, jejichž kořenová soustava byla celá deformovaná, jsme zaznamenali částečnou regeneraci a schopnost dalšího růstu, ale ve všech případech byly zakrnělé a snadno se při kontaktu v kořenové části lámaly. Z toho důvodu lze usuzovat, že vývoj na podzim silně poškozených porostů má velmi nejistou budoucnost.

Tab. 1 Průměrné hodnoty šíře kořenového krčku a délky hlavního kořene pro jednotlivé stupně intenzity poškození

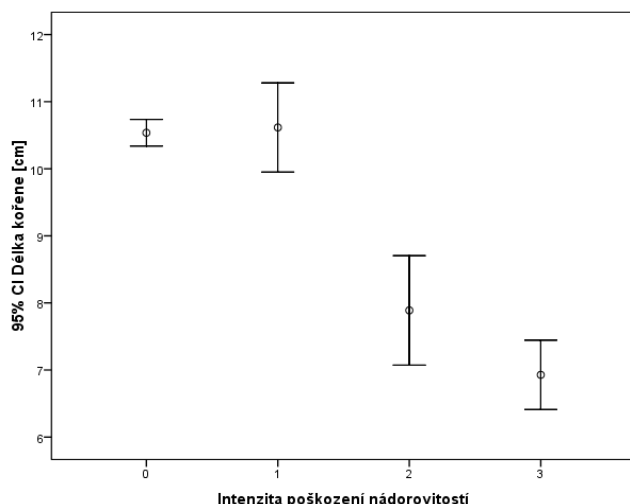
	Stupeň intenzity poškození kořene			
	0	1	2	3
šíře kořenového krčku (mm)	8,30	10,24	10,44	10,14
délka hlavního kořene (cm)	10,54	10,62	7,89	6,93

Tab. 2 Výsledek Tukeyho testu (intenzita poškození kořene nádorem × šíře kořenového krčku a délky hlavního kořene), srovnání jedné skupiny (I) (resp. stupně intenzity poškození) s ostatními skupinami (stupně intenzity poškození) na hladině významnosti (p)

(I) Intenzita	(J) Intenzita	Signifikance šířka krčku (p)	Signifikance (p) délka kořene
0	1	0,000	1,000
	2	0,002	0,000
	3	0,000	0,000
1	0	0,000	1,000
	2	0,993	0,000
	3	0,988	0,000
2	0	0,002	0,000
	1	0,993	0,000
	3	1,000	0,088
3	0	0,000	0,000
	1	0,988	0,000
	2	1,000	0,088



Obr. 1 Průměrné hodnoty šíře kořenových krčků pro jednotlivé stupně intenzity poškození a jejich 95% konfidenční intervaly



Obr. 2 Průměrné hodnoty délky kořene pro jednotlivé stupně intenzity poškození a jejich 95% konfidenční intervaly

## LITERATURA

- /1/ Chytilová V., Dušek K.: Metodika testování odolnosti brukvovitých plodin k nádorovitosti. 2007. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 21 s. ISBN 978-80-87011-23-2
- /2/ Seidenglanz M., Hlavjenka V., Ondráčková E., Ondřej M., Poslušná J.: Distribuce larev květilky zelné (*Delia radicum*) a nádorovitých rostlin (*Plasmiodiophora brassicae*) v porostech řepky ozimé. Rostlinolékař, 2013, Vol 24, No. 5, 31-36. ISSN 1211-3565
- /3/ Kopecký P., Cenklová V.: Studium odolnosti vybraných genotypů kapusty kadeřavé vůči nádorovitosti brukvovitých. Úroda, 2013, Vol. 61, No. 12 vědecká příloha časopisu, 154-157, ISSN 0139-6013
- /4/ Bittner, V.: Škodlivé organismy řepky. 2006, Agro tisk s.r.o., Hradec Králové, 54 s. ISBN 80-903764-0-1
- /5/ Kazda J., Plachká E., Spitzer T.: Metodika ochrany rostlin proti chorobám, škůdcům a plevelům: Řepka, Hořčice. 2008, Kapitola: Choroby řepka, hořčice. Agrotest Fyto, s.r.o., ČZU Praha, OSEVA PRO s.r.o., Výzkumný ústav olejnin Opava, SRS Brno, 24-26.
- /6/ Kopecký P., Hron K., Hružková K., Hýbl M., Dušek K.: Studium odolnosti genotypů čínského zelí a růžičkové kapusty vůči nádorovitosti brukvovitých. Úroda, 2014, Vol. 62. No. 12 vědecká příloha časopisu, 207-210, ISSN 0139-6013
- /7/ Buczacki S.T. (ed.): 1, Zoosporic plants pathogens – a modern perspective. 1983, Academic Press, 352 s.
- /8/ Nerad D., Vašák J.: Integrovaná ochrana řepky – utopie či realita? Úroda, 2001, Vol. 49, No. 5, 36-37, ISSN 0139-6013
- /9/ Seidenglanz M., Hlavjenka V.: Možnosti hodnocení distribuce vybraných škodlivých organismů v porostu ve vztahu k odhadům rizik pro jednotlivé zóny porostu. Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin, 13. -14. února 2013, Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha, 206-210.

## Poděkování

Uvedené výsledky byly získány s využitím institucionální podpory č. RO1215 Ministerstva zemědělství ČR a projektů NAZV č. QH81218 a QJ1230077.

**ZDRAVOTNÝ STAV BREZY PREVISNUTEJ V MESTSKOM PROSTREDÍ****HEALTH CONDITION OF SILVER BIRCH IN URBAN GREENERY**

Helena Ivanová

Ústav ekológie lesa SAV Zvolen, Pobočka biológie drevín, Akademická 2, SK-949 01 Nitra, Slovakia, e-mail: helena.ivanova@savzv.sk

**Summary**

During the study of the mycoflora of birch (*Betula pendula* Roth) growing in different greenery types of Nitra town twelve fungal species were recorded: *Alternaria alternata*, *Asteroma microspermum*, *Cryptocline betularum*, *Discula betulae*, *Epicoccum* sp., *Marssonina betulae*, *Melanconium betulinum*, *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Phyllosticta betulina*, *Pyrenopeziza betulicola* and *Stemphylium* sp. Many of them caused anthracnose and on leaves formed small, irregular or circular brown spots with dark brown margins or broad necrotic blotches. These microscopic fungi as biotic stresses associated with lesions on the birch leaves together with changed environmental conditions are causal factors weakening their health state and vitality.

*Key words: Betula pendula, fungal pathogens, greenery types, leaf spots*

**Súhrn**

Počas výskumu mykoflóry briez rastúcich v rôznych typoch zelene v meste Nitra sme zaznamenali výskyt dvanástich druhov húb: *Alternaria alternata*, *Asteroma microspermum*, *Cryptocline betularum*, *Discula betulae*, *Epicoccum* sp., *Marssonina betulae*, *Melanconium betulinum*, *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Phyllosticta betulina*, *Pyrenopeziza betulicola* a *Stemphylium* sp. Mnohé z nich spôsobujú antraknózu a na listoch vyvolávajú vznik malých, nepravidelných alebo okrúhlych hnedých škvrn s tmavým okrajom alebo veľké nekrotické plochy. Tieto mikroskopické huby ako biotické stresory spojené s léziami na listoch briez spolu so zmenenými environmentálnymi podmienkami sú hlavnou príčinou oslabenia ich zdravotného stavu a vitality.

*Kľúčové slová: breza previsnutá, listová škvrnitosť, parazitické huby, typy zelene*

**ÚVOD**

Breza previsnutá (*Betula pendula* Roth., syn. *B. verrucosa*, *B. alba*) je nenáročný, rýchlo rastúci opadavý strom so štíhlym kmeňom, ktorý púta pozornosť svojou bielou kôrou a typickým tvarom koruny. Na pôdu je nenáročná, rozšírená je v nížinách aj vo vyšších polohách. Symptómy poškodenia parazitickými hubami sa prejavujú vo forme škvrn na listoch, ktoré sa rýchlo rozširujú, výsledkom čoho vznikajú veľké plochy odumretých pletív. Vývoj symptómov závisí na poveternostných podmienkach. Oslabuje sa imunitný systém drevín, listy zakrpatievajú a postupne opadávajú. Na infikovaných opadaných listoch huby prezimujú. Sporujú na jar za priaznivých teplotných a vlhkostných podmienok. Prvé lézie, ktoré produkujú nepohlavné spóry sa začínajú objavovať na začiatku júla, prípadne aj skôr. Každoročne sa opakujúci vznik listových škvrnitostí má za následok okrem estetických prejavov aj celkové oslabenie a chradnutie dreviny a zníženie jej odolnosti voči nepriaznivým podmienkam prostredia. Výsledkom vlhkostných podmienok na jar (máj) a v lete (júl-september) 2014 s úhrnmi zrážok nad dlhodobým priemerom (DP) a s nadpriemernou oblačnosťou a vysokou vlhkosťou vzduchu, kedy boli vysoké predovšetkým nočné minimá teploty vzduchu bola na Slovensku jar 2014 až na niekoľko chladnejších epizód veľmi teplá a celkovo bol rok 2014 doteraz najteplejším rokom v histórii meteorologických pozorovaní. Tieto podmienky svojou mierou prispeli aj k objaveniu sa väčšieho počtu parazitických mikroskopických húb na brezách ako dôležitých biotických stresorov podieľajúcich sa na

oslabovaní ich zdravotného stavu a znižovaní vitality. Zaznamenali sme nasledovné huby: *Alternaria alternata*, *Asteroma microspermum*, *Cryptocline betularum*, *Discula betulae*, *Epicoccum* sp., *Marssonina betulae*, *Melanconium betulinum*, *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Phyllosticta betulina*, *Pyrenopeziza betulicola* a *Stemphylium* sp.

## MATERIÁL A METÓDY

Vzorky listov brezy previsnutej so symptómami poškodenia zozbierané počas roku 2014 pochádzali z verejných plôch a zo súkromných záhrad mesta Nitry. Nachádzajú sa v depozite Herbára Ústavu ekológie lesa SAV, Pobočka biológie drevín, Nitra. Na izoláciu a získanie čistých kultúr sa použili klasické fytopatologické postupy. Kúsok listov sa po sterilizácii kultivovali na 3% PDA médiu v tme pri  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  a 45% vlhkosti v testovacej komore MLR-351H (Sanyo). Klinickým mikroskopom BX41 (Olympus), softvér Quick Photo Micro Version 2.3 sa pri  $400\times$  a  $1000\times$  zväčšení sledovali štruktúry húb. Čisté kultúry húb sa identifikovali podľa morfológických a mikroskopických charakteristík s použitím morfológických kľúčov podľa /26/ a dát z morfológických štúdií /7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 29/.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Rozmery spór pozorovaných húb na breze previsnutej namerané v našich experimentoch porovnané s rozmermi spór nameraných a publikovaných inými autormi sú zhrnuté v tabuľke č. 1. Výskyt taxónov mikroskopických húb na breze previsnutej rastúcej v jednotlivých kategóriách mestskej zelene je zahrnutý v tabuľke č. 2.

***Alternaria a lternata*** Nees je väčšinou saprofytická, menej parazitická huba. Jej husté mycélium sa objavuje pri vlhkom ráze počasia. Spôsobuje listové škvrnitosti a ďalšie ochorenia na viac ako 380 hostiteľských rastlinách /6/. Vyskytuje sa po celom svete na rôznych substrátoch rastlinného pôvodu. Jej svetlohnedé až olivovohnedé konidiofory dlhé  $25\text{--}60 \times 3\text{--}3.5 \mu\text{m}$  nesú svetlohnedé spóry, ktoré sa tvoria v retiazkach na konci hýf. Konídie sú elipsoidné s krátkym kónickým vrcholom a s niekoľkými vertikálnymi a horizontálnymi priehradkami.

***Asteroma microspermum*** (Peck) Sutton (syn. *Gloeosporium betulicola* Sacc. & Dearn.) tvorí na listoch briez okrúhle, nepravidelné škvrny veľké niekoľko mm, na ktorých sa skoro na jar a v lete tvoria plodničky, obsahujúce jednobunkové, hyalíné spóry obklopené hrubou bunkovou stenou. Podľa /8/ konídie *Asteroma* sa tvoria na tom istom druhu lézií ako konídie *Gloeosporium* (*Discula* sp.), ale sú od nich menšie a na agarových médiách neklíčia. Je možné, že *Asteroma* je mikrokonídiová forma *Gloeosporium*. Jej prítomnosť na *Betula pendula* potvrdili aj /19/.

Tab. 1 Porovnanie rozmerov spór pozorovaných húb na breze previsnutej nameraných v našich experimentoch s rozmermi spór nameraných a publikovaných inými autormi

Patogén	Rozmery spór [ $\mu\text{m}$ ] naš experiment	autor	Rozmery spór [ $\mu\text{m}$ ]
<i>Alternaria alternata</i>	25–60×3–3.5	17	39–62×11–19
<i>Asteroma microspermum</i>	10 (15)–20×5–7	20	10 (14)–18 (24)×4 (5)–7
<i>Cryptocline betularum</i>	12 (13)–16 (17)×10 (11)	3	10 (13)–15 (17)×7 (8)–9
<i>Discula betulae</i>	4 (5)–8×2.5 (3)–4	15, 17, 29	4–8×1.5–2.5; 5–9×3–2; 6–16×2.5–4
<i>Epicoccum</i> sp.	15–25×18–20	12	15 (17)–22×14 (19) 20 <i>E. nigrum</i>
<i>Marssonina betulae</i>	19 (22)×5 (7)	29	17–22×8–10
<i>Melanconium betulinum</i>	10 (13)–16×6–9	16	10–12 (14)–18 (20)×5 (6)–7 (8)
<i>Phoma</i> sp.	7–9×2.5–3	5	13–18 (19)×5–7 (9)
<i>Phomopsis</i> sp.	4–8 (10)×2–3 (4)	17	11–6×6–3
<i>Phyllosticta betulina</i>	4–8 (10)×2–3 (4)	2	11 (12)–15×5 (6) 8
<i>Pyrenopeziza betulicola</i>	13–14 (16)×6 (7) 8	34, 35	7.5–12×4.5–8 <i>Ph. minima</i>
	10–15×3 makrokonídie	24	5–12×2–4 makrokonídie
	4–7×2 mikrokonídie		4–6×1.5–2.5 mikrokonídie
<i>Stemphylium</i> sp.	25 (30)–35×15 (18)–20	27	32–45×9–19 <i>St. luffae</i> 23–31×13–19 <i>St. lycii</i> 20–32×10–18 <i>St. cucumis</i>

Tab. 2 Výskyt taxónov mikroskopických húb na breze previsnutej rastúcej v jednotlivých kategóriách mestskej zelene

Huba/lokalita/ kategória	Nitra Chrenová CV, DV, DTV, SV	Nitra Zobor CV, DV	Nitra Centrum CV, DTV	Nitra Čermáň CV, DV, DTV	Nitra Kalvária CV, DV, DTV, SV	Nitra Klokočina CV, DTV, SV	Nitra Sihoť PV	Nitra Brezový hájik PV
<i>Alternaria alternata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Asteroma microspermum</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Cryptocline betularum</i>	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>Discula betulae</i>	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>Epicoccum</i> sp.	+	+	-	+	-	+	-	+
<i>Marssonina betulae</i>	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>Melanconium betulinum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Phoma</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Phomopsis</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Phyllosticta betulina</i>	-	+	-	-	+	+	-	-
<i>Pyrenopeziza betulicola</i>	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>Stemphylium</i> sp.	-	+	+	+	+	+	+	+

CV - výsadba pri cestách; DV - výsadba pri domoch; DTV - výsadba pri dopravných tepnách; PV - výsadba v parkoch; SV - zeleň na špeciálne účely

***Cryptocline betularum*** (Ellis & G. Martin) Arx. spôsobuje antraknózu listov briez, ktorá sa na listoch prejavuje hnedými 3-10 mm veľkými škvrkami s tmavohnedými až čiernymi okrajmi. Najviac poškodené listy na spodných konároch rýchlo opadávajú. Huba tvorí acervuly, ktoré sú intra-alebo subepidermálne, obsahujúce nedelené tmavohnedé konídie /3/. V našich experimentoch boli konídie tmavohnedej farby, oválneho tvaru, na jednom konci zúžené, bez priehradky.

***Discula betulae*** (Westend) (syn. *Discula betulina* (J. Kickx f.) Arx., syn. *Gloeosporium betulinum* (J. Kickx f.) je listový patogén briez bežný v celej Európe s charakteristickými škvrkami tvoriaci hnedé 3-4 mm lézie s tmavými okrajmi na oboch stranách listov. Rýchle opadávanie listov je zapríčinené kombináciou stresových faktorov a nevhodných klimatických alebo stanovištných podmienok /1, 14/. Poškodené výhonky a listy briez po 4-5 týždňovej kultivácii na agarovom médiu tvoria rýchlo rastúce kolónie bieleho vzdušného mycélia a nedelené hyalíné konídie /13/.

***Epicoccum*** sp. sa vo všeobecnosti spája s listovými škvrkami rozličných, často starnúcich alebo odumretých rastlín. Jeho suché spóry sú ľahko rozptýlené vetrom a pohybujúcou sa vodou. Mycélium je žlté až tmavooranžové, neskôr hnedé. Konídiophory sú krátke, tvoriace zhľuky. Konídie sú tmavohnedé, okrúhle, veľké, so septami pripomínajúcimi futbalovú loptu /11/.

***Marssonina betulae*** (Lib.) Sacc. (syn. *Gloeosporium betulae* (Lib.) Mont) je primárny patogén výhonkov a kmeňa, spôsobujúci rakovinové rany a odumieranie briez. Predispozíciou na toto ochorenie sú faktory ako: nevhodné stanovište a klimatické zmeny /13/. Sporulácia huby spôsobuje listové lézie a primárna infekcia sa objavuje na jar a je iniciovaná konídiami, ktoré sa objavujú v acervulách na léziách. Konídie sú dvojbunkové, hyalíné, rozširujú sa dažďovými zrážkami /25/.

***Melanconium betulinum*** (Kunze et Schm) je pokladaný za nevýrazného patogéna, ktorý napáda zoslabnuté alebo mŕtve pletivá brezových výhonkov a atakuje drevinu, ktorá je oslabená suchom, zimou alebo herbicídmi /5/. Listy briez sa stávajú chlorotické a skrúcajú sa od vrcholu. Vetvy zostávajú bez listov, neskôr odumierajú konáre a časť koruny. Odumretie nastáva od troch do päť rokov od objavenia sa prvých symptómov. Huba tvorí čierne plodničky a vajcovité až elipsoidné jednobunkové tmavohnedé spóry.

***Phoma*** Sacc. spôsobuje odumieranie listov, ktoré po infekcii strácajú zelenú farbu, žltnú a opadávajú. Druhy rodu *Phoma* sa nachádzajú v pôde, na živých aj odumretých častiach rastlinného tela /4/. Izolované plodničky sú okrúhle, čierne, hladké, otvárajúce sa ostiolom.

Uvoľňujú veľké množstvo elipsoidných, niekedy mierne ohnutých hyalíných jednobunkových spór, obsahujúcich 2-3 olejové kvapôčky /15/.

**Phomopsis** sp. je rozšírený patogén spôsobujúci listové škvrnitosti, rakovinové rany, vädnutie a odumieranie mnohých ekonomicky dôležitých rastlín, medzi nimi aj briez /23/. Huba je charakteristická plodničkami s otvorom (ostiolom) a vretenovitými, jednobunkovými, hyalínymi alfa konídiami s dvomi kvapkami a zvyčajne vláknitými, mierne ohnutými beta konídiami bez kvapiek, ktoré nie sú vždy pozorované /26/.

**Phyllosticta betulina** Sacc. je ľahko šíriaca sa huba, ktorá spôsobuje nevzhľadné pozdĺžne najprv fialkasté, neskôr čierne škvrny pozdĺž listovej žilnatiny /1/. Tie po napadnutí odumierajú a opadávajú. Za vlhkého počasia sa tvoria dva typy spór. Askospóry sú unášané vetrom na nové dreviny, kde na vlhkých listoch klíčia. Konídie sa prenášajú dažďovými zrážkami. Sú hyalíné, jednobunkové, elipsoidné s hrubou bunkovou stenou.

**Pyrenopeziza betulicola** (Fuckel) (A: *Cylindrosporium concentricum* Grev.) je v súčasnosti jedna z najväčších príčin listových škvrnitostí briez (*B. pendula* a *B. pubescens*) /21/. Spôsobuje predčasné žltnutie a opad listov, čo vyvoláva redukciiu fotosyntézy a zníženie odolnosti voči mrazom. Huba tvorí na listoch malé okrúhle škvrny bez zvýraznených okrajov. V acervulách na listových škvrnách sa tvoria makrokonídie a mikrokonídie. Makrokonídie sú hyalíné, hladké, elipsoidné až cylindrické, často jemne ohnuté alebo nepravidelné. Funkcia mikrokonídií je zatiaľ nejasná /20/.

Väčšina druhov rodu **Stemphylium** sú rastlinní patogéni izolovaní z pôdy a z rozličného rastlinného materiálu, napr. z nekrotických častí listov briez. Ich morfológické charakteristiky zahrňujúce variácie tvaru, veľkosti, pomeru dĺžky a šírky, farby a septácie sa odlišujú v závislosti od environmentálnych podmienok, akými sú teplota a substrát /16/. Jednotlivé oválne až široko-elipsoidné spóry sú tmavé, majú 2-3 vnútorné priečne a 1-3 pozdĺžne priehradky.

## LITERATÚRA

- /1/ Adamska, I.: Grzyby pasożytnicze roślin z rodzajów *Betula* L. i *Salix* L. Acta agrobot. 58, 2005: 417–428
- /2/ Arnold, R.H.: A canker and foliage disease of yellow birch. Can. J. Bot. 45, 1967: 783–801
- /3/ Arx, J.A. von : A revision of the fungi classified as *Gloeosporium*. Bibliotheca Mycologica 24. Lehre: Cramer. 1970: 203
- /4/ Aveskamp, M.M., Gruyter, J.de, Woudenberg, J.H.C., Verkley, G.J.M., Crous, P.W.: Highlights of *Didymellaceae*: a polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. Stud. Mycol. 65, 2010: 1–60
- /5/ Bennell, A.P., Millar, C.S.: Fungal pathogens of birch in Britain. Proc. Roy. Soc. Edinburgh. Ser. B, 85, 1984: 153–167
- /6/ Bojarczuk, K., Przybył, K.: Effect of Polluted Substrate on Growth and Health of Silver Birch (*Betula pendula* Roth.). Polish Journal of Environmental Studies 14, 2005: 677–684
- /7/ Ellis, M.B., Ellis, J.P.: Microfungi on land plants. Slough: The Richmond Publishing Co. 1997: 868
- /8/ Eriksson, O.E.: Fungi of Sweden. Ascomycota. 2006a, <http://www.umu.se/myconet/úasco/indexASCO.html>.– Umea
- /9/ Eriksson, O.E.: Outline of Ascomycota. Myconet 12, 2006b: 1–82. [http://archive.fieldmuseum.org/myconet/printed\\_v12\\_a.asp](http://archive.fieldmuseum.org/myconet/printed_v12_a.asp)
- /10/ Farr, D.F., Rossman, A.Y., Palm, M.E., Mc-Cray, E.B.: Fungal Databases, Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA. 2007, <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
- /11/ Fávoro, L.C.L., Melo, F.L., Aguilar-Vildoso, C.I., Araújo, W.L.: Polyphasic Analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. PLoS One. 6(8): 2011
- /12/ Gomes, R.R., Glienke, C., Videira, S.I.R., Lombard, L., Groenewald, J.Z.: *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. Persoonia 31, 2013: 1–41
- /13/ Green, S., Castlebury, L.A.: Connection of *Gnomonia intermedia* to *Discula betulina* and its relationship to other taxa in *Gnomoniaceae*. Mycol. Res. 111, 2007: 62–69
- /14/ Green, S., MacAskill, G.A.: Pathogenicity of *Marssonina betulae* and other fungi on birch. Pl. Path. 56, 2007: 242–250
- /15/ Hečková, Z., Adamčíková, K., Strelková, M., Rózová, Z.: Ascomycetes and their anamorphs associated with shoots of silver birch (*Betula pendula*) growing in the urban greenery of Nitra in Slovak Republic. Folia oecol. 40, 2013: 137–140

- /16/ Hosen, M.I., Ahmed, A.U., Zaman, J.J., Ghosh, S., Hossain, K.M.K.: Cultural and physiological variation between isolates of *Stemphylium botryosum* the causal of *Stemphylium* blight disease of lentil (*Lens culinaris*). World J. Agric. Sci. 5, 2009: 94–98
- /17/ Kurkela, T.: Fungi associated with leaf anthracnoses of birch. In Capretti, P., Heiniger, U., Stephan, R. (eds). Shoot and foliage diseases in forest trees. In Proceedings of a joint meeting of the IUFRO working parties Cancer and Shoot Blights of Conifers (S2.06-02), Foliage Diseases (S2.06-04). Vallombrosa, Firenze, Italy June 6.-11.1994: 94–95
- /18/ Lilja, A., Lilja, S., Kurkela, T., Rikala, R.: Nursery practices and management of fungal diseases in forest nurseries in Finland. A review. Silva fenn. 31, 1997: 79–100
- /19/ Mułenko, W.: Parasitic Hyphomycetes of the Białowieża National Park. III. Acta mycol. 31, 1996: 3–11
- /20/ Paavolainen, L., Hantula, J., Kurkela, T.: *Pyrenopeziza betulicola* and an anamorphic fungus occurring in leaf spots of birch. Mycol. Res. 104, 2000: 611–617
- /21/ Pappinun, A., Degefu, Y., Sysjälä, L., Keionen, K., von Weissenberg, K.: Transgenic silver birch (*Betula pendula*) expresing sugarbeet chitinase 4 shows enhanced resistance to *Pyrenopeziza betulicola*. Pl. Cell Rep. 20, 2002: 1046–1051
- /22/ Pei, Y.F, Wang, Y., O'Neil, N., Zhang, X.G.: Three novel species of *Stemphylium* from Sinkiang, China: their morphological and molecular characterization. Mycol. Progr. 2010 <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11557-010-0686-1/fulltext.html>
- /23/ Rossmann, A.Y., Palm-Hernández, M.E.: Systematics of plant pathogenic fungi: why it matters. Pl. Dis. 92, 2008: 1376–1386
- /24/ Szabó, I.: Az év fája. A bibircses nyír (*Betula pendula*) betegségei. Erdész. Lap. 136 (11), 2001: 346–347
- /25/ Sinclair, W.A., Lyon, H.H.: *Disease of trees and shrubs*. 2nd Ed. Ithaca, NY, USA: Cornell Univ. Press 2005: 659
- /26/ Udayanga, D., Liu, X.Z., McKenzie, E.H.C., Chukeatirote, E., Bahkali, A.H., Hyde, K.D.: The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. Fungal Divers 50, 2011: 189–225
- /27/ Van der Aa, H.A.: Studies in *Phyllosticta* I. Stud Mycol 5, 1973: 1–110
- /28/ Van der Aa, H.A., Vanev, A.: *A revision of the species described in Phyllosticta* (Eds. Aptroot, A., Summerbel, R.C., Verkley, G.J.). CBS, Utrecht, 2002: 510
- /29/ Watanabe, T.: Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2002: 504

## Pod'akovanie

Práca bola podporená projektom VEGA č. 2/0071/14.



## VLIV NANOČÁSTIC NA ROSTLINY

### *INFLUENCE OF NANOPARTICLES ON PLANTS*

Přemysl Landa, Radka Podlipná, Tomáš Vaněk

Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Laboratoř rostlinných biotechnologií, Rozvojová 263, 165 02  
Praha 6 - Lysolaje, landa@ueb.cas.cz

#### *Summary*

ZnO nanowires were the most toxic among tested metal oxide nanowires (ZnO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub> a MnO<sub>2</sub>) towards germinating plants. The most sensitive plants were rape followed by wheat and green pea. Reduced growth and chlorosis in *Arabidopsis thaliana* plants was observed after ZnO nanowires exposure.

*Key words: nanowires, toxicity, Sinapis alba, Pisum sativum, Triticum aestivum, Arabidopsis thaliana, ZnO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, MnO<sub>2</sub>*

#### *Souhrn*

Mezi testovanými nanodrátky různých oxidů kovů (ZnO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub> a MnO<sub>2</sub>) byla výrazná toxicita vůči klíčícím rostlinám zjištěna pouze u ZnO. Nejcitlivější byla hořčice bílá následovaná pšenicí setou a hrachem setým. U rostlin *Arabidopsis thaliana* byla po expozici nanodrátků ZnO zjištěna redukce růstu a chloróza.

*Klíčová slova: nanodrátky, toxicita, Sinapis alba, Pisum sativum, Triticum aestivum, Arabidopsis thaliana, ZnO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, MnO<sub>2</sub>*

## ÚVOD

Výroba a využití nanočástic se v posledních letech rychle zvyšuje. S tím vyvstávají otázky spojené s jejich vlivem na zdraví a životní prostředí. Přesto, že byl zjištěn i pozitivní vliv nanočástic na rostliny /1/, většina studií se zabývá jejich toxicitou. Vedle často studovaných uhlíkových fullerénů a nanotrubiček je největší pozornost zaměřena na nanočástice kovů a oxidů kovů. Mezi ty, u kterých byla zjištěna toxicita pro rostliny, patří např. nanočástice CuO, ZnO a Ag /2/. Uvádí se, že za toxicitu nanočástic jsou zodpovědné ionty kovů uvolňující se z nanočástic /3/, nebo naopak, že toxicita je závislá především na velikosti částic /4/. V naší studii jsme se zaměřili na méně zkoumané nanodrátky a nanotyčky oxidů kovů. Zjišťovali vliv na klíčivost tří plodin a na růst rostlin v *in vitro* podmínkách, hydroponii a v zemině.

## MATERIÁL A METODA

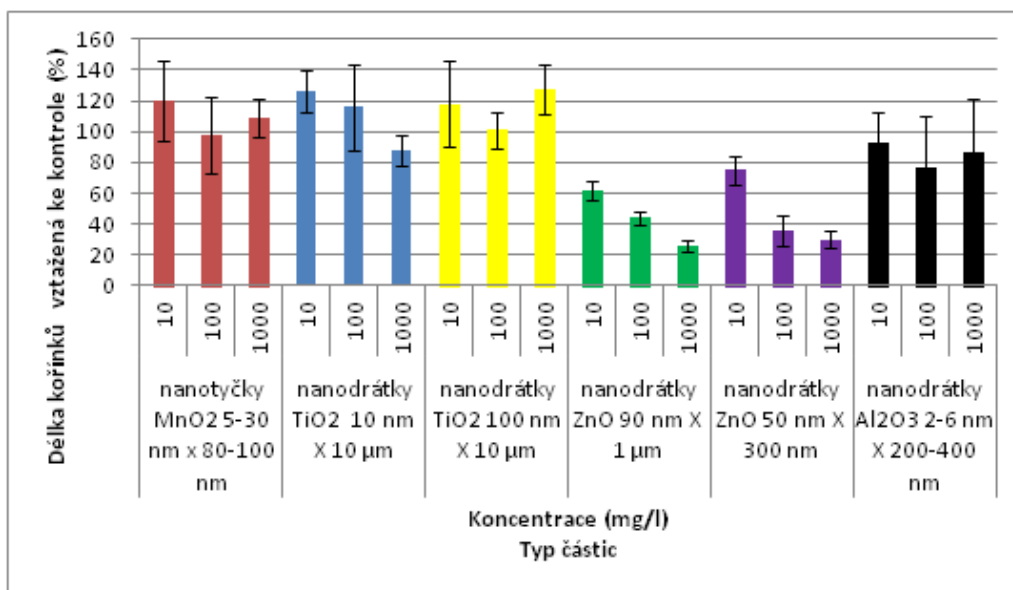
Testovaný materiál: Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanodrátky 2-6 nm × 200-400 nm; MnO<sub>2</sub> nanotyčky 5-30 nm × 80-100 nm; TiO<sub>2</sub> nanodrátky ~100 nm × 10 μm; TiO<sub>2</sub> nanodrátky ~10 nm × 10 μm; ZnO nanodrátky 90 nm × 1 μm; ZnO nanodrátky 50 nm × 300 nm.

Pro testy klíčivosti (tzv. akutní toxicitu) byla použita metoda (podle CSN EN ISO 7346-2), při které je testována klíčivost semen hořčice bílé (*Sinapis alba*). Po inkubační době (72 h) je měřena délka kořínků. Tuto metodu jsme použily i pro další plodiny, hrách setý (*Pisum sativum*) a pšenici setou (*Triticum aestivum*).

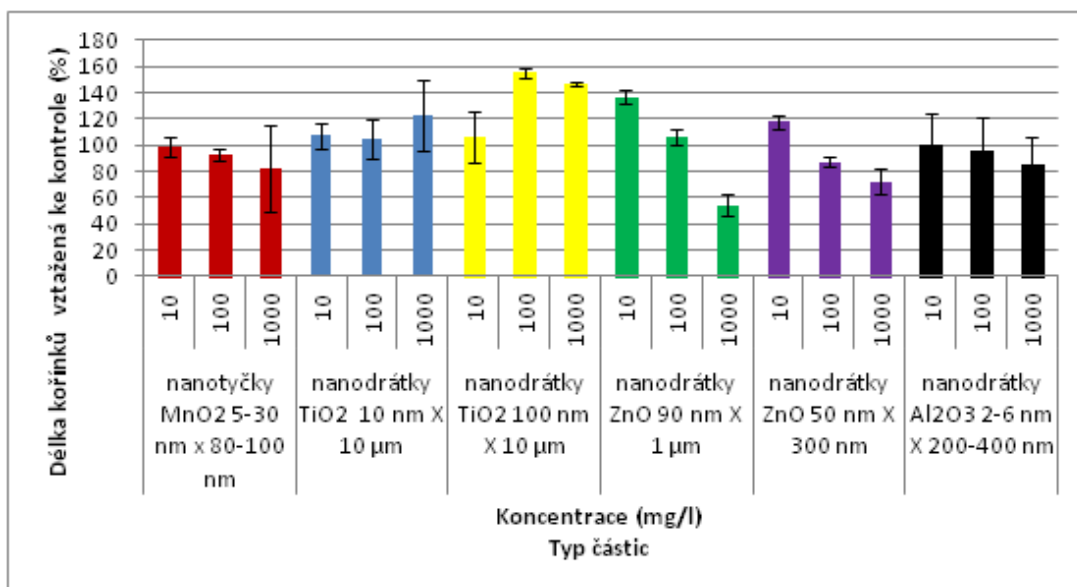
Pro kultivaci *in vitro* bylo použito modifikované Murashige-Skoog medium, pro hydroponickou kultivaci 25% Hoaglandův roztok a pro kultivaci v zemině zahradnický komerčně dostupný substrát.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

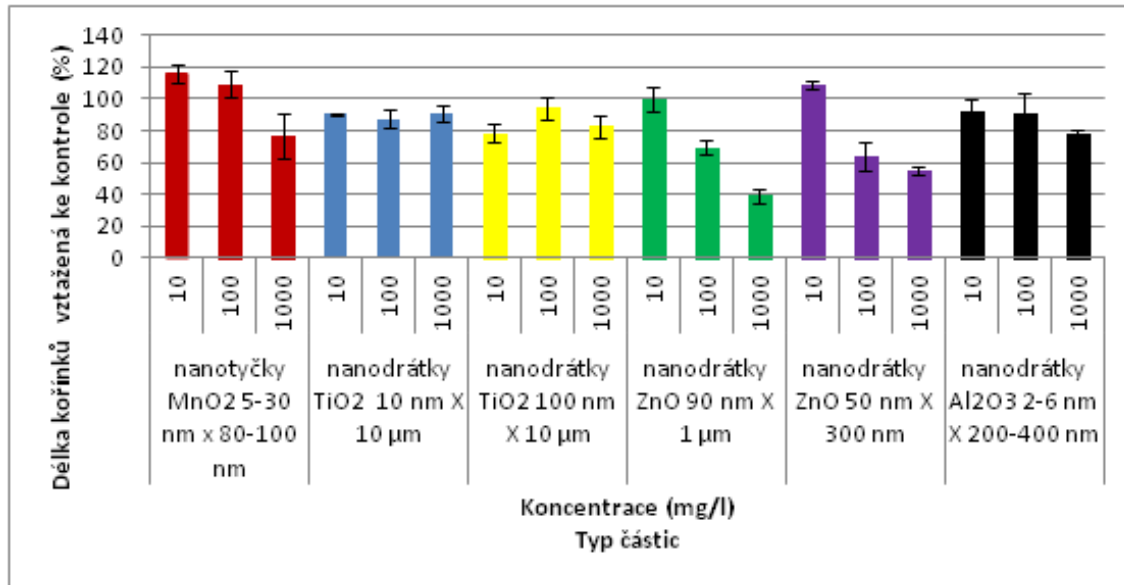
Výsledky získané testem akutní toxicity (vliv na klíčivost) ukázaly, že největší toxicitu mají nanodrátky ZnO (obě velikosti), u kterých byla pozorován vliv na snížení délky klíčících kořenů a jasná odezva na měnící se koncentraci. Nejcitlivější byla hořčice bílá (graf 1), nejméně citlivý hrách setý (graf 2; výsledky pro pšenici setou jsou v grafu 3). U rostliny *Arabidopsis thaliana* se přítomnost nanočástic ZnO projevovала kromě redukce růstu kořenů a nadzemní části (graf 4) také ztrátou chlorofylu a tvorbou antokyanů, jak je vidět na obrázku 1. Podobným způsobem, se chovaly i rostliny pěstované v substrátu (obrázek 2). Rostliny hrachu setého pěstované *in vitro* na přítomnost nanodrátků ZnO v médiu nereagovaly úbytkem nárůstu biomasy a neprojevil se změny v morfologii ani v nejvyšší testované koncentraci 100 mg/l (data nejsou uvedena). U pšenice pěstované v hydroponii a v substrátu se toxicita i v nejvyšší testované koncentraci (100 mg/l) také neprojevila (data nejsou uvedena). Uvedené výsledky se shodují s ostatními autory /3-6/ v tom, že ZnO nanočástice (a to i ve formě nanodrátků) jsou pro některé rostliny toxické. Nicméně citlivost jednotlivých druhů se výrazně liší.



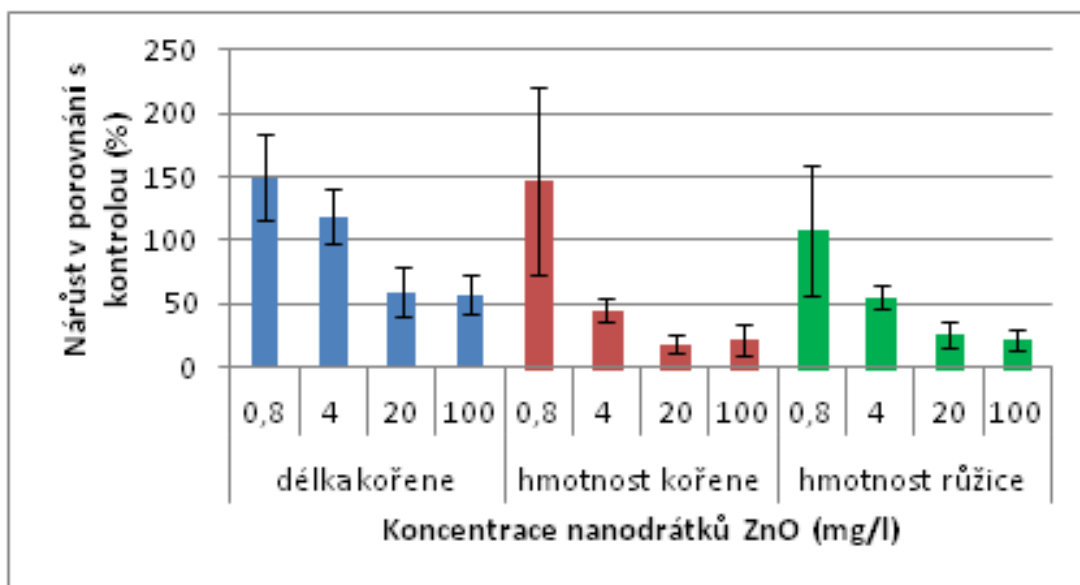
Graf 1: Akutní toxicita nanočástic na klíčící hořčici bílé.



Graf 2: Akutní toxicita nanočástic testovaná na klíčícím hrachu setém.



Graf 3: Akutní toxicita nanočástic testovaná na klíčící pšenici seté.



Graf 4: Vliv různých koncentrací nanodrátků ZnO (50 nm x 300 nm) na délku a hmotnost kořenů a hmotnost listové růžice *A. thaliana* po tří týdenní expozici v hydroponii.



Obrázek 1. *Arabidopsis thaliana* po třech týdnech působení nanodrátků ZnO (90 nm x 1 μm) v pevném médiu. Koncentrační řada – zleva: 100 mg/l; 20 mg/l; 4 mg/l; 0,8 mg/l; kontrola bez ošetření.



Obrázek 4. *A. thaliana* po 2 měsících růstu v půdě kontaminované nanodrátky ZnO (50 nm x 300 nm). Sloupce zleva: kontrola; 4 mg/l; 20 mg/l; 100 mg/l.

#### LITERATURA

- /1/ Khodakovskaya, M.V., Dervishi, E., Mahmood, M., Xu, Y., Li, Z., Watanabe, F., Biris, A.S.: Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth, *ACS Nano*, 3, 2009: 3221–3227.
- /2/ Arruda, S.C.C., Silva, A.L.D., Galazzi, R.M., Azevedo, R.A., Arruda, M.A.Z.: Nanoparticles applied to plant science: A review. *Talanta*, 131, 2015: 693–705.
- /3/ Hu, C., Liu, Y., Li, X., Li, M.: Biochemical responses of duckweed (*Spirodela polyrhiza*) to Zinc Oxide Nanoparticles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 64, 2013:643–651.
- /4/ Lin, D., Xing, B.: Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution* 150, 2007: 243-250.
- /5/ Lee, C.W., Mahendra, S., Zodrow, K., Li, D., Tsai, Y.C., Braam, J., Alvarez, P.J.: Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29, 2010:669-675.
- /6/ Zhou, H., Wang, X., Zhou, Y., Yao, H., Ahmad, F.: Evaluation of the toxicity of ZnO nanoparticles to *Chlorella vulgaris* by use of the chiral perturbation approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406, 2014:3689–3695.

#### Poděkování

Uvedená práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy projektem LD14125. Práce byla dále podporována COST Action MP1206 „Electrospun nanofibres for bio inspired composite materials and innovative industrial applications“.

## **POROVNÁNÍ VLIVU PARACETAMOLU A DIKLOFENAKU NA VYBRANÉ RŮSTOVÉ A BIOCHEMICKÉ PARAMETRY U *LEMNA MINOR***

### ***COMPARISON OF THE INFLUENCE OF PARACETAMOL AND DICLOFENAC ON SELECTED GROWTH AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN LEMNA MINOR***

Markéta Hájková, Marie Kummerová, Štěpán Zezulka

Masarykova univerzita Brno, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie – odd. fyziologie a anatomie rostlin, Kotlářská 2, 611 37, Brno, 323716@mail.muni.cz

#### ***Summary***

Results of this study proved a marginal effect of paracetamol and low concentrations (0.1 and 10  $\mu\text{g/L}$ ) of diclofenac to dry weight of duckweed (*Lemna minor*). The lowest applied concentrations of both drugs (0.1  $\mu\text{g/L}$ ) led in plants to significant decrease in content of photosynthetic pigments. Increasing environmental loading of diclofenac (0.1; 10; 100  $\mu\text{g/L}$ ) led in plants to significant changes in the values of monitored parameters of chlorophyll fluorescence ( $F_V/F_M$ ,  $\Phi_{II}$ , NPQ, Rfd). Exposure to paracetamol was reflected only in the sensitive values of chlorophyll fluorescence (NPQ, Rfd), which indicate the presence of a stressor.

*Key words: Lemna minor, paracetamol, diclofenac, photosynthetic pigments, chlorophyll fluorescence*

#### ***Souhrn***

Výsledky této studie prokázaly nevýznamný vliv paracetamolu a nízkých koncentrací diklofenaku (0,1 and 10  $\mu\text{g/l}$ ) na hmotnost sušiny okřehku menšího (*Lemna minor*). U rostlin se významně snížil obsah všech fotosyntetických pigmentů, a to již u nejnižší aplikované koncentrace obou léčiv (0,1  $\mu\text{g/l}$ ). Se zvyšujícím se zatížením prostředí diklofenakem (0,1; 10; 100  $\mu\text{g/l}$ ) docházelo u rostlin k významným změnám v hodnotách fluorescence chlorofylu ( $F_V/F_M$ ,  $\Phi_{II}$ , NPQ, Rfd). Působení paracetamolu se odrazilo pouze na citlivějších hodnotách fluorescence chlorofylu (NPQ, Rfd), které indikují přítomnost stresoru.

*Klíčová slova: Lemna minor, paracetamol, diklofenak, fotosyntetické pigmenty, fluorescence chlorofylu*

## **ÚVOD**

Riziko spojené s nárůstem spotřeby léčiv a jejich bioakumulací ve vodním prostředí dopadá na necílové organismy /1/. Jedná se o potenciální hrozbu pro biotu. Mezi zdroje kontinuální kontaminace vodních ekosystémů se řadí odpadní vody a kaly. /2/ Studie prokázaly akutní i chronickou toxicitu léčiv a jejich akumulaci v organismech, způsobující poškození nejčastěji indukci oxidativního stresu /3/. Variabilita v toxicitě léčiv je dána jejich druhovou specifičností, proto pozorujeme tendence k rozšiřování spektra pokusných druhů. K dispozici je však stále omezená paleta metod využitelná pro kvantitativní hodnocení jejich potenciálního ekologického dopadu.

Cílem studie bylo porovnat vliv dvou nepoužívanějších nesteroidních léčiv paracetamolu a diklofenaku a jejich zvyšující se koncentrace (0,1; 10; 100  $\mu\text{g/l}$ ) na růstové parametry (počet rostlin, sušina, listová plocha) a vybrané biochemické a fyziologické parametry indikující změny na úrovni buněk u modelové rostliny okřehku menšího (*Lemna minor*). Díky citlivosti a schopnosti akumulace se tato vyšší vodní cévnatá rostlina hojně využívá pro ekotoxikologické testování, studium ekologie společenstev, v produkční biologii i pro farmaceutické účely.

## MATERIÁL A METODA

Paracetamol (PCT) a diklofenak (DCF) byly rozpuštěny v acetonu (Labscan, Ireland) a přidány do Steinbergova živného média (SM, pH 5,5±0,2; ČSN EN ISO 20079) na finální koncentrace 0,1; 10 a 100 µg/l. Rostliny okřehku menšího (*Lemna minor*) byly po předkultivaci umístěny do makrotitračních destiček (6 jamek, objem jamky 15 ml; 6 rostlin na jamku) a kultivovány v SM bez (kontrola) a s přidavkem PCT nebo DCF. Na počátku pokusu (den 0) a po 10 dnech kultivace v řízených podmínkách (teplota 22±2 °C, relativní vzdušná vlhkost 60 %, ozáření 150 µmol/m<sup>2</sup>/s, fotoperioda 12/12) byl u každého zatížení hodnocen počet rostlin, hmotnost sušiny a listová plocha. Obsah fotosyntetických pigmentů – chlorofylu *a*, *b* a karotenoidů – byl stanoven spektrofotometricky na UV-VIS spektrofotometru SPECORD 205, Analytik Jena AG (Jena, Německo). Pro výpočet obsahu fotosyntetických pigmentů byly použity rovnice podle Lichtenthalera /4/. Parametry fluorescence chlorofylu byly měřeny pomocí fluorometru Handy FluorCam (PSI, Česká republika). Měřeními a výpočty byly získány hodnoty: maximálního kvantového výtěžku PSII ( $F_v/F_m$ ), efektivního kvantového výtěžku PSII ( $\Phi_{II}$ ), nefotochemického zhášení fluorescence (NPQ) a relativního poklesu fluorescence chlorofylu (Rfd). Pro vyhodnocení výsledků byla použita jednocestná analýza rozptylu (ANOVA) a Tukey HSD test při  $P < 0,05$ .

## VÝSLEDKY A DISKUSE

Detekce biologické aktivity léčiv v životním prostředí má za následek obavy z jejich nepříznivých účinků na necílové organismy včetně vyšších rostlin, které jsou základem potravního a potravinového řetězce. V rámci bioremediace se již využívá poznatku, že vodní rostliny mohou přispívat k odstranění a biotransformaci xenobiotik /5/.

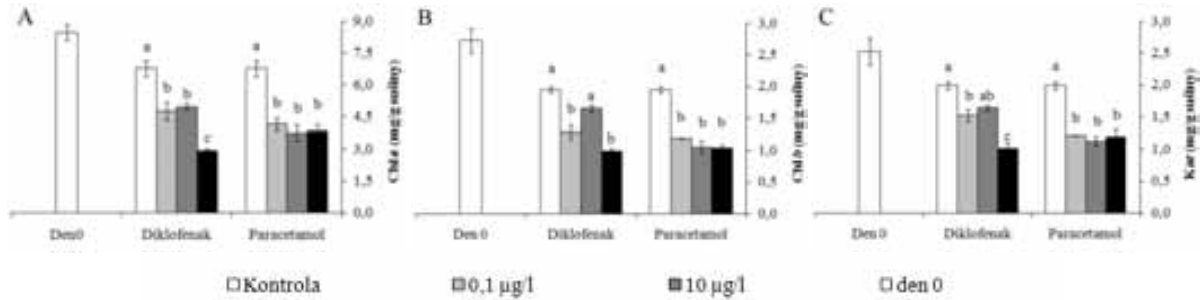
Tab. 1: Vybrané růstové parametry (počet rostlin, hmotnost sušiny a listová plocha) u *Lemna minor* po 10 dnech ve Steinbergově médiu bez (kontrola) a s diklofenakem a paracetamolem (0,1; 10 a 100 µg/l). Hodnoty prezentují průměr ze 6 opakování. Písmena značí statisticky významné rozdíly při  $P < 0,05$  (ANOVA, Tukey HSD range test).

dny kultivace	paracetamol [µg/l]	Počet rostlin	Hmotnost sušiny [mg]	diklofenak [µg/l]	Počet rostlin	Hmotnost sušiny [mg]
0	kontrola	6 ± 0,00	0,31 ± 0,00	kontrola	6 ± 0,00	0,32 ± 0,04
10	kontrola	21,33 ± 1,37 <sup>a</sup>	0,75 ± 0,07 <sup>a</sup>	kontrola	21,33 ± 1,03 <sup>a</sup>	0,75 ± 0,05 <sup>a</sup>
10	0,1	21,67 ± 1,03 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,1	25,33 ± 2,07 <sup>b</sup>	0,93 ± 0,08 <sup>a</sup>
10	10	21,67 ± 0,82 <sup>a</sup>	0,93 ± 0,13 <sup>a</sup>	10	24,5 ± 0,54 <sup>b</sup>	0,83 ± 0,08 <sup>a</sup>
10	100	20,33 ± 1,75 <sup>a</sup>	0,75 ± 0,11 <sup>a</sup>	100	6 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,1 ± 0,01 <sup>b</sup>
dny kultivace	paracetamol [µg/l]	Listová plocha [mm <sup>2</sup> ]	diklofenak [µg/l]	Listová plocha [mm <sup>2</sup> ]		
0	kontrola	4,74 ± 0,04	kontrola	4,74 ± 0,56		
10	kontrola	6,72 ± 0,05 <sup>a</sup>	kontrola	6,72 ± 0,31 <sup>a</sup>		
10	0,1	7,68 ± 0,06 <sup>ab</sup>	0,1	7,52 ± 0,62 <sup>a</sup>		
10	10	7,85 ± 0,08 <sup>b</sup>	10	7,35 ± 0,66 <sup>a</sup>		
10	100	7,38 ± 0,05 <sup>ab</sup>	100	4,74 ± 0,47 <sup>b</sup>		

Zatímco přítomnost PCT neovlivnila počet rostlin okřehku, ani jeho listovou plochu, se zvyšujícím se zatížením DCF (0,1 a 10 µg/l) byl zaznamenán vyšší počet rostlin (tab. 1). Inhibice růstu byla zaznamenána při zatížení 100 µg/l DCF, s čímž souvisí i pokles velikosti listové plochy. Obvykle hodnocený parametr reprezentující tvorbu biomasy – hmotnost sušiny – nebyl ovlivněn žádným zatížením PCT (0,1; 10 a 100 µg/l), ani nízkým zatížením DCF (0,1 a 10 µg/l). Inhibiční

vliv 100  $\mu\text{g/l}$  je v souladu se zjištěním Pomati et al. /6/, kteří dospěli k obdobným výsledkům u ibuprofenu, avšak při použití o řád vyšších dávek léčiva.

Jedním z negativních důsledků přítomnosti xenobiotik je snižování obsahu fotosyntetických pigmentů (chlorofylu *a*, chlorofylu *b* i karotenoidů), který byl zaznamenán již u nejnižších aplikovaných koncentrací PCT i DCF (obr. 1A,B,C). U zatížení 10  $\mu\text{g/l}$  DCF byl pozorován mírný stimulační efekt (obr. 1B). Je zřejmé, že chloroplasty jsou jedním z primárních míst působení xenobiotik /7/.

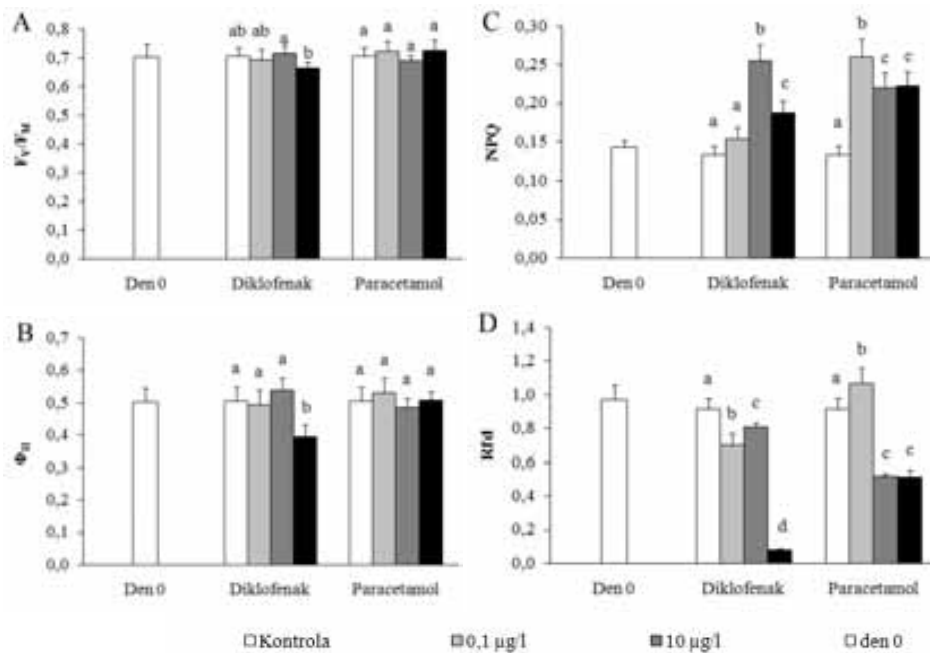


Obr. 1: Obsah fotosyntetických pigmentů: (chlorofyl *a*; A), (chlorofyl *b*; B), (karotenoidy; C) u *Lemna minor* po 10 dnech ve Steinbergově médiu bez (kontrola) a s diklofenakem a paracetamolem (0,1; 10 a 100  $\mu\text{g/l}$ ). Sloupce prezentují průměr ze 6 opakování, chybové úsečky směrodatnou odchylku. Písmena značí statisticky významné rozdíly při  $P < 0,05$  (ANOVA, Tukey HSD range test).

Tab. 2: Poměr obsahu chlorofylu *a/b* a poměr obsahu chlorofylu *a+b*/karotenoidy u *Lemna minor* po 10 dnech ve Steinbergově médiu bez (kontrola) a s diklofenakem a paracetamolem (0,1; 10 a 100  $\mu\text{g/l}$ ). Hodnoty prezentují průměr ze 3 opakování. Písmena značí statisticky významné rozdíly při  $P < 0,05$  (ANOVA, Tukey HSD range test).

dny kultivace	paracetamol [ $\mu\text{g/l}$ ]	chl <sub>a</sub> /chl <sub>b</sub>	chl <sub>a</sub> +chl <sub>b</sub> /kar	diklofenak [ $\mu\text{g/l}$ ]	chl <sub>a</sub> /chl <sub>b</sub>	chl <sub>a</sub> +chl <sub>b</sub> /kar
0	kontrola	3,11 ± 0,00	4,44 ± 0,00	kontrola	3,11 ± 0,00	4,44 ± 0,00
10	kontrola	3,48 ± 0,11*	4,39 ± 0,07*	kontrola	3,48 ± 0,11*	4,39 ± 0,07*
10	0,1	3,50 ± 0,27*	4,41 ± 0,20*	0,1	3,72 ± 0,04 <sup>ab</sup>	3,99 ± 0,11 <sup>b</sup>
10	10	3,57 ± 0,02*	4,27 ± 0,13*	10	2,99 ± 0,08 <sup>b</sup>	4,03 ± 0,08 <sup>b</sup>
10	100	3,71 ± 0,11 <sup>b</sup>	4,10 ± 0,11 <sup>ab</sup>	100	2,96 ± 0,20 <sup>b</sup>	3,86 ± 0,39*

Změny ve sledovaných parametrech fluorescence chlorofylu indikují přítomnost stresoru a jeho vliv na fotosyntézu: snižování hodnot (FV/FM,  $\Phi\text{II}$ , Rfd) a zvýšení hodnot (NPQ). Zatímco při zatížení 100  $\mu\text{g/l}$  DCF bylo zaznamenáno významné snížení hodnot FV/FM a  $\Phi\text{II}$ , u zatížení PCT nebyly změny zaznamenány (obr. 2A,B). Rfd (index vitality) však reaguje citlivěji na přítomnost stresoru než hodnota kvantových výtěžků, což jsme potvrdili u obou testovaných léčiv (obr. 2D). Hodnota NPQ se zvýšila u zatížení 10 a 100  $\mu\text{g/l}$  DCF (obr. 2C) a u všech zatížení PCT. Významné zvýšení této hodnoty u varianty s 0,1  $\mu\text{g/l}$  PCT může souviset s mechanismy aklimace na daný stresor.



Obr. 2: Vybrané parametry fluorescence chlorofylu: maximální kvantový výtěžek PSII ( $F_v/F_m$ ; A), efektivní kvantový výtěžek PSII ( $\Phi_{II}$ ; B), nefotochemické zhášení fluorescence (NPQ; C) a relativní pokles fluorescence chlorofylu (Rfd; D) u *Lemna minor* po 10 dnech ve Steinbergově médiu bez (kontrola) a s diklofenakem a paracetamolem (0,1; 10 a 100  $\mu\text{g/l}$ ). Sloupce prezentují průměr ze 3 opakování, chybové úsečky směrodatnou odchylku. Písmena značí statisticky významné rozdíly při  $P < 0,05$  (ANOVA, Tukey HSD range test).

Výsledky této studie prokázaly, že DCF a PCT mají vliv na růst vodních fototrofů. Jelikož k transformacím dochází již na subcelulární úrovni, můžeme přítomnost stresoru detekovat dříve, než se změny projeví na růstových parametrech.

## LITERATURA

- /1/ Klavarioti, M., Mantzavinos, D., Kassinos, D.: Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environment International*, 35 (2), 2009: 402–417.
- /2/ Kümmerer, K.: The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. *Journal of environmental management*, 90 (8), 2009: 2354–2366.
- /3/ Zhang, D. Q., Gersberg, R.M., Ng, W.J., Tan, S.K.: Removal of pharmaceutical and personal care products in aquatic plant-based systems: A review, *Environmental Pollution*, 184, 2014: 602–639.
- /4/ Lichtenthaler, H.K.: Chlorophylls and carotenoids: Pigment of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 1987: 350–382.
- /5/ Zezulka, Š., Kummerová, M., Babula, P., Váňová, L.: *Lemna minor* exposed to fluoranthene: Growth, biochemical, physiological and histochemical changes. *Aquatic toxicology*, 140–141, 2013: 37–47.
- /6/ Pomati, F., Netting, A.G., Calamari, D., Neilan, B.A.: Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*, *Aquatic Toxicology*, 67, 2004:387–396.
- /7/ Kummerová, M., Zezulka, Š., Král'ová, K., Masarovičová, E.: Effect of zinc and cadmium on physiological and production characteristics in *Matricaria recutita*, *Biologia Plantarum*, 54, 2010: 308–314.

## Poděkování

Uvedená práce vznikla v rámci specifického výzkumu na vysoké škole. Autoři děkují studentovi Mgr. Aleši Bradáčovi (PřF MU) za přípravu experimentu.



## EFEKTY KOFEINU NA ROSTLINY

### *EFFECTS OF CAFFEINE ON PLANTS*

Klára Kobetičová, Gabriel Losonszky, Ondřej Pařízek, Vladimír Kočí

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta technologie ochrany prostředí, Ústav chemie ochrany prostředí, Technická 5, 166 28 Praha 6, Klara.Kobeticova@vscht.cz

#### *Summary*

Caffeine is commonly contained into various drinks and foods but data about its ecotoxicity are relatively lacking. Caffeine was tested using tests with freshwater algae (*Desmodesmus subspicatus*) and mustard (*Sinapis alba*) in the aquatic arrangement. Both the tests were carried out under controlled conditions according to relevant methodologies. The assay endpoints were algae growth rate and yield and root length of mustard species. EC<sub>50</sub> for the algae growth rate was in range 500-750 mg/l and EC<sub>50</sub> for yield was 290.2 mg/l. IC<sub>50</sub> for *S. alba* was estimated as 265 mg/l (26.17-2 687). The results indicate that caffeine caused negative effects for both the test plant species in the relatively high concentrations and it is not toxic at commonly found levels in the environment.

*Key words: caffeine, ecotoxicity, Desmodesmus subspicatus, Sinapis alba*

#### *Souhrn*

Kofein je běžně obsažen v různých druzích nápojů a potravin, informací o jeho ekotoxicitě je ale nedostatek. Kofein byl testován na sladkovodních řasách (*Desmodesmus subspicatus*) a na hořčici (*Sinapis alba*) v akvatickém uspořádání. Oba testy byly provedeny za předepsaných podmínek podle daných metodologických postupů. V testech byly hodnoceny růstová rychlost řas a jejich výtěžek a délka kořenů u hořčice. Pro růstovou rychlost byla stanovena EC<sub>50</sub> v rozmezí 500-750 mg/l a EC<sub>50</sub> pro výtěžek byla stanovena na 290,2 mg/l. Pro hořčici byla IC<sub>50</sub> hodnota vypočítána na 265 mg/l (26,17-2 687). Výsledky naznačují, že kofein působil negativní efekty pro oba testované druhy až v poměrně vysokých koncentracích a není tak při koncentracích běžně nacházených v prostředí pro tyto rostliny toxický.

*Klíčová slova: kofein, ekotoxická, Desmodesmus subspicatus, Sinapis alba*

## ÚVOD

V posledních letech je věnována velká pozornost tzv. mikropolutantům. Mezi ně můžeme zařadit různá léčiva, umělá sladidla a další aditiva používaná v potravinářském průmyslu, jako je například kofein. Kofein patří mezi purinové deriváty a vyskytuje se například v semenech kávovníku arabského, v listech čajovníku a v kolových ořešcích /1/. Jedná se o bílou, krystalickou látku hořké chuti. Do prostředí se může dostávat převážně v odpadních vodách. Jeho účinky na živé organismy jsou však nedostatečně popsány. Z těchto důvodů jsme se rozhodly provést testy fyto toxicity, abychom zjistily, zda jeho přítomnost může mít dopad pro akvatické prostředí.

## MATERIÁL A METODA

Testy ekotoxicity byly provedeny s kofeinem (100% p.a.) od firmy Pufexi, s.r.o. Pro řasy byly použity koncentrace 0 mg/l (kontrola), 25 mg/l, 100 mg/l, 250 mg/l, 500 mg/l a 750 mg/l a pro hořčici 0 mg/l (kontrola), 1 mg/l, 250 mg/l, 500 mg/l, 1 000 mg/l a 1 500 mg/l. Testované koncentrace byly zvoleny na základě výsledků z předběžných testů.

V testu toxicity byl použit druh sladkovodní řasy *Desmodesmus subspicatus* (BÚ AV, Třeboň) a semena hořčice bílé *Sinapis alba* od firmy Osiva Aros, s.r.o. Oba testy probíhaly podle příslušných norem /2,3/.

Test s řasami: na začátku testu bylo pipetováno do kontrolního média /2/ a příslušné koncentrační řady množství řasového inokula odpovídající množství 10 000 buněk/ml. Test probíhal v erlenmayerových baňkách po dobu 72 hodin v termostatu za permanentního třepání a osvětlení (6 000 Lux). Počet řasových buněk byl na začátku i na konci testu počítán pod mikroskopem v počítací komůrce Cyrrus II. Od každé koncentrace i kontroly bylo připraveno po 3 replikách.

Test s hořčicí: pro test byly použity skleněné Petriho misky s víčky o průměru 9 cm. Ty byly na dně vyplněny filtračním papírem, který byl ovlhčen čistým kontrolním médiem /3/ nebo roztoky testovaných koncentrací. Na filtrační papír bylo do každé misky položeno po 15 ks semen hořčice. Po 96 hodinách byla zaznamenána délka kořene u každé rostliny pomocí pravítka. Od každé koncentrace i kontroly bylo připraveno po 3 replikách. Pro každou testovací misku byla spočítána průměrná délka kořene.

Vzorce pro výpočet jednotlivých parametrů a pro výpočet inhibice je uveden v následujících řádcích:

1) Výpočet růstové rychlosti

$$\mu = (\ln x_k - \ln x_0) / (t_k - t_0)$$

kde je  $\mu$  růstová rychlost (b/ml/t<sup>-1</sup>)

$x_k$  hustota (koncentrace) buněk na konci testu (b/ml)

$x_0$  hustota (koncentrace) buněk na počátku testu (b/ml)

$t_k$  doba konce testu (h)

$t_0$  doba počátku testu (h)

2) Výpočet výtěžku u řas

$$Y = (M_K - M_0) / (t_k - t_0)$$

kde je  $Y$  výtěžek (b/ml/t<sup>-1</sup>)

$M_K$  hustota (koncentrace) buněk na konci testu (b/ml)

$M_0$  hustota (koncentrace) buněk na začátku testu (b/ml)

$t_k$  doba konce testu (h)

$t_0$  doba počátku testu (h)

3) Výpočet inhibice růstové rychlosti, výtěžku nebo délky kořene hořčice

$$I = (P_v - P_k / P_k) * 100$$

kde je  $I$  inhibice sledovaného parametru (%)

$P_v$  hodnota měřeného parametru v testovaném vzorku

$P_k$  hodnota měřeného parametru v kontrolním vzorku

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu GraphPad Prism, verze 5. Efektivní koncentrace (IC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>) a jejich intervaly spolehlivosti byly stanoveny metodou nelineární regrese (metoda nejmenších čtverců) /4/.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

Z výsledků testů vyplývá, že u obou organismů došlo po působení kofeinu k negativním efektům. EC<sub>50</sub> pro růstovou rychlost u řas nebylo na základě získaných dat možné stanovit, nachází se v rozmezí 500 - 750 mg/l a EC<sub>50</sub> pro výtěžek byla stanovena na 290,2 mg/l. Pro hořčici byla IC<sub>50</sub> hodnota vypočítána 265 mg/l (26,17-2 687). V literatuře se uvádí, že v odpadních vodách bývají rezidua kofeinu nacházena v jednotkách ng/l až µg/l /5/. Naměřené efekty (IC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>) v naší studii se tak pohybují nad běžnými koncentracemi nacházenými v povrchových či odpadních vodách.

Tab. 1: Naměřené hodnoty růstové rychlosti (ks/ml/den) a výtěžku (ks/ml) u řas a délky kořene (mm) hořčice společně s inhibicí (%) měřených parametrů v porovnání s kontrolními skupinami.

	Testovaná koncentrace (mg/l)
--	------------------------------

<i>Desmodemus subspicatus</i>	kontrola	25	100	250	500	750
Růstová rychlost	1,62	1,53	1,49	1,36	1,04	0,68
<b>I (%)</b>	-	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>36</b>	<b>58</b>
Výtěžek	6 415 000	4 530 000	3 880 000	2 315 000	630 000	140 000
<b>I (%)</b>	-	<b>29</b>	<b>14</b>	<b>40</b>	<b>73</b>	<b>78</b>
<i>Sinapis alba</i>	kontrola	1	250	500	1000	1500
Délka kořene	26	20	17	16	10	3
<b>I (%)</b>	-	<b>23</b>	<b>32</b>	<b>36</b>	<b>63</b>	<b>88</b>

**LITERATURA**

- /1/ Šimová, J., Habermann, V.: Alkaloidy – Malé laboratorní praktikum, Nakladatelství Karolinum Univerzity Karlovy v Praze, Praha 2001, ISBN 80-246-0206-7: 5-16.
- /2/ OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, 2011.
- /3/ Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů. MŽP Praha, 2007.
- /4/ GraphPad Prism 5 for Windows; GraphPad Software Inc. 1999-2007.
- /5/ Prosch, J., Puchert, W.: Caffeine: Occurrence in the rivers of Mecklenburg-Vorpommern. Vom Wasser, 1998 91: 207-214.

**Poděkování**

Uvedená práce vznikla za finanční podpory VŠCHT v Praze.

## ENZYMATICKÉ STUDIE TVORBY ORGANOHALOGENOVANÝCH LÁTEK POMOCÍ MODELOVÝCH SUBSTRÁTŮ

### ENZYMATIC STUDIES OF ORGANOHALOGEN FORMATION BY MODEL COMPOUNDS

Ivona Blažková<sup>1,2</sup>, Eva Tesařová<sup>2</sup>, Sándor T. Forczek<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav experimentální botaniky Akademie věd ČR, Izotopová laboratoř, Videňská 1083, 142 20 Praha 4, alex067@biomed.cas.cz

<sup>2</sup> Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Univerzita Karlova v Praze, Albertov 6, 128 43 Praha

#### Summary

Research in recent years has demonstrated that halogenated organic compounds are formed in nature due to biotic and abiotic processes. One of the most known sources of these substances are from the reaction catalyzed by haloperoxidases which include chloroperoxidase enzyme (CPO) isolated from *Caldariomyces fumago*. CPO enzyme was incubated with chloride or bromide, in the presence of hydrogen peroxide and organic substrates. Experiments were conducted with three substrates (acetone, acetic acid, and glucose), and different concentrations of halides. Measurement of the samples by gas chromatography with an ECD detector showed the influence of the substrate type and halide concentration on the formation of the organohalogen products.

*Key words: organohalogen products, enzyme, gas chromatography*

#### Souhrn

Výzkum v posledních letech prokázal, že se halogenované organické látky tvoří v přírodě vlivem biotických a abiotických procesů. Jedním z nejznámějších zdrojů těchto látek jsou reakce katalyzované haloperoxidázami, k nimž patří i chloroperoxidáza (CPO) izolovaná z *Caldariomyces fumago*. CPO enzym byl inkubován s chloridem či bromidem, v přítomnosti peroxidu vodíku a organických substrátů. Byly provedeny pokusy se třemi substráty (aceton, kyselina octová a glukosa) a s různými koncentracemi halidů. Měření vzorků plynovou chromatografií s ECD detektorem prokázalo vliv povahy substrátu i koncentrace halogenidů na tvorbu organohalogenovaných produktů.

*Klíčová slova: organohalogenové látky, enzymy, plynová chromatografie*

## ÚVOD

Dodnes přetrvává předpoklad, že halogenované organické sloučeniny jsou především produkty antropogenní činnosti a v přírodě se tvoří jen vzácně. Výzkum v posledních letech ovšem prokázal, že tisíce vodních i suchozemských organismů (bakterie, houby, lišejníky, řasy, rostliny a další) jsou schopné tyto látky produkovat [1]. Předpokládá se, že hlavní podíl na tvorbě organických halogenovaných sloučenin mají biotické, enzymy katalyzované procesy, jako jsou haloperoxidázy, nebo flavin-dependentní halogenázy. Ale byla prokázána i tvorba halogenovaných organických sloučenin vlivem abiotických procesů. Příkladem je Fentonova reakce. Chloroperoxidáza (CPO) izolovaná z *Caldariomyces fumago* patří k hemovým peroxidázám. Dokáže využívat nejen chlorid, ale také bromid a jodid a katalyzuje tak vznik halogenovaných organických sloučenin za přítomnosti halogenidu a peroxidu vodíku. Mechanismus katalýzy probíhá následovně: Nejprve reaguje peroxid vodíku s hemovým Fe(III). Vznikne tak sloučenina hem-Fe(IV)=O, zvaná sloučenina I. Ta následně oxiduje například chlorid za vzniku intermediátu hem-Fe(III)-OCl. Další průběh reakce je stále předmětem diskuse. Předpokládá se, že organické sloučeniny reagují buď přímo s tímto intermediátem, nebo enzym

nejprve uvolní do prostředí kyselinu chlornou a chlorace pak proběhne bez dalšího přičinění enzymu /2/.

Cílem této studie je sledovat vznik těkavých chlorovaných a bromovaných sloučenin během inkubace CPO z *Caldariomyces fumago* s různými substráty, halidem a peroxidem vodíku a vliv změny podmínek na tvorbu těchto látek, za účelem lépe porozumět vlivům různých faktorů na enzymatickou tvorbu těkavých halogenovaných látek v přírodě.

## MATERIÁL A METODA

Vzorky byly připravovány do 40 ml vialek. Složkami reakční směsi byl roztok soli (2 M NaCl nebo KBr, 500  $\mu$ l) organický substrát (aceton, kyselina octová, nebo glukosa, vždy 0,1 M) a peroxid vodíku (35%, 50  $\mu$ l). Byly provedeny pokusy bez enzymu i s enzymem (CPO z *Caldariomyces fumago*, Bio-Research Products, North Liberty, USA). Aktivita přidaného enzymu byla 137 u. Směsi byly připraveny v citrátovém pufru o pH 3,56. Vzorky byly inkubovány po dobu 3 hodin při teplotě 25°C a poté proměřeny pomocí plynového chromatografu s ECD detektorem spojeným s mikroextrakcí na pevné fázi (SPME). K extrakci bylo použito SPME CAR/PDMS vlákno (Supelco 75  $\mu$ m, černé) a metoda headspace. Vzorky pro sledování vlivu koncentrace soli na tvorbu produktů enzymatické reakce byly připraveny obdobným způsobem. Roztok chloridu sodného či bromidu draselného byl do reakční směsi přidáván v látkových množstvích 0,1, 1, 10, 100, 1000 a 10000  $\mu$ mol, koncentrace ve vzorku pak činila  $0,13 \cdot 10^{-4}$ –1,13 M. Vzorky byly analyzovány stejným způsobem. Všechny pokusy byly prováděny triplicitně. Jako interní standard byl použit trichlorethylen.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

### Vliv organického substrátu

Při inkubaci CPO s chloridem a organickými substráty byl hlavními reakčními produkty chloroform a bromdichlormethan, při reakcích s bromidem byl hlavním produktem bromoform a látka, jejíž retenční čas odpovídá 1,1,2,2-tetrachlorethanu (Tab. 1.).

produkty / substráty	NaCl			KBr		
	aceton	kyselina octová	glukosa	aceton	kyselina octová	glukosa
chloroform	+	+	++	-	+	+
neznámá látka 1	++	+	+	+	-	-
bromdichlormethan	++	++	++	-	-	-
neznámá látka 2	++	++	++	++	-	-
neznámá látka 3	+	+	+	-	-	-
neznámá látka 4	++	+	+	-	-	+
neznámá látka 5	+	++	+	-	+	+
bromoform	+	+	+	++	++	++
neznámá látka 6	+	+	+	++	++	++

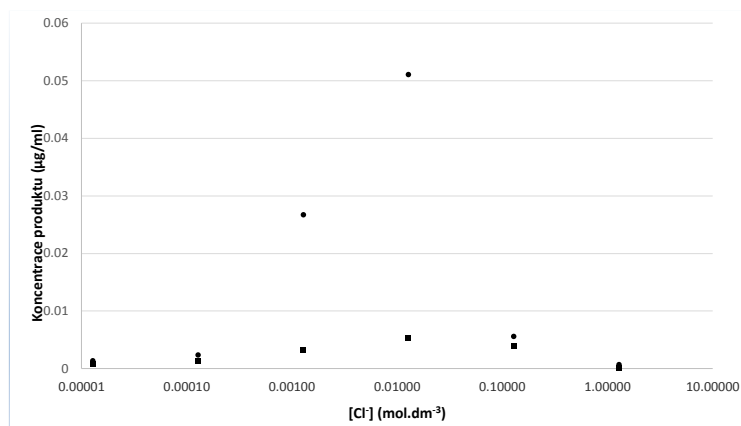
Tab. 1. Produkty 3 h inkubace CPO s halidy (500  $\mu$ l 2 M NaCl nebo KBr) a se třemi různými substráty ( $c=0,1$  M) v citrátovém pufru o pH 3,56. Vysvětlivky: pík látky na chromatogramu byl majoritní (++) minoritní (+) nebo se nevyskytoval (-). Neznámá látka 4 odpovídá ret. časem dibromchlormethanu a n.l. 6 1,1,2,2 – tetrachlorethanu.

Vznik bromovaných látek při reakcích s chloridem a chlorovaných látek při reakcích s bromidem lze vysvětlit nečistotami v použitých chemikáliích, chlorid sodný obsahoval malé množství bromidu a naopak. Několik dalších majoritních produktů bude potřeba identifikovat pomocí GC-MS. Tyto výsledky ovšem mohou být zkreslené, protože jako zdroj halogenovaných produktů může sloužit i citrát, který byl použit jako pufr. Jako substrát pro reakci se vznikající kyselinou chlornou či bromnou může také sloužit samotný enzym /3/. Je tedy třeba provést pokusy bez substrátů, případně s jiným pufrům. U pokusů, kde nebyl do reakční směsi přidán enzym, byly nalezeny reakční produkty

(bromoform a neznámá látka 6) jen v případě, že solí v reakční směsi byl bromid. Po 3 h inkubaci s chloridem bez přidání enzymu nebyly žádné reakční produkty nalezeny. To lze vysvětlit tím, že chlorid a bromid reagují s peroxidem vodíku za vzniku kyseliny chlorné a kyseliny bromné ovšem reaktivita halogenidů s peroxidem klesá směrem od jodidu k chloridu /4/. Bromid tedy reaguje s peroxidem lépe, než chlorid.

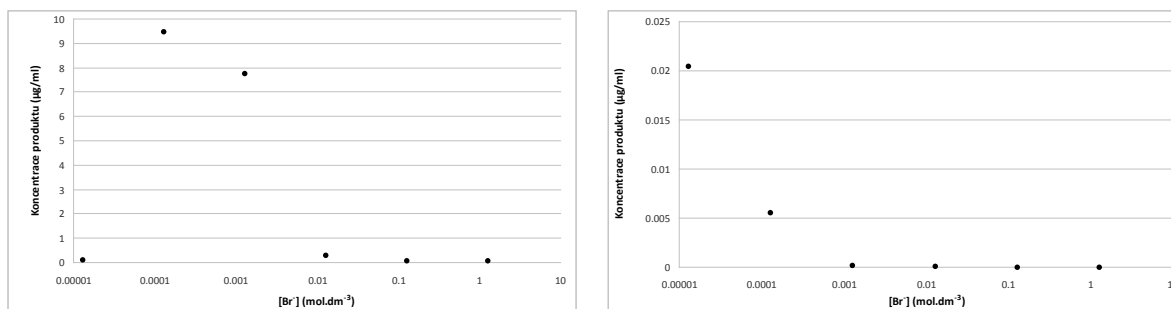
### Vliv koncentrace solí

Koncentrace halogenidu může ovlivňovat rychlost tvorby intermediátu hem-Fe(III)-OX /5/ a speciaci halogenu, který se vyskytuje ve formě HOX, X<sub>2</sub> a X<sub>3</sub><sup>-</sup> /6/. Oba tyto faktory ovlivňují rychlost reakce. Dále mohou být změny v aktivitě enzymu v závislosti na množství přidané soli způsobeny změnou iontové síly roztoku. Koncentrace většiny produktů byla při pokusech s chloridem nejvyšší, bylo-li do reakční směsi přidáno 100 μmolů chloridu (0,013 M). Při nejvyšší koncentraci chloridu (1,13 M) byla halogenační aktivita celkově snížena. V případě inkubací enzymu s bromidem byla nejvyšší koncentrace bromoformu změřena při přidavku 1 a 10 μmolů bromidu (koncentrace bromidu 0,13·10<sup>-2</sup> a 0,13·10<sup>-3</sup> M), ale nejvyšší koncentrace bromdichlormethanu byla naměřena u pokusů, kde byl do reakční směsi přidán 0,1 μmolů bromidu (0,13·10<sup>-4</sup> M). Nevyšší koncentrace bromoformu byly o dva řády vyšší, než u ostatních produktů (obr. 1 a 2). Některé neznámé látky vznikaly jen při jedné koncentraci halogenidu a v dalších vzorcích nebyly vůbec naměřeny, jak lze vidět na obrázku 3, který znázorňuje srovnání chromatogramů při různých koncentracích bromidu.

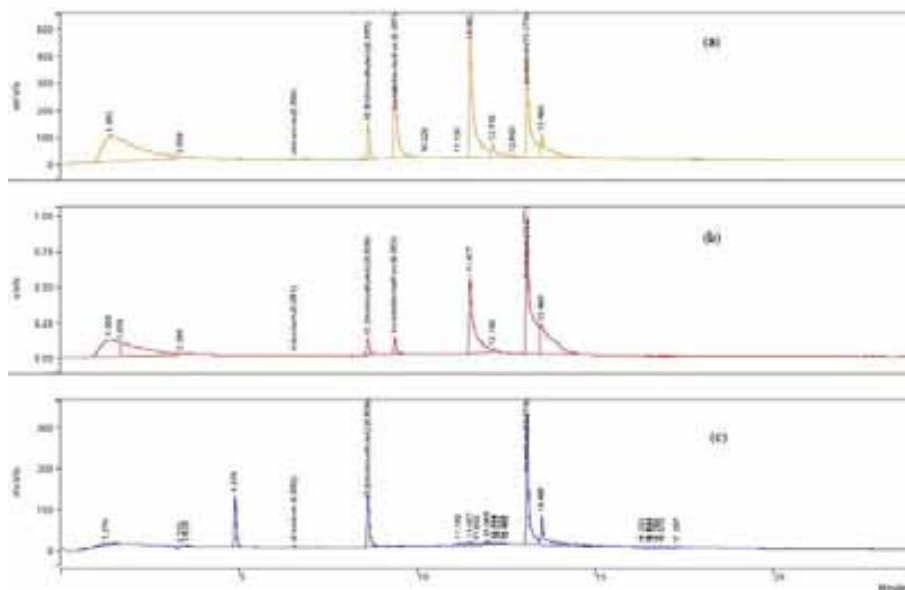


Obr. 1. Závislost koncentrace chloroformu (kolečka) a bromdichlormethanu (čtverce) na koncentraci chloridu

Z uvedených výsledků vyplývá, že CPO v přítomnosti peroxidu vodíku a bromidových či chloridových aniontů katalyzuje vznik mnoha chlorovaných organických látek. Množství a povaha vznikajících produktů je ovlivněna povahou přítomných organických substrátů a koncentrací Cl<sup>-</sup> a Br<sup>-</sup> iontů. Optimální koncentrace pro Cl<sup>-</sup> ionty za použitých podmínek byla okolo 0,01 M, zato pro Br<sup>-</sup> byla přibližně 1·10<sup>-3</sup> M, kdy probíhala bromace organických látek s nejvyšší intenzitou a vznikalo nejvyšší množství bromoformu. Vysoké koncentrace vznikajícího bromoformu v poměru s látkami obsahujícími chlor odpovídají skutečnosti, že bromace katalyzovaná CPO je rychlejší, než chlorace /7/. Vyšší koncentrace bromdichlormethanu při nejnižší použité koncentraci bromidu může být následkem toho, že spotřeba bromidu umožnila intenzivnější chloraci chloridovými ionty, které byly přítomny v použitém bromidu draselném, jako nečistoty. K dalším závěrům je potřeba identifikovat ostatní produkty. Pokusy mohou být v budoucnu rozšířeny na inkubace s dalšími enzymy a půdami.



Obr. 2. Závislost koncentrace bromofornu (vlevo) a bromdichlormethanu (vpravo) na koncentraci bromidu



Obr. 3. Chromatogramy naměřené po inkubaci s bromidem o koncentraci  $0,13 \cdot 10^{-4}$  M (a)  $0,13 \cdot 10^{-3}$  (b) a  $1,13$  M (c)

## LITERATURA

- /1/ Gribble, G. W. (2003). The diversity of naturally produced organohalogens. *Chemosphere*, 52(2), 289–97.
- /2/ Breider, F., & Albers, C. N. (2014). Formation mechanisms of trichloromethyl-containing compounds in the terrestrial environment: A critical review. *Chemosphere*, 119C, 145–154.
- /3/ Walter, B., & Ballschmiter, K. (1992). Formation of C1/C2-bromo-/chloro-hydrocarbons by haloperoxidase reactions. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 342(10), 827–833.
- /4/ Krause, T. (2014) *Natural Occurrence of Volatile Mono-/Polyhalogenated and Aromatic/Heteroaromatic Hydrocarbons from Hypersaline Environments*, PhD Thesis, University of Heidelberg.
- /5/ Thoma, J. a, & Hager, P. (1970). Chloroperoxidase VIII. formation of peroxide and halide complexes and their relation to the mechanism of the halogenation reaction. *Journal of Biol. Chem.*, 245(12), 3135–3142.
- /6/ Shevelkova, A. N., Sal'nikov, Y. I., Kuz'mina, N. L., & Ryabov, A. D. (1996). "Thermodynamic" mechanism of catalysis by haloperoxidases. *FEBS Letters*, 383, 259–263.
- /7/ Hager, L. P., Morris, D. R., Brown, S., Eberwein, H., & Hager, P. (1966). Chloroperoxidase II. utilization of halogen anions. *The Journal of Biological Chemistry*, 241(8), 1769–1777.

## Poděkování

Uvedená práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury České republiky, grant č. 13-11101S.

## POROVNANIE FOTOSYNTETICKÝCH A FOTOPROTEKČNÝCH PREJAVOV ANK - CHLORINA MUTANTOV A BEŽNÉHO GENOTYPU PŠENICE

### *A COMPARISON PHOTOSYNTHETIC PHOTOPROTECTION MANIFESTATIONS ANK - CHLORINA MUTANTS AND WILD TYPE OF WHEAT*

Kristýna Kunderlíková<sup>1</sup>, Klaudia Brücková, Marián Brestič, Marek Živčák  
Department of Plant Physiology, Slovak Agricultural University, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic; <sup>1</sup>xkunderlikov@is.uniag.sk

#### *Summary*

*In vivo* analyses of electron and proton transport-related processes as well as photoprotective responses were carried out at different stages of growth in chlorophyll *b*-deficient mutant lines (ANK-32A and ANK-32B) and wild type (WT) of wheat (*Triticum aestivum* L.). Measurements were carried out on the youngest, fully developed leaves regularly during a six-week period. Our results support the crucial role of proper regulation of linear electron transport in the protection of PSI against photoinhibition. Moreover, the ANK mutants of wheat showing the dynamic developmental changes in the PSI / PSII ratio are presented here as very useful models for further studies.

*Keywords: chlorina mutants; wheat; photosynthetic electron transport; cyclic electron transport around PSI; chlorophyll fluorescence; PSI photoinhibition*

#### *Súhrn*

Skúmanie transferu protónov vo fotosyntéze *in vivo* ako aj fotoprotekčných prejavov bolo vykonávané v rôznych fázach rastu v chlorofyl *b* deficitných mutantných líniách (ANK-32A a ANK-32B) a ako kontrolu (WT) sme použili nemutantný genotyp pšenice (*Triticum aestivum* L.). Merania boli vykonané na mladých, plne vyvinutých listoch v priebehu šiestich týždňov. Naše výsledky podporujú kľúčovú úlohu v regulácii lineárneho transportu elektrónov v ochrane PSI pred fotoinhibíciou. Chlorofylové ANK mutanty pšenice vykazujú dynamické vývojové zmeny v pomere PSI / PSII čo z nich robí veľmi užitočné modely pre ďalšie štúdie.

*Kľúčové slová: chlorina mutanty, pšenica, fotosyntetický elektrónový transport, cyklický elektrónový transport PSI, fluorescencia, fotoinhibícia PSI*

#### ÚVOD

V tejto práci porovnáваме fotosyntetické vlastnosti a odozvy na svetlo v chlorofyl *b* deficitných ANK mutantov v porovnaní s ne-mutantný genotyp pšenice v dvoch fázach rastu. ANK mutanty predstavujú izogénne hexaploidne línie obsahujúce chlorina mutáciu na *cn-A1* lokuse vloženenej do *chlorina-1* (ANK-32A) alebo z chlorina mutantnej línie AN-215 (ANK-32B). Tieto rastliny majú žlté - zelené sfarbenie v prvej polovici roka rastového cyklu. Na začiatku tvorby klasu sa farba rastlín začína meniť až sa stáva vizuálne nerozpoznané od kontroly /13/. ANK mutanty sa vyznačujú redukciami chlorofylu *b* a zníženou veľkosťou fotosyntetických jednotiek. Okrem modifikácie svetlozberných antén a pigmentového zloženia, nemožno ignorovať fakt, že zmenšenie LHC II v chlorina mutantoch má zvyčajne za následok vážne nerovnováhy v relatívnom pomere excitácie PSI a PSII /1/. Ako následok je potom nižší podiel PSI v porovnaní s PSII. Zmeny v distribúcii oboch fotosystémoch sú považované za reakcie rastliny znížiť nerovnováhu v absorpcii svetla medzi PSI a PSII /11/.



Štúdia založená na meraní fotosyntetických parametrov mutantov, nám pomáha spoznať spleť jednotlivých fotosyntetických mechanizmov. Cieľom práce bolo dokázať, že mutácia značne ovplyvnila pomer PSI / PSII, ktorý ovplyvňoval reguláciu transportu elektrónov a protónov, ako aj fotoprotektívne odpovede v chlorofyl b deficitných rastlinách.

## MATERIÁL A METÓDY

Pre našu prácu sme použili chlorofyl b deficitné mutanty s označením chlorina, ANK-32A a ANK-32B. Ako kontrolu sme použili ne-mutantný hexaploid pšenice, genotyp Corso (WT) s podobným vývojom ako obe ANK mutantné línie. Rastliny sa pestovali v klimatizovanom boxe Snijders Scientific pri teplote vzduchu 20 °C deň/16 °C noc a PAR na úrovni listov ~ 300  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , 10/14 h tma /svetlo. Podmienky v boxe boli nastavené na pestovanie rastlín pri 80 % žiarení, 70 % vlhkosti, 380 ppm obsahu atmosferického CO<sub>2</sub>.

Pre simultánne meranie odpovedí PSI a PSII na zmenené teplotné podmienky bol použitý fluorometer Dual PAM-100 (Walz, Nemecko) s fluorescenčnou jednotkou a jednotkou P700 zachytávajúcou absorpčné zmeny vlnových dĺžok 830 a 875 nm /6/. Obsah asimilačných farbív sme stanovovali deštrukčnou metódou, teda meraním absorbancie jednotlivých pigmentov v acetónovom extrakte /8/, využitím spektrofotometra Jenway 6405 (UV/Vis., UK). Meranie fluorescencie bolo vykonané s použitím fluorometra Multiplex-3 (Force-A, Orsay, Francúzsko) /3/. Pre získanie chlorofyl a fluorescenčných kriviek sme použili Handy PEA (Hansatech Instruments Ltd, Anglicko) /3/. Podrobnejšie charakteristiky a popis jednotlivých meraní sú uvedené v práci Brestič et al. /3/.

Meranie fluorescencie chlorofylu *a* a simultánne meranie odpovedí PSI a PSII boli analyzované 6-10 opakovaných meraní. Meranie Q<sub>B</sub>-neredukujúcich reakčných centier a meranie fluorescencie s použitím fluorometra Multiplex boli vykonané v aspoň 10 opakovaníach. Prezentované sú tu priemerné hodnoty so štandardnou chybou ( $\alpha = 0,05$ ). Štatistická významnosť rozdielov bola vyhodnotená pomocou analýzy rozptylu (ANOVA) a následne bol vykonaný post-hoc Tukey HSD test.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Hodnotili sme fotosyntetické parametre veľmi skorej fázy (2. plne vyvinutý list) a neskoršej fázy (5. plne vyvinutý list) odrody Corso (WT) a pšeničných mutantov chlorina (Tab. 1).

Asimilačné pigmenty asociované v pigmento-proteínových komplexoch fotosyntetického elektróntransportného aparátu zohrávajú rozhodujúcu úlohu v zachytávaní slnečnej energie a v transporte do reakčného centra oboch fotosystémov /10/. Obsah chlorofylov v odrode Corso bol výrazne vyšší ako v mutantných líniách v oboch fázach rastu. Naopak, v súlade s očakávaním sme zistili výrazne zvýšený pomer chlorofylu *a* / *b* v chlorina mutantoch (Tab. 1a).

Spomedzi parametrov je významný nárast obsahu Q<sub>B</sub>-neredukujúcich reakčných centier (Tab. 1b) v ANK mutantoch v porovnaní s WT v oboch fázach rastu čo je dané zrejme nerovnováhou medzi obsahom PSI a PSII. Listy zo starších rastlín obsahovali menej Q<sub>B</sub>-neredukujúcich centier v porovnaní s mladými rastlinami.

Parameter nefotochemické uhasínanie (NPQ) vyjadruje schopnosť aktívnej disipácie nadbytočnej svetelnej energie v PSII mechanizmom, ktorý je účinne regulovaný tzv. transtylakoidným protónovým gradientom v chloroplastoch /4/. V rovnovážnom stave hodnoty kvantového výťažku NPQ, ako aj pomer NPQ boli v ANK mutantoch oveľa nižšie v porovnaní s WT v ranej fáze rastu, zatiaľ čo v ďalšej fáze rastu to bolo obrátené. Mimoriadne nízke hodnoty NPQ namerané pri výrazne nadlimitnom žiarení (1000  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) poukazujú na poruchy vo fungovaní mechanizmu nevyhnutného vo fotoprotekcii PSII /7/ ale aj PSI, keďže NPQ prispieva k zníženiu fotochemickej efektívnosti PSII a tým aj k regulácii lineárneho elektrónového transportu smerujúceho k PSI /12/. Kým poškodenie PSII fotoinhibíciou dokáže bunka opraviť v priebehu niekoľkých hodín, fotoinhibičné poškodenie PSI je potenciálne závažnejšie, keďže

poškodenie PSI je ireverzibilné a nahradenie poškodeného PSI trvá aj viac ako jeden týždeň /9/. Príčinou poškodenia PSI je nadmerný prísun elektrónov (vedúci k nahromadeniu záporne nabitých elektrónových prenášačov na akceptorovej strane PSI), ktorý môže viesť k nadmernej tvorbe reaktívnych foriem kyslíka (ROS), ktoré môžu následne atakovať funkčné proteíny v chloroplaste, hlavne však reakčné centrum PSI /2/. Ukazovateľom redoxného stavu akceptorovej strany PSI je parameter  $\Phi_{NA}$ , vyjadrujúci zníženie kvantového výťažku PSI elektrónového transportu spôsobené redukciami PSI elektrónových akceptorov /5/. Porovnanie hodnôt parametra  $\Phi_{NA}$  (Tab. 1e) ukazuje na výrazne vyšší redoxný stav PSI akceptorovej strany pri chlorina mutantoch, čo poukazuje na ich zvýšené ohrozenie PSI fotoinhibíciou, teda potvrdzuje sa predpoklad daný nízkou hodnotou NPQ. To, že  $P700^+$  a NPQ reagujú obdobne poukazuje na to, že spoločnou príčinou zníženej fotoprotekčnej ochrany pri chlorina mutantoch je limitovaná schopnosť tvoriť dostatočný transtylakoidný protónový gradient ( $\Delta pH$ ) na vnútorných membránach v chloroplastoch. Ako o pravdepodobnej príčine môžeme uvažovať o nízkom pomere medzi PSI a PSII v membránach tylakoidov, o čom svedčí tak nízka hodnota fluorescenčného parametra  $F_0$ , ako aj nízka hodnota parametrov  $P_m$ . Nerovnováha medzi fotosystémami potom vedie k typickým fyziologickým prejavom chlorina mutantov. V neskorších fázach rastu sme pozorovali čiastočné zmiernenie "chlorina" prejavov, čo súvisí aj s priblížením sa pomerov medzi PSI a PSII smerom ku kontrolným rastlinám.

Tab.1: Hodnoty fotosyntetických parametrov v dvoch vývinových fázach listov WT a mutantov pšenice.

Parametre *	veľmi skorá fáza (2. list)			neskoršia fáza (5. list)		
	WT	ANK-32A	ANK-32B	WT	ANK-32A	ANK-32B
<i>a) asimilačné pigmenty</i>						
obsah chlorofylu ( $mg \cdot m^{-2}$ )	$243 \pm 17^a$	$55 \pm 2^d$	$57 \pm 2^d$	$419 \pm 5^a$	$109 \pm 3^c$	$108 \pm 2^c$
chlorofyl a / b	$3.9 \pm 0.1^a$	$8.2 \pm 0.1^c$	$8.9 \pm 0.4^c$	$3.1 \pm 0.1^a$	$5.1 \pm 0.2^b$	$5.4 \pm 0.2^b$
karotenoidy ( $mg \cdot m^{-2}$ )	$54 \pm 5^b$	$22 \pm 3^c$	$27 \pm 2^c$	$86 \pm 3^a$	$33 \pm 1^c$	$35 \pm 2^c$
<i>b) stanovenieof <math>Q_B^-</math> neredukujúcich PSII reakčných centier</i>						
$Q_B$	$0.4 \pm 0.1^b$	$0.4 \pm 0.1^a$	$0.4 \pm 0.1^a$	$0.3 \pm 0.1^c$	$0.4 \pm 0.1^b$	$0.4 \pm 0.1^b$
<i>c) základné parametre fluorescencie chlorofylu</i>						
$P_m$	$0.9 \pm 0.1^a$	$0.3 \pm 0.1^c$	$0.4 \pm 0.1^c$	$1.1 \pm 0.1^a$	$0.4 \pm 0.1^b$	$0.4 \pm 0.1^b$
$F_v/F_m$	$0.8 \pm 0.0^b$	$0.9 \pm 0.1^a$	$0.8 \pm 0.1^a$	$0.8 \pm 0.1^b$	$0.8 \pm 0.1^a$	$0.8 \pm 0.1^a$
<i>d) hodnoty parametrov v ustálenom stave fluorescencie chlorofylu (PAR 1,000 <math>\mu mol m^{-2} s^{-1}</math>)</i>						
$\Phi_{PSII}$	$0.3 \pm 0.1^a$	$0.3 \pm 0.1^a$	$0.3 \pm 0.1^a$	$0.2 \pm 0.1^b$	$0.2 \pm 0.1^b$	$0.2 \pm 0.1^b$
$\Phi_{NPQ}$	$0.6 \pm 0.1^b$	$0.5 \pm 0.1^c$	$0.5 \pm 0.1^c$	$0.6 \pm 0.1^{ab}$	$0.6 \pm 0.1^a$	$0.6 \pm 0.1^a$
$\Phi_{NO}$	$0.2 \pm 0.1^b$	$0.3 \pm 0.1^a$	$0.3 \pm 0.1^a$	$0.2 \pm 0.1^b$	$0.2 \pm 0.1^b$	$0.2 \pm 0.1^b$
NPQ	$2.0 \pm 0.1^b$	$1.1 \pm 0.1^c$	$1.1 \pm 0.1^c$	$2.1 \pm 0.1^b$	$2.5 \pm 0.1^a$	$2.5 \pm 0.1^a$
qE	$1.7 \pm 0.1^b$	$0.7 \pm 0.1^c$	$0.9 \pm 0.1^c$	$2.0 \pm 0.1^{ab}$	$2.2 \pm 0.1^a$	$2.1 \pm 0.1^a$
<i>e) hodnoty parametrov v ustálenom stave P700 (PAR 1,000 <math>\mu mol m^{-2} s^{-1}</math>)</i>						
$\Phi_{PSI}$	$0.4 \pm 0.1^a$	$0.4 \pm 0.1^a$	$0.4 \pm 0.1^a$	$0.3 \pm 0.1^b$	$0.3 \pm 0.1^b$	$0.3 \pm 0.1^b$
$\Phi_{ND}$	$0.5 \pm 0.1^b$	$0.3 \pm 0.1^c$	$0.3 \pm 0.1^c$	$0.6 \pm 0.1^a$	$0.4 \pm 0.1^b$	$0.5 \pm 0.1^b$
$\Phi_{NA}$	$0.1 \pm 0.1^b$	$0.3 \pm 0.1^a$	$0.3 \pm 0.1^a$	$0.1 \pm 0.1^b$	$0.3 \pm 0.1^a$	$0.3 \pm 0.1^a$

\* priemerné hodnoty  $\pm$  štandardné chyby; malé písmená ukazujú štatisticky homogénne skupiny (ANOVA, Tukey HSD test,  $\alpha = 0,05$ )

ANK mutanty pšenice představují typické chlorina mutanty s výrazně sníženým obsahem chlorofylu a vysokým poměrem mezi chlorofylom a b. Na úrovni fyziologických parametrů se potvrdilo pozorování, že fenotyp mutantů se s postupující ontogenezou přibližuje kontrolním rostlinám. Mladé rostliny mají významně sníženou fotoprotekční kapacitu na úrovni PSII (nízké NPQ) aj na úrovni PSI (vysoká úroveň redukce akceptorové strany PSI). V neskorším rastovom štádiu, NPQ dosahuje pri chlorinách hodnoty podobné ako kontrola, kým nerovnováha na úrovni PSI zostáva zachovaná. Rýchla kinetika fluorescence chlorofylu poukázala na menšiu veľkosť antén, ale predovšetkým na vysoký podiel  $Q_B$ -neredukujúcich PSII reakčných centier v chlorina mutantoch pšenice. Podrobnejšiu diskusiu ako aj výsledky a závery popisuje práca Brestič et al. /3/. Naše výsledky ukazujú na rozdiely v regulácii fotosyntézy u kontroly a mutantov deficitných na chlorofyl b a môžu byť zdrojom poznatkov pre lepšie poznanie fungovania fotosyntézy vo fluktuálnych environmentálnych podmienkach, ako aj pre šľachtiteľov z hľadiska možností tvorby fotosyntetického aparátu u moderných odrôd.

#### LITERATURA

- /1/ Andrews, J.R., Fryer, M.J., Baker, N.R.: Consequences of LHC II deficiency for photosynthetic regulation in chlorina mutants of barley. *Photosynth Res*, 44, 1995, 81 - 91.
- /2/ Asada, K.: The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 1999, 601 - 639.
- /3/ Brestič, M., Živčák, M., Kunderlíková, K., Sytar, O., Shao, H., Kalaji, H.M., Allakhverdiev, S.I.: Low PSI content limits the photoprotection of PSI and PSII in early growth stages of chlorophyll b-deficient wheat mutant lines. *Photosynthesis Research*, 2015, DOI 10.1007/s11120-015-0093-1.
- /4/ Demming-Adams, B., Adams, W.W.: Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytol.*, 172, 2006, 11 - 21.
- /5/ Klughammer, C., Schreiber, U.: An improved method, using saturating light pulses, for the determination of Photosystem I quantum yield via  $P700^+$ - absorbance changes at 830 nm. *Planta*, 192, 1994, 261 - 268.
- /6/ Klughammer, C., Schreiber, U.: Complementary PSII quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method, PAM. *Appl. Notes*, 1, 2008., 27 - 35.
- /7/ Li, X.P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A.R., Rosenquist, M., Jansson, S., Niyogi, K.K.: A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature*, 403, 2000., 391 - 395.
- /8/ Lichtenthaler, H.K.: Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in enzymology*, 148, 1987, 350 - 382. ISSN 0076-6879.
- /9/ Sonoike, K.: Photoinhibition of photosystem I. *Physiol Plant*, 142, 2010, 56 - 64.
- /10/ Stuhlfauth, T., Scheuermann, R., Fock, H.P.: Light energy dissipation under water stress conditions. Contribution of re-assimilation and evidence for additional processes. *Plant Physiol.*, 92, 1990, 1053 - 1061.
- /11/ Terao, T., Katoh, S.: Antenna sizes of photosystem I and photosystem II in chlorophyll b-deficient mutants of rice. Evidence for an antenna function of photosystem II centers that are inactive in electron transport. *Plant Cell Physiol*, 37, 1996, 307 - 312.
- /12/ Tikkanen, M., Mekala, N.R., Aro, E.M.: Photosystem II photoinhibition-repair cycle protects Photosystem I from irreversible damage. *Biochim Biophys Acta*, 1837, 2014. 210 - 215.
- /13/ Watanabe, N., Koval, S.F.: Mapping of chlorina mutant genes on the long arm of homoeologous group 7 chromosomes in common wheat with partial deletion lines. *Euphytica*, 129, 2003, 259 - 265.

#### Pod'akovanie:

Uvedená práca vznikla za finančnej podpory projektu APVV-0197-10 a EC projektu č. 26220220180: "Construction of the "AgroBioTech" Research Centre".

**PŘÍJEM A DISTRIBUCE CHLORFENOLŮ V JEČMENU*****UPTAKE AND DISTRIBUTION OF CHLORPHENOLS IN BARLEY***Tereza Jíšová<sup>1,2</sup>, Sándor T. Forczek<sup>1</sup>, Eva Tesařová<sup>2</sup><sup>1</sup> Ústav experimentální botaniky Akademie věd ČR, Izotopová laboratoř, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, alex067@biomed.cas.cz<sup>2</sup> Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Univerzita Karlova v Praze, Albertov 6, 128 43 Praha 2***Summary***

Chlorinated phenols represent one of the most common groups of toxic industrial compounds. They are resistant to biodegradation in the environment and persist for a long time. Food crops such as spring barley, are susceptible to contamination by various pesticides and organic waste, and these substances can then get into the plants. Uptake and distribution of 2-chlorophenol were investigated in axenic spring barley. After absorption of <sup>14</sup>C-labelled 2-chlorophenol, the plants were harvested and extracts were analyzed for 2-CP derived radioactivity. The uptake of 2-CP to roots and transport to leaves were confirmed. Radioactive balance was calculated for individual plants.

*Key words: 2-chlorophenol, spring barley, Hordeum vulgare L., <sup>14</sup>C, scintillator*

***Souhrn***

Chlorované fenoly představují jednu z nejčastějších skupin toxických průmyslových sloučenin. Jsou odolné vůči biodegradaci a v životním prostředí přetrvávají dlouhou dobu. Potravinářské plodiny, jakým je ječmen jarní, jsou náchylné k znečištění různými pesticidy a organickým odpadem a tyto látky se pak mohou dostávat i do plodin. Příjem a distribuce 2-chlorofenolu byly zkoumány v axenickém ječmenu jarním. Po absorpci 2-chlorofenolu značeného <sup>14</sup>C byly rostliny sklizeny a vhodné extrakty byly analyzovány pro odvozenou radioaktivitu 2-chlorofenolu. Příjem 2-CP kořeny a doprava do listů byly potvrzeny. Radioaktivní bilance byla vypočtena pro jednotlivé rostliny.

*Klíčová slova: 2-chlorofenol, ječmen jarní, Hordeum vulgare L., <sup>14</sup>C, scintilátor*

**ÚVOD**

Chlorfenoly jsou významnými kontaminanty, které se do životního prostředí dostávají mnoha různými cestami /1-9, 11/. Dříve byly široce používány jako biocidy a pro ochranu dřeva, jsou také vedlejším produktem při bělení papíru /9, 12, 13/, chloraci pitné vody a spalování organického odpadu. Jako látky rozšířené v životním prostředí a byly zjištěny i v přírodních biotopech a to jak ve vodních tak i suchozemských potravinových řetězcích /6, 8, 9/. Znepokojující je jejich přítomnost v životním prostředí, protože jako chlorované látky, které jdou obtížně biologicky rozložit, jsou podezřelé pro své perzistentní, mutagenní a karcinogenní vlastnosti /9, 12/.

K pokusům byla vybrána málo chlorovaná modelová látka 2-CP, která má však vysoký toxický potenciál pro vodní prostředí. Z předchozích studií vyplývá, že některé rostliny jsou schopné přijímat a transformovat chlorfenoly, čehož by bylo vhodné využít pro fytořemediaci a odstranění chlorovaných fenolů z životního prostředí. Konkrétně byl studován 4-chlorofenol, 2,4-dichlorofenol, 2,4,5-trichlorofenol v dvouděložných rostlinách /5, 9/.

Eliminovat chlorofenolové znečištění lze použitím biologických postupů, zahrnující mikrobiální nebo enzymatické ošetření. Mezi úspěšné mikrobiální degradace lze tak například řadit použití bakteriálního kmene patřícího k rodům *Actinomyces*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*,

*Arthromyces*, *Pseudomonas* a *Rhodococcus*. Také enzymové přípravky peroxidázy a laktázy se ukázaly být velmi úspěšné /6/.

Naším cílem bylo tedy potvrdit příjem a distribuci 2-chlorfenolu do listů rostlin.

## MATERIÁL A METODA

Příjem a distribuce chlorfenolu značeného  $^{14}\text{C}$  byly zkoumány v ječmenu jarním (*Hordeum vulgare* L.). Ječmen jarní byl pěstován s týdenní kultivací semen na sterilním agaru a následně ve axenické hydroponické prostředí po dobu jednoho týdne. Po 7 denní expozici radioaktivně značeného 2-chlorfenolu o koncentracích 50, 250 a 500  $\mu\text{M}$  byly části rostliny extrahovány. Množství aplikované radioaktivity bylo 100 nCi (3700 Bq) ke každé rostlině a neradioaktivním 2-CP doplněno na požadovanou koncentraci. Pomocí scintilačního měření byla stanovena zbylá koncentrace 2-CP v hydroponickém roztoku, na povrchu a uvnitř kořenů a listů (mražení tekutým dusíkem, rozdrčení a extrakce metanolem) a byla vypočtena bilance 2-CP v rostlině. Pro každou koncentraci bylo provedeno 6 opakování, z naměřených hodnot byly vypočteny průměrné hodnoty.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

Dle dostupné literatury byla vytvořena pracovní hypotéza, že rostliny přijímají chlorfenoly. Z našich měření vyplývá, že jednoděložné rostliny ječmene jarního přijímají 2-chlorfenol a to jak kořenovou, tak i listovou částí rostliny. Bilance naměřených hodnot je uvedena v tabulce 1.

Se zvyšující se koncentrací 2-chlorfenolu v živném roztoku rostlin se zbylá aktivita příliš neměnila. Aktivita byla vyšší pouze u koncentrace 50  $\mu\text{M}$ . Podíl aktivity u kořenové části nepřesahoval 10%, zatímco u listnaté části se pohyboval mezi 2-14 procenty. Obecně bylo uvnitř rostlin nalezeno kolem 10% z původní aktivity.

Tab. 1: Bilance distribuce 2-chlorfenolu v ječmenu

c/ $\mu\text{M}$	bilance v %				
	Hoagland	oplach kořenů	kořeny	listy	Uvnitř rostlin
50	30-60	2-6	3-9	2-14	13,62
250	50-90	1-6	2-6	2-7	8,92
500	75-95	1-2	2-3	3-7	7,86

Díky dalším, předběžným pokusům lze říci, že 4-chlorfenol ve stejném koncentračním rozmezí je pro ječmen mnohem toxičtější než 2-chlorfenol. Vzhled rostlin se po 7 denní expozici 4-chlorfenolu rychle změnil, konce listů byly hnědě zbarvené, což naznačovalo nekrózu a obecně se růst velmi zpomalil, až zastavil.

Rostliny v daném koncentračním rozmezí aktivně přijímají 2-CP, a to do všech částí. Dále bude nutné ověřit, zda toto chování je platné o pro 4-CP. Je třeba provést další pokusy a zjistit, zda může příjem a distribuci chlorfenolů ovlivnit i mykorrhiza.

## LITERATURA

- /1/ S.Yuhong,Z.Yongguan,L.Yongchao:Interactions of mixed organic contaminants in uptake by rice seedlings. *Chemosphere*, 74,2009: 890-895
- /2/ P.Schröder, L. Lyubanova, Ch. Huber:Do heavy metals and metalloids influence the detoxification of organic xenobiotics in plants ? *Environmental Science and Pollution Research*, 16,2009:795-804
- /3/ S.Yuhong,Z.Yongguan, Yu-hong, Su Yong-guan:Bioconcentration of atrazine and chlorophenols into roots and shoots of rice seedlings. *Environmental Pollution*,139,2006:32-39
- /4/ A.S.Ucisik,S. Trapp:Uptake , Removal , Accumulation , and Phytotoxicity of 4- Chlorophenol in Willow Trees. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54,2008:619-627

- /5/ S.Pascal-Lorber, S.Despoux,E.Rathahao, C. Calnet, L.Debrauwer, F.Laurent:Metabolic Fate of [14C] Chlorophenols in Radish (*Raphanus sativus*), Lettuce (*Lactuca sativa*), and Spinach (*Spinacia oleracea*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 56,2008:8461-8469
- /6/ B. Santos de Araujo, J. Dec, J. Marc Bollag,J. Pletsch:Uptake and transformation of phenol and chlorophenols by hairy root cultures of *Daucus carota* , *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare*. *Chemosphere*,63,2009:642-651
- /7/ A.S.Ucisik, S.Trapp, K.O.Kusk:Uptake, accumulation, phytotoxicity, and removal of 2,4-dichlorophenol in willow trees. *Environmental Toxicology and Chemistry*,26,2007,1165-1171
- /8/ T.Fujisawa, K.Ichise-Shibuya, T.Katagi:Uptake and transformation of phenols by duckweed ( *Lemna gibba* ). *Journal of Pest Science*,35,2010:456-463
- /9/ X.Shi, H.Leng, Y.Hu, Y.Liu, H.Duan,H.Sun, Y.Chen: Removal of 2,4-dichlorophenol in hydroponic solution by four *Salix matsudana* clones. *Ecotoxicology and Environmental Safety*,96,2012,125-131
- /10/ B.Santos De Araujo,B.V.Charlwood, M.Pletsch:Tolerance and metabolism of phenol and chloroderivatives by hairy root cultures of *Daucus carota* L .. *Environmental Pollution*,117,2002,329-335
- /11/ S.Pascal-Lorber, Sophie, E.Rathahao, J.Cravedi,F.Laurent:Metabolic fate of [ 14 C ] -2 , 4-dichlorophenol in macrophytes. *Chemosphere*,56,2004,275-284
- /12/ R.G Vijay Bhasker, D.K.Joshi, M.H.Gold:Degradation of chlorophenoxyacetic acids by the lignin-degrading fungus *Dichornitus squalens*. *Microbiology*,143,1997:2353-2360
- /13/ K.Valli,M.H.Gold:Degradation of 2,4-Dichlorophenol by the Lignin-Degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*,173,1991:345-352

### Poděkování

Uvedená práce vznikla za finanční podpory grantu od grantové agentury České republiky, Grant č. 13-11101S.

## PŘIROZENÉ ZDROJE CHLOROVANÝCH UHLOVODÍKŮ V PODROSTU SMRKOVÉHO LESA

### *NATURAL SOURCES OF CHLORINATED VOLATILE HYDROCARBONS IN SPRUCE FOREST UNDERGROWTH*

Pavla Štangelová<sup>1,2</sup>, Zdeněk Wimmer<sup>1,3</sup>, Eva Tesařová<sup>2</sup>, Sándor T. Forczek<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav experimentální botaniky Akademie věd ČR, Izotopová laboratoř, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, stangelova@biomed.cas.cz

<sup>2</sup> Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Univerzita Karlova v Praze, Albertov 6, 128 43 Praha

<sup>3</sup> Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha

#### *Summary*

Chlorine as one of the most frequently occurring elements in nature, is involved in biogeochemical cycles. Several anthropogenic and even natural sources of volatile chlorinated hydrocarbons of emission is known, yet natural sources have not been explored enough. The aim of this study is to gather information of potential sources of chlorinated organic hydrocarbons in spruce forest undergrowth. Emissions of chlorinated volatile hydrocarbons of selected species of bryophytes, ferns and fungi were measured by SMPE sampling technique and analyzed with GC-MS analysis. Sodium chloride solution was used as a stressor to simulate increased environmental chloride load. Trichloromethane (chloroform) was found in most natural samples, dichloromethane, tetrachloroethene and tetrachloromethane were found occasionally. Increased chloride concentration caused elevated emissions of trichloromethane and tetrachloromethane in some plant species.

*Key words: chlorinated organic hydrocarbons, emission, bryophytes, ferns, fungi, salt stress, SPME, GC-MS*

#### *Souhrn*

Chlor se jako jeden z nejvíce zastoupených prvků v přírodě podílí velkou měrou na biogeochemických cyklech. Doposud bylo identifikováno velké množství antropogenních i přirozených zdrojů emitujících těkavé chlorované uhlovodíky, avšak přirozené zdroje nebyly stále dostatečně prozkoumány. Cílem této studie je získat informace o potencionálních zdrojích těkavých chlorovaných uhlovodíků v podrostu smrkového lesa. Emise těkavých chlorovaných uhlovodíků vybraných druhů mechorostů, kapradin a hub byly měřeny vzorkovací metodou SPME spojenou s GC-MS analýzou. Pro napodobení zvýšené zátěže chloridy na životní prostředí, byl jako stresový faktor použit roztok chloridu sodného. Ve většině přírodních vzorků byl objeven trichlormethan (chloroform), příležitostně byl objeven dichlormethan, tetrachlorethen a tetrachlormethan. Po zvýšení koncentrace chloridů, byl u některých přírodních vzorků pozorován nárůst emisí trichlormethanu a tetrachlormethanu.

*Klíčová slova: těkavé chlorované uhlovodíky, emise, mechorosty, kapradiny, houby, solný stres, SPME, GC-MS*

## ÚVOD

Těkavé chlorované uhlovodíky jsou součástí biogeochemického cyklu zahrnujícího tvorbu, přeměnu a rozklad anorganických i organických sloučenin chloru. Známé VOCl pocházejí z antropogenních i přirozených zdrojů, ačkoli o přírodním původu VOCl toho stále není příliš známo, antropogenní zdroje jsou významné i z důvodu příjmu VOCl rostlinami. Například emise

chlormethanu, trichlormethanu, tetrachlormethanu z mořských a pevninských zdrojů, jako jsou mořské řasy, pobřežní slanisko a lesní půda, jsou dobře zdokumentovány /1, 2, 3/.

VOCl se mohou významně účastnit klimatických dějů, jako je oteplování troposféry a rozpad stratosférického ozonu. Chloridy přidané do půdy přispívají k rozpadu organické hmoty v půdě, degradace vzniklého chlorhumusu vede ke vzniku menších molekul, jako je kyselina trichlorctová, která může být přijata rostlinami a houbami. Chlorid působí jako stresor i reaktant v enzymatické halogenaci. Mineralizace chlorhumusu a jeho vedlejších produktů může vést ke vzniku VOCl, proto rostliny vystavené stresu, způsobeným chloridem sodným, mohou produkovat jiné látky, než rostliny nevystavené solnému stresu /3, 4, 5/.

Stres u rostlin tedy může vznikat vlivem nadměrnému solení silnic v zimních měsících a následným vymýváním soli do půdy, které může následně vést ke zvyšování emisí VOCl. Z toho vyplývá, že limitujícím faktorem pro emise VOCl je převážně lidská činnost. Pro napodobení stresového stavu v laboratorních podmínkách, byl k části vzorků přidáván roztok chloridu sodného o koncentraci 0,06 M a 0,12 M. Cílem této práce je identifikace těkavých chlorovaných uhlovodíků (VOCl), emitovaných rostlinami a houbami a pozorování změny emisí při zvýšené koncentraci chloridů.

## MATERIÁL A METODA

Vzorky mechorostů a kapradin byly odebírány v neznečištěných oblastech Českého ráje a v ochranném pásmu okolo přehrady Hamry v Pardubickém kraji. Vzorky hub byly naočkovány na agar ve sterilním prostředí. Pro každý pokus bylo provedeno šest opakování, zároveň bylo prováděno šest měření pozadí, jehož průměrná hodnota byla následně odečtena od naměřených hodnot vzorků. Pokusy byly prováděny v uzavřených vialkách s víčkem se silikonovým septem. Jako zástupci mechorostů byly použity: bělomech sivý (*Leucobryum glaucum*), rokyt cypřišovitý (*Hypnum cupressiforme* Hedw.), rašeliník (*Sphagnum* sp.), rokytník skvělý (*Hylocomium splendens*), měřík čeřitý (*Plagiomnium undulatum*). Za zástupce kapradin byl vybrán: puchýřník křehký (*Cystopteris fragilis*). A zástupci hub: čirůvka fialová (*Lepista nuda*), lištička pomerančová (*Hygrophoropsis aurantica*) a pečárka Bernardova (*Agaricus bernardii*).

Přírodním vzorkům mechorostů a kapradin byly manuálně očištěny kořeny, rostliny byly vloženy do 250 ml skleněných vialek. Do části vialek bylo přidáno 50 ml destilované vody, do dalších 50 ml 0,06 M roztoku chloridu sodného a do zbytku vialek 50 ml 0,12 M roztoku chloridu sodného. Poté byly vialky uzavřeny víčky se silikonovým septem. Vzorky hub byly naočkovány na agar a na 60 dní byly pěstovány na Petriho miskách, následně se vyrostlé kultury hub pokrájely, vložily do skleněných vialek o objemu 10 ml, do části vialek byl přidán 1 ml destilované vody, do dalších 1 ml 0,06 M roztoku chloridu sodného a vialky se uzavřely víčkem se silikonovým septem.

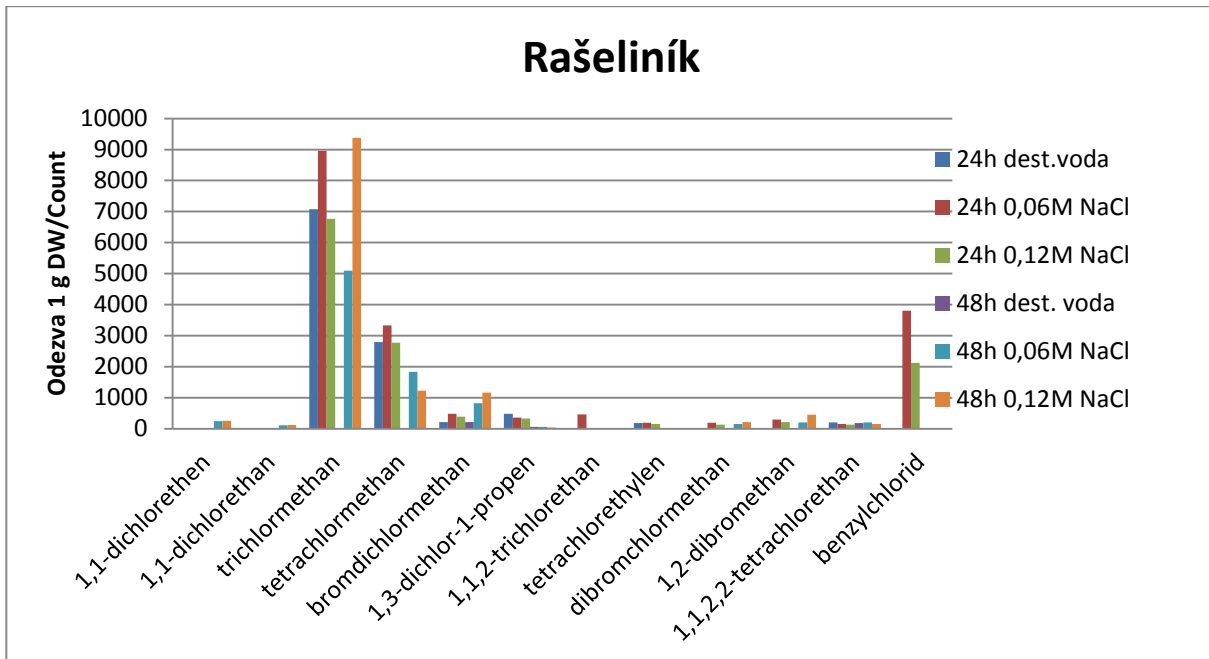
Množství emisí bylo měřeno po 24 a 48 hodinách. Jako metoda vzorkování byla vybrána 10 minutová sorpce na černé 75  $\mu$ m CAR/PDMS SPME vlákno (Supelco). Obsah SPME vlákna bylo chromatograficky stanoveno na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí (Varian 240-MS GC/MS Ion Trap Mass Spectrometer, Walnut Creek, USA), kapilární kolonou (Rxi-624Sil MS, 30 m, ID 0,32 mm,  $d_f$  1,8  $\mu$ m, Restek, Bellefonte, USA), za použití metody s teplotním rozsahem 40-250°C, s MS rozsahem 40-280 m/z. Identifikace neznámých látek byla provedena použitím standardních látek ve směsi Scott gas (Restek TO-15).

## VÝSLEDKY A DISKUZE

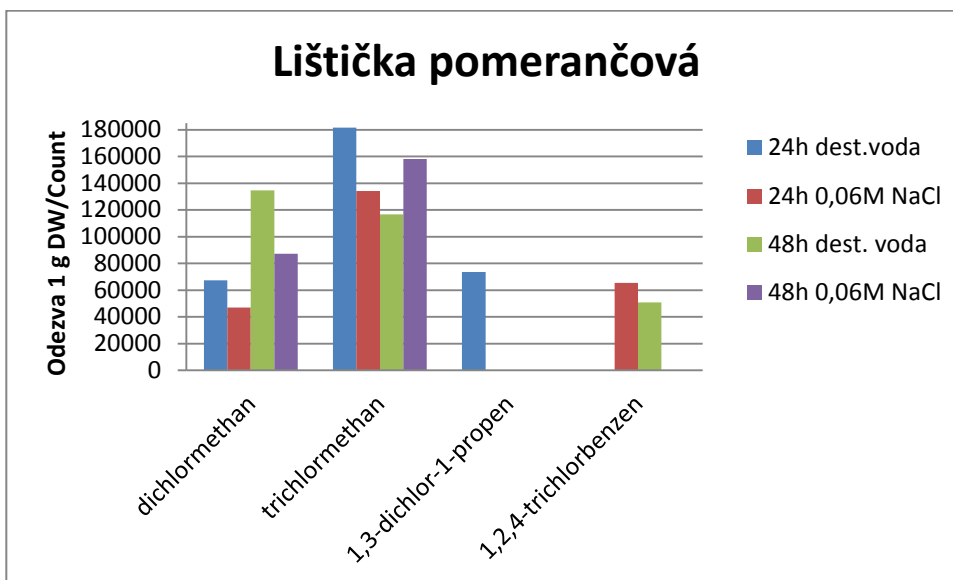
Na ukázkou byly vybrány výsledky měření rašeliníku, jako zástupce mechorostů a lištičky pomerančové jako zástupce hub. U rašeliníku byla, kromě 48 h pokusu s destilovanou vodou, vždy prokázána emise trichlormethanu, stejně tak u tetrachlormethanu, avšak v nižším množství. Dále pak byl u všech pokusů naměřen bromdichlormethan, přičemž se množství emisí s rostoucí koncentrací chloridů a časem zvyšovalo. Dále pak byly v nižších množstvích emitovány 1,3-dichlor-1-propen, dibromchlormethan, 1,2-dibromethan a 1,1,2,2-tetrachlorethan. Lištička



pomerančová emitovala ve značné míře trichlormethan, ačkoli přidání chloridu snížilo hodnotu emisí po 24h, po 48 h emise naopak zvýšilo. Dále byl ve všech pokusech emitován dichlormethan, množství emitovaných látek bylo v obou případech sníženo přidáním chloridu. V menší míře byl emitován 1,3-dichlor-1-propen a 1,2,4-trichlorbenzen.



Graf 1: Naměřené hodnoty emisí těkavých chlorovaných látek u rašeliníku s přidavkem a bez přidavku NaCl po 24 a 48 h.



Graf 2: Naměřené hodnoty emisí těkavých chlorovaných látek u lištičky pomerančové s přidavkem a bez přidavku NaCl po 24 a 48 h.

V porovnání s naměřenými daty rašeliníku /3/, kde se po přidání 0,1 M chloridu koncentrace trichlormethanu snižuje, v námi naměřených hodnotách se množství emitovaného trichlormethanu po 24 h nejprve zvyšuje při koncentraci chloridu 0,06 M, ale poté se snižuje při přidání koncentraci 0,12 M, což odpovídá výše zmíněnému pokusu. Emise tetrachlormethanu u rašeliníku

se mírně zvyšuje po přidání 0,06 M chloridu, podobně jako u /3/. Případné rozdíly mohou být způsobeny nestejnou délkou inkubace, odlišnou metodikou, či fyziologickým stavem rostlin.

Většina použitých druhů mechorostů, kapradin a hub emitovala těžké chlorované uhlovodíky. Trichlormethan byl emitován všemi zkoumanými druhy rostlin a hub, přidání roztoku chloridu sodného o koncentraci 0,06 M ve většině případů zvyšuje množství emitovaných VOCl, při přidání chloridu o koncentraci 0,12 M se u některých vzorků naopak emise VOCl snižovány, avšak každý druh rostlin a hub reaguje na solný stres odlišně. Příliš vysoká koncentrace chloridu by přírodní vzorky zahubila. Použitá metoda je vhodná k měření VOCl. Měření emisí VOCl bude pokračovat u dalších druhů rostlin, hub a plísní, při různých koncentracích přidaného chloridu sodného.

#### LITERATURA

- /1/ Latus, F. & Matucha, M. Chloride - a precursor in the formation of volatile organochlorines by forest plants? *Journal of environmental radioactivity* **99**, 119–25 (2008).
- /2/ Filella, I., Wilkinson, M. J., Llusà, J., Hewitt, C. N. & Peñuelas, J. Volatile organic compounds emissions in Norway spruce (*Picea abies*) in response to temperature changes. *Physiologia Plantarum* **130**, 58–66 (2007).
- /3/ Forczek, S. T., Latus, F., Doležalová, J., Holík, J. & Wimmer, Z. Emission of climate relevant volatile organochlorines by plants occurring in temperate forests. *Plant, Soil and Environment* **61**, 103–108 (2015).
- /4/ Holopainen, J. K. & Gershenzon, J. Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends in plant science* **15**, 176–84 (2010).
- /5/ Murphy, C. D. New frontiers in biological halogenation. *Journal of applied microbiology* **94**, 539–48 (2003).

#### Poděkování

Uvedená práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury České republiky, grant č. 13-11101S.

## VYUŽITIE MULTISPEKTRÁLNEJ INDUKOVANEJ FLUORESCENCIE PRE DETEKCIU UV-PROTEKČNÝCH LÁTOK V LISTOCH VYBRANÝCH DRUHOV RASTLÍN

### *USING OF MULTI-SPECTRAL INDUCED FLUORESCENCE FOR DETECTION OF UV-PROTECTIVE COMPOUNDS IN THE LEAVES OF SELECTED PLANT SPECIES*

Klaudia Brücková, Kristýna Kunderlíková, Marián Brestič, Marek Živčák  
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FAPZ, Katedra fyziológie rastlín, Trieda A. Hlinku 2, 949  
76 Nitra, Slovenská republika, xbruckova@is.uniag.sk

#### *Summary*

In our experiment we determined flavonoid content in various species of medicinal herbs and trees with using of multi-spectral induced fluorescence. Analysis of individual flavonoid contents we carried out with fluorescent sensor Multiplex<sup>®</sup> 3. Principle of this non-destructive method is based on parallel multi-channel measurement of fluorescence emitted by light of different wavelengths after excitation. The highest amount of flavonoids was determined in the leaves of *Echinops ritro* and the lowest value of flavonoids was recorded in the leaves of *Malva sylvestris*. Between observed plant species were found statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

*Key words: flavonoids, medicinal herbs, non-destructive measurement, fluorescence*

#### *Súhrn*

V našom experimente sme determinovali obsah flavonoidov v rôznych druhoch liečivých rastlín a drevín s využitím multispektrálnej indukovanej fluorescence. Analýzu jednotlivých flavonoidových obsahov sme vykonali fluorescenčným snímačom Multiplex<sup>®</sup> 3. Princíp tejto nedeštruktívnej metódy vychádza z paralelného viackanáľového merania fluorescence emitovanej po excitácii svetlom rôznych vlnových dĺžok. Najvyššie množstvo flavonoidov sme stanovili v listoch *Echinops ritro* a najnižšia hodnota flavonoidov bola zaznamenaná v listoch *Malva sylvestris*. Medzi pozorovanými rastlinnými druhmi boli zistené štatisticky významné rozdiely ( $P < 0,05$ ).

*Kľúčové slová: flavonoidy, liečivé rastliny, nedeštruktívne meranie, fluorescencia*

## ÚVOD

Ultrafialové (UV) žiarenie indukuje oxidačný stres /1/, ktorý vzniká zo škodlivých účinkov aktívnych kyslíkových druhov reagujúcich s lipidmi, pigmentami, proteínmi a nukleovými kyselinami /2/. Vyššie rastliny sú prirodzene vystavené pomerne vysokým dávkam UV žiarenia. Fotosyntetický aparát vyšších rastlín je citlivý predovšetkým na poškodenie UV-B žiarením. Pigmenty lokalizované v epidermálnych bunkách (hlavne flavonoidy a antokyaníny) redukovujú epidermálnu penetráciu UV-B žiarenia, čím poskytujú ochranu vnútorným tkanivám bez poškodenia fotosyntézy /3/. Akumulácia fenolických zlúčenín, ktoré selektívne absorbujú UV radiáciu v rastlinnej kutikule a epiderme predstavuje pravdepodobne najefektívnejší nástroj stratégie pre dlhodobú adaptáciu v podmienkach pravidelnej a prolongovanej expozície zvýšeným dávkam slnečného žiarenia /4/.

Cieľom našej práce bolo stanoviť *in vivo* akumuláciu UV-protekčných látok, konkrétne flavonoidov v listoch rozličných druhov liečivých rastlín a drevín aplikáciou nedeštruktívnych fluorescenčných meraní.

## MATERIÁL A METODIKA

Determináciou obsahu flavonoidov sme sa zaoberali v listoch liečivých rastlín a drevín lokalizovaných v Botanickej záhrade Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre v období kvitnutia. Na nedeštrukčné meranie obsahu flavonoidov sme použili multiparametrický fluorescenčný prístroj Multiplex<sup>®</sup> 3 (Force-A, Francúzsko). Princíp tejto metódy je založený na excitácii biologického materiálu pomocou svetlom emitovaných diód (LED) s následným filtrovaním signálov. Prístroj má tri detektorové kanály a generuje štyri excitácie. Pozostáva zo šiestich zdrojov UV svetla (LED matric) dosahujúcich vrchol pri vlnovej dĺžke 375 nm a troch LED matric (červená, zelená, modrá) emitujúcich svetlo pri vlnovej dĺžke 470 nm (modrá), 516 nm (zelená) a 635 nm (červená). Tri synchronizované fotodiódové fluorescenčné detektory zaznamenávajú žltú, červenú a infračervenú fluorescenciu /5/.

Obsah flavonoidov bol stanovený FLAV indexom, ktorý je odvodený od UV-absorpčných vlastností flavonoidov. Použitá metóda je založená na fluorescenčnej technike využívajúcej dve excitácie vlnových dĺžok, jedna je v UV vlnovej dĺžke (375 nm), ktorá je absorbovaná flavonoidmi, lokalizovanými hlavne v epiderme a druhá referenčná vlnová dĺžka prechádza cez epidermu, bez toho, aby bola absorbovaná. Obsah flavonoidov je vyjadrený v relatívnych jednotkách (rel. j.), pretože pomer dvoch absorpcií udáva bezrozmerné číslo.

*Hodnotený parameter: flavonoidový index (FLAV index)*

$$FLAV = \log (FRF_R / FRF_{UV})$$

FRF<sub>R</sub> – tmavo červená fluorescencia chlorofylu indukovaná zábleskom červeného (R) svetla

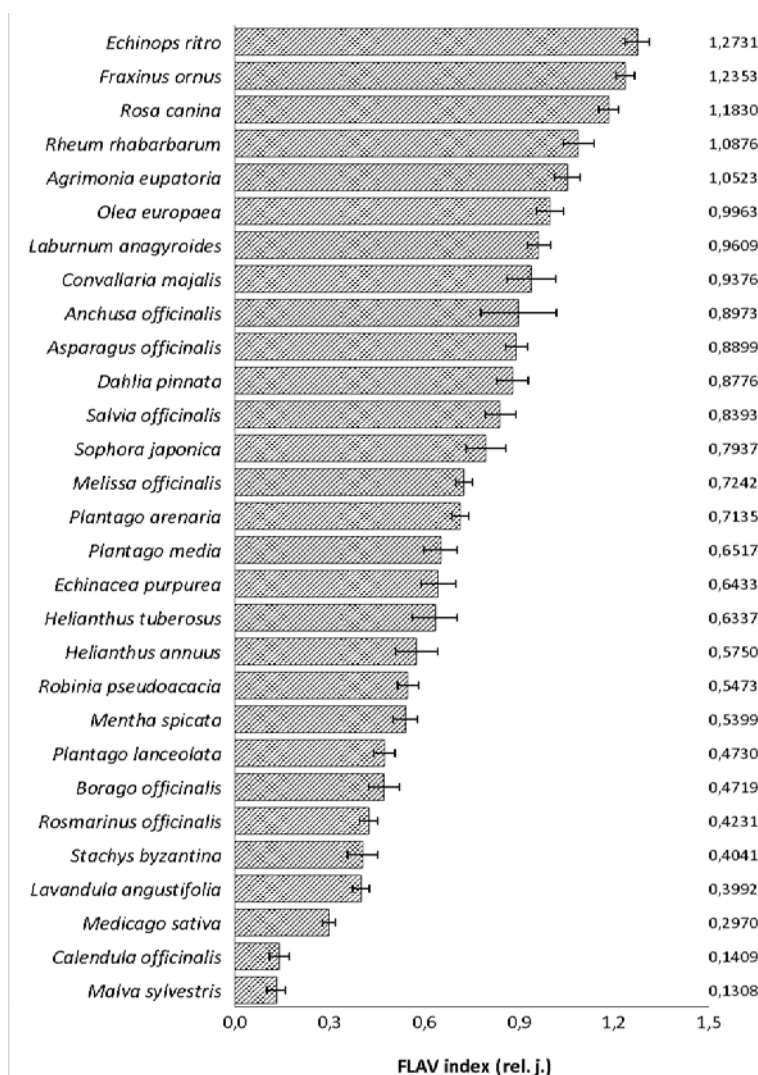
FRF<sub>UV</sub> – tmavo červená fluorescencia chlorofylu indukovaná zábleskom ultrafialového (UV) svetla

Štatistická významnosť rozdielov v zistených výsledkoch medzi jednotlivými druhmi bola vyhodnotená jednofaktorovou analýzou rozptylu (ANOVA) v programe SPSS 20.0 (Chicago, USA) s využitím Tukeyho HSD testu. Hodnoty flavonoidov sú vyjadrené ako priemer z 20-25 meraní v závislosti od rastlinného materiálu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Obsah flavonoidov sme hodnotili celkovo v 29 druhoch liečivých rastlín a drevín (obr. 1), pričom sme zaznamenali štatisticky významné rozdiely ( $P < 0,05$ ) v obsahoch flavonoidov medzi pozorovanými druhmi. Najvyššie množstvo flavonoidov sme detegovali v listoch ježibaby belasej (*Echinops ritro*) (1,2731 rel. j.) a jaseňa mannového (*Fraxinus ornus*) (1,2353 rel. j.). Naopak najnižšie hodnoty boli zaznamenané v listoch slezu lesného (*Malva sylvestris*) (0,1308 rel. j.) a nechtíka lekárskeho (*Calendula officinalis*) (0,1409 rel. j.). /6/ zistili kolorimetrickou metódou v listoch slezu lesného taktiež najnižšiu hodnotu flavonoidov spomedzi 16 hodnotených stredomorských dietetických rastlín. /7/ sa zaoberali spektrofotometrickým stanovením množstva flavonoidov v rôznych odrodách nechtíka lekárskeho, pričom dospeli k záveru, že celkový obsah flavonoidov môže závisieť od odrody, miesta a času pestovania semien nechtíka lekárskeho a taktiež poznamenali, že farba súkvetia neindikuje celkový obsah flavonoidov v rovnakých odrodách. Stredný obsah flavonoidov bol nájdený v listoch agátu bieleho (*Robinia pseudoacacia*) (0,5473 rel. j.) a slnečnice ročnej (*Helianthus annuus*) (0,5750 rel. j.). /8/ zisťoval množstvo flavonoidov v listoch, stonkách a koreňoch slnečnice ročnej pomocou spektrofotometrických meraní. Maximálna hodnota bola dosiahnutá v listoch, pričom záverom autor zhodnotil, že listy obsahujú najviac alelochemikálií, čo je spôsobené vylučovaním týchto látok z koreňov do stoniek, odkiaľ sú premiestňované do listov, z ktorých chemické látky nevyprchajú.

Naše výsledky o medzidruhovej variabilite v obsahu UV-absorbčných látok v listoch sledovaných druhov liečivých rastlín a drevín indikujú významnú úlohu skríningovej analýzy obsahu flavonoidov s využitím fluorescenčného senzora Multiplex<sup>®</sup> 3.



Obr. 1: Obsah flavonoidov v listoch liečivých rastlín a drevín vyjadrený v relatívnych jednotkách

## LITERATÚRA

- Costa, H., Gallego, S. M., Tomaro, M. L.: Effects of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. *Plant Science*, 162, 2002: 939-945
- Dai, Q., Yan, B., Huang, S., Liu, X., Peng, S.: Response of oxidative stress defense system in rice (*Oryza sativa*) leaves with supplemental UV-B radiation. *Physiologia Plantarum*, 101, 1997: 301-308
- Caldwell, M. M., Robberecht, R., Flint, S. D.: Internal filters: Prospects of UV-acclimation in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 58, 1983: 445-450
- Liakoura, V., Bornman, J. F., Karabourniotis, G.: The ability of abaxial and adaxial epidermis of sun and shade leaves to attenuate UV-A and UV-B radiation in relation to the UV absorbing capacity of whole leaf methanolic extracts. *Physiologia Plantarum*, 117, 2003: 33-43
- Ghozlen, N. B., Cerovic, Z. G., Germain, C., Toutain, S., Latouche, G.: Non-Destructive Optical Monitoring of Grape Maturation by Proximal Sensing. *Sensors*, 10, 2010: 10040-10068
- Conforti, F., Ioele, G., Statti, G. A., Marrelli, M., Ragno, G., Menichini, F.: Antiproliferative activity against human tumor cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plants. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2008: 3325-3332
- Raal, A., Kirsipuu, K.: Total flavonoid content in varieties of *Calendula officinalis* L. originating from different countries and cultivated in Estonia. *Natural Product Research*, 25, 2011: 658-662
- Kamal, J.: Quantification of alkaloids, phenols and flavonoids in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *African Journal of Biotechnology*, 10, 2011: 3149-3151.

## Pod'akovanie

Táto práca bola podporená z prostriedkov projektu č. 26220220180: Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“.

## NANOGECHÓRY NA SKLÁDKE LÚŽENCA, PRIEMYSELNÉHO ODPADU Z VÝROBY NIKLU PRI BÝVALEJ NIKLOVEJ HUTE V SEREDI

### *NANOGECHORES AT THE LANDFILL OF LÚŽENEC, INDUSTRIAL WASTE FROM PRODUCTION OF NICKEL NEAR THE FORMER METALLURGICAL PLANT IN SEREĎ*

Eva Michaeli<sup>1</sup>, Martin Boltížiar<sup>2</sup>, Danica Fazekašová<sup>3</sup>, Vladimír Solár<sup>1</sup>, Monika Ivanová<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Prešovská univerzita v Prešove, FHPV, Katedra geografie a aplikovanej geoinformatiky, Ul. 17. Novembra č. 1, 051 16 Prešov, Slovenská republika, eva.michaeli@unipo.sk

<sup>2</sup> Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre FPV, katedra geografie a regionálneho rozvoja, Trieda A. Hlinku 1, 949 74 Nitra, Slovenská republika

<sup>3</sup> Prešovská univerzita v Prešove, FM, Katedra environmentálneho manažmentu, Ul. 17. Novembra č. 1, 08116 Prešov, Slovenská republika

#### *Summary*

The landfill of industrial waste - lúženec (sludge from nickel production) was created near the Nickel smelter at Sereď for the 30 years (1963-1993). The basic raw material for the production of nickel and cobalt was lateritic iron-nickel-ore from Albania containing 1% nickel in 1 t of ore. On the base of wet manufacturing process was created the landfill with mass of 9 million t (annually 300,000 tons) with the acreage 37 ha. In 1993 the State decided to liquidate the smelter and in 1994 sold the landfill of the private company that is committed to eliminate landfill for 15 years. It has not happened and the landfill is the owned already in the fourth private company. The main aim of this paper was researching current structure of the landfill, which was formed during the manufacturing process and after liquidation of the nickel smelter. On the landfill we identified five different spatial units with a specific internal structure – nanogechores (Obr. 1).

*Key words:* landfill of waste, nanogechores, industrial waste - lúženec, Sereď

#### *Zhrnutie*

Skládka priemyselného odpadu lúženca sa formovala pri Niklovej hute v Sereďi 30 rokov (1963 – 1993). Základnou surovinou na výroby niklu a kobaltu bola lateriticko-železníková ruda z Albánska s obsahom 1 % niklu v 1 tone rudy. Mokrým výrobným procesom vznikla pri hute skládka lúženca s hmotnosťou 9 mil. t (ročne 300 000 t) a plochou okolo 37 ha. V roku 1993 rozhodol štát o likvidácii huty a v roku 1994 predal skládku súkromnej spoločnosti, ktorá sa zaviazala odstrániť skládku za 15 rokov. Neudialo sa tak doteraz a skládku vlastní v poradí už štvrtá súkromná spoločnosť. Hlavným cieľom príspevku bol výskum jej súčasnej štruktúry, ktorá sa na nej sformovala jednak počas procesu výroby a po likvidácii. Na skládke sme vyčlenili 5 odlišných priestorových jednotiek, ktoré sme vzhľadom na ich vnútornú štruktúru pomenovali ako nanogechory.

*Kľúčové slová:* skládka odpadu, nanogechóry, priemyselný odpad – lúženec, Sereď

## ÚVOD

Priemyselná skládka hutníckeho odpadu lúženca leží na rozhraní katastrálnych území mesta Sereď a obce Dolná Streda na Dolnovážskej nive Podunajskej roviny /6/ v nadmorskej výške 125 m. Patrí do intramontánnej nížinnej krajiny mierneho pásma /5/. Dolnovážsku nivu tvoria fluvialne hlinito-piesčité a hlinité sedimenty holocénu s mocnosťou 10 – 12 m /4/. Na tomto podloží sa nachádza skládka lúženca, bez izolácie oproti podložíu. Skládka lúženca predstavuje nápadnú povrchovú, konvexnú nehorľavú antropogénnu formu reliéfu, ktorá vznikla akumuláciou odpadu z hutníckej výroby (výška skládky je 35 m, rozloha okolo 37 ha). Má tvar tabule so širokým

mierne rozčleneným povrchom, ktorý je ohraničený strmými svahmi (sklon 10 - 45°). Z aspektu zloženia je lúženec jemný materiál (prachový piesok) čiernej farby. Vznikol mletím a prepieraním albánskej železnikovej lateritickej rudy. Podlieha pomerne rýchlo svahovým gravitačným, fluviaľným procesom a deflácií (zanášanie polymetalického prachu do okolia) ako aj antropogénnym procesom, ktoré menia pôvodný tvar skládky najmä na plochách bez vegetácie. V rokoch 1976 – 1980 bol na skládke vykonaný postrek antieróznou látkou a súčasne sa realizoval pokus o zatrávenie, ktorý nebol úspešný. V rokoch 1993 a 1994, po predchádzajúcom výskume vlastností lúženca (do lúženca boli primiešané saturačné kaly a oplachová zemina z cukrovarov v Seredi a Sládkovičove a odpad z ČOV v Šali) bola časť skládky (okolo 8 ha) úspešne ozelenená /3/.

## MATERIÁL A METODA

Použili sme metódu terénneho mapovania, na základe ktorej sme analýzou určili súčasnú štruktúru skládky lúženca. Terénnym mapovaním a chemickou analýzou vzoriek technozemí boli určené topické znaky lokácie v zmysle vertikálnych vzťahov (interrelations). Mapovaním priestorového rozšírenia technozemí podľa chemických rozborov vzoriek (ŠGÚŠ, Geoanalytical laboratories, ASL STN EN ISO/IEC, Spišská Nová Ves, SR) a charakteru rastlinstva sme dospeli k chorickej štruktúre lokácie na základe horizontálnych vzťahov (interconnections). Využitím interpretácie farebných satelitných ortofotosnímkov z roku 2007 s vysokým rozlíšením a digitalizáciou priestorových údajov sme na skládke z aspektu vertikálnej a horizontálnej štruktúry identifikovali 5 typov nanogeochoúr (Obr. 1).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Od roku 1993 kedy došlo k likvidácii niklovej huty bola skládka odpadu z výroby niklu formovaná rekultivačným procesom, prírodnými geomorfologickými procesmi a procesom antropogénnej činnosti - ťažbou. Podľa charakteru súčasnej štruktúry sme skládku rozdelili na päť fyziognomicky odlišných nanogeochoúr: 1 nanogeochoúra plošiny a svahov skládky s ťažbou, 2 nanogeochoúra výrazných svahov skládky, 3 nanogeochoúra rekultivovanej plochy, 4 nanogeochoúra povrchu skládky so stromovou vegetáciou, 5 nanogeochoúra na rozvlečenom lúženci /7/.

**1 Nanogeochoúra plošiny a svahov skládky s ťažbou:** plošina skládky má sklon 1-10°, sklon svahov sa mení denne podľa frekvencie ťažby (ročná kapacita ťažby je 6 000 t), povrch nanogeochoury je formovaný ťažobnými mechanizmami, z prírodných procesov najviac defláciou, menej eróziou, nemá súvislú vegetačnú pokrývku, drobné areály rastlín, niekoľko decimetrov sa vyskytujú iba ojedinele, sú to zvyšky (*Dactylis glomerata*, *Poa pratensis* a *Festuca rubra*) po neúspešnom hydroseve Bratislavskými rašelinovými závodmi v r. 1976–1978 a 1980. Areál je najväčším zdrojom polymetalického prachu, ktorý pôsobí na ľudský organizmus mechanicky, toxicky, vyvoláva alergie a má karcinogénny účinok (Ni a Cr). Čistý lúženec má nízku vodnú kapacitu, vysokú evaporáciu a teplotu (10 cm pod povrchom 34 °C). Ťažba lúženca a jeho vlastnosti neposkytujú vhodné podmienky pre udržanie rastlinnej pokrývky.

**2 Nanogeochoúra výrazných svahov skládky:** svahy skládky sú krátke a strmé, sklon 40-45°, formované creepom, lineárnou eróziou, defláciou. bez alebo so sporou vegetačnou pokrývkou. Sukcesiou sa vegetácia sporadicky uchyťava skôr na východných svahoch, južné a západné sú veľmi teplé. Hlboké (1,5 - 2,5 m) erózne ryhy sú miestami rozšírené, stružky bývajú plytké. Defláciou tu vznikli aeroxysty.

**3 Nanogeochoúra rekultivovanej plochy:** zaberá približne 8 ha skládky. Má plochý mierne uklonený povrch (3 - 10°). V okrajovej časti (JV) sa vyskytujú plytké zamokrené depesie. Z aspektu vegetačnej pokrývky nie je homogénna, prevažujú lokality s trávnyim porastom, menšie areály v depesiách zaberá *Fragmites communis*. Rekultivovaná časť telesa je pokrytá prevažne bylinno-trávnou vegetáciou reprezentovanou monocenózami s *Artemisia absinthium*. Z pokusov Ústavu experimentálnej biológie a ekológie SAV v Bratislave /1, 2/ vyplýva, že čistý lúženec má



najhoršie vlastnosti pre rekultiváciu, ale s 20 % prímiesou cukrovarenských kalov (obsahujú vysoký podiel organických zvyškov a  $\text{CaCO}_3$ ), oplachovej zeminy a odpadu z ČOV bola v r.1993/1994 vykonaná rekultivácia skládky a vytvoril sa tu hustý trávny porast (*Festuca rupicola*, *Dactylis glomerata*, *Lolium perenne*, *Arrhenatherum elatus* a i.).

### Nanogeochoéry na skládke lúženca pri Seredi



Obr. 1 Nanogeochoéry na skládke lúženca pri bývalej Niklovej hute š. p. v Seredi.

**4 Nanogeochoéra plošiny skládky so sukcesnou vegetáciou:** zaberá na skládke priestor medzi nanogeochoerami rekultivovanej plochy a areálom ťažby. Predstavuje ju mierne denivelizovaná plošina. Vegetačnú pokrývku tvoria *Populus canescens* a *Populus tremula* v nesúvislom sponse. V podraсте sa nachádza *Calamagrostis epigejos* a iné byliny.

**5 Nanogeochoéra na rozvlečenom lúženci:** rozprestiera sa pri päte haldy na západe, severe a severovýchode. Povrch areálu je formovaný antropogénnou činnosťou. Vyskytuje sa tu celý rad mikroforiem reliéfu (depresie, drobné elevácie brázdy, ap.) Vegetačná pokrývka má 60 -80 % pokryvnosť a druhy majú vyššiu abundanciu a dominanciu. Z drevín sa tu nachádza *Populus canescens*, *Populus tremula*, *Betula verrucosa*. Rastliny s kolovitými koreňmi reprezentuje *Cardaria draba*, *Carduus acanthoides*, *Convolvulus arvensis*. Charakteristické pre tento areál sú ruderálne druhy *Agropyrum repens*, *Artemisia vulgaris*, *Reseda luteta*.

Skládku lúženca v Seredi pri súčasnom tempe ťažby (6 000 t ročne) možno zlikvidovať približne za 1 000 rokov. Najväčším problémom je šírenie toxického polymetalického prachu z plôch nepokrytých vegetáciou do širokého okolia a kontaminácia podzemných, povrchových vôd a pôd. Technológie fyto-remediácie, vzhľadom no množstvo lúženca sú v tomto priestore bezpredmetné, dajú sa využiť skôr v okolí skládky na poľnohospodárskych pôdach (ktoré majú



nadmerný obsah niklu a chrómu a mali by byť vyňaté z poľnohospodárskeho pôdneho fondu). Spracovanie lúženca pomocou mikrovlnnej vitrifikácie je nová perspektívna metóda, ale finančne náročná, ktorá spočíva v stabilizácii nebezpečných látok premenou na sklovitý materiál pri vysokej teplote nad 1 000° C. Ten je potom vysoko odolný proti pôsobeniu vody a vetra (v tomto prípade je potrebné brať do úvahy množstvo odpadu). Minimálna sanácia skládky, ktorá by vyriešila aspoň emisie polymetalického prachu je zotrúvanie skládky, ale skládka je súkromným majetkom a Zákon o environmentálnych záťažiacich, ktorý bol v Slovenskej republike prijatý v januári 2011 sa v tejto lokalite zatiaľ neuplatnil. Ukončením výroby niklu a kobaltu v NH š. p. Sereď zanikol síce hlavný zdroj kontaminácie, ale znečistenie určite nezanikne samo, pretrváva /8, 9/.

#### LITERATURA

- /1/ Banášová, V., Hajduk, J. (1977): Der Gehalt an Fe, Cr, Ni, Ca, Al, Mg, Ti und S in Pflanzen und Boden der Abfallhalden von der Nickelhutte. *Biológia*, (Bratislava), roč. 31, č. 4. s. 279-288.
- /2/ Banášová, V., Hajdúk, J. (1984): Vegetácia na skládke lúženca pri niklovej huti v Sereďi. Zborník IV. Zjazdu SBS Nitra: Slovenská botanická spoločnosť pri SAV, VŠP, ÚEBE, Agrokomples, s. 329-335.
- /3/ Blaško, D. (1994): Záverečná správa o biologickej rekultivácii haldy lúženca pri Sereďi. Rašelinové závody n. p, Bratislava.
- /4/ Maglay, J., Pristaš, J., Nagy, A., Fordinál, K., Elečko, M., Buček, S., Havrila, M., Kováčik, M., Hók, J., Kernátsová, Baráth, I., Kubeš, P., Kucharič, E., Malík, P., Zuberec, J., Klukanová, A., Ondrášik, M., Čurlík, J., Šefčík, P., /1/ Tkáčová, H. & Tkáč, J. (2005): Vysvetlivky ku geologickej mape regiónu Trnavská pahorkatina v M 1: 50 000. Záverečná správa č. 86 508/1, Geofond, Bratislava (manuskript).
- /5/ Mazúr, E., Krippel, E., Porubský, A., Tarábek, K. (1980): In: ATLAS SSR Geoekologické (prírodné krajinné) typy, mapa 1, Kapitola VIII. Fyzickogeografické – geoekologické krajinné jednotky, SAV a Slovenský úrad geodézie a kartografie, Bratislava.
- /6/ Mazúr, E. Lukniš, M. (1980): Geomorfologické jednotky. In: Atlas Slovenskej socialistickej republiky 1980. Slovenská akadémia vied a Slovenský úrad geodézie a kartografie: Kapitola IV., mapa 16, s. 54 – 55.
- /7/ Michaeli, E. Boltížiar, M. (2009): Geoekologická štruktúra krajiny a haldy hutníckeho odpadu lúženca pri Sereďi. *Geografické informácie* 13, Katedra geografie a regionálneho rozvoja FPV UKF Nitra, s. 129 – 144. ISBN 978 – 80 -8094 -637 – 1.
- /8/ Michaeli, E., Boltížiar, M., Ivanová, M. (2009): Geoeological structure of the dump of technological waste (Fe-concentrate) at Sereď. In: *Acta Facultatis Studiorum Humanitatis et Naturae Universitatis Prešovensis, Prírodné vedy*, roč. XLIX, ISSN 1336-6149, *Folia Geographica* 14, Special Issue for the 2<sup>nd</sup> EUGEO CONGRESS Bratislava, p. 180 – 197. ISSN 1336-6157.
- /9/ Michaeli, E., Boltížiar, M. 2010. The dump of metalurgical waste – lúženec and its impact of the landscape at Sereď in Slovak republic. In: *Növénytermelés*, Vol. 59, 2010, Supplementum. pp. 161-164. ISSN 0546-8191.

#### Pod'akovanie

Uvedená práca vznikla za finančnej podpory "Grantovej agentúry VEGA pri Ministerstve školstva vedy, výskumu a športu SR., z projektov VEGA No. 1/0008/13 a VEGA No. 1/0159/15.

## ANTIOXIDAČNÉ ENZÝMY V ÚLOHE MARKEROV CITLIVOSTI RASTLÍN NA ŤAŽKÉ KOVY

### *ANTIOXIDATIVE ENZYMES IN THE ROLE OF MARKERS OF PLANT SENSITIVITY TO HEAVY METALS*

Patrik Mészáros<sup>1</sup>, Roman Kuna<sup>1</sup>, Ildikó Matušíková<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Katedra botaniky a genetiky, Nábřežie mládeže 91, 949 74 Nitra, pmeszaros@ukf.sk

<sup>2</sup> Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, 950 07 Nitra, ildiko.matusikova@savba.sk

#### *Summary*

The objective of this work was to investigate the toxic effects of cadmium as well as study several indicators of oxidative stress and antioxidant responses in the roots of selected variety of soybean (*Glycine max* L. cv. Merlin) exposed to a wide concentration range of cadmium ions. The toxicity of cadmium on root growth appeared at each tested concentration of cadmium. Within the biochemical assays we found that only the lower concentrations of cadmium caused oxidative stress in the roots of soybean, since this was apparently effectively eliminated by the accumulation of the different isoforms of superoxide dismutases at higher concentrations of cadmium. The results of our experiments show that the determination of the activity of the various isoforms of superoxide dismutases may pose as a reliable marker for the testing of plant susceptibility to the tested stress type as well as an appropriate indicator of the rate of environmental pollution by heavy metals.

*Key words: soybean, cadmium, oxidative stress, antioxidative defense, superoxide dismutase*

#### *Súhrn*

Práca sa zameriava na študovanie toxického vplyvu kadmia na rastliny a sleduje niektoré ukazovatele oxidačného stresu a antioxidačnej odpovede v koreňoch vybranej odrody sóje fazuľovej (*Glycine max* L. cv. Merlin) vystavených širokej koncentračnej škále iónov kadmia. Jeho toxicita na rast koreňov sa prejavila pri každej testovanej koncentrácii. Pri biochemických analýzach sme zistili, že oxidačný stres v koreňoch sóje sa prejavil iba pri nižších koncentráciách kadmia, nakoľko tento bol zrejme efektívne eliminovaný akumuláciou jednotlivých izoform antioxidantných enzýmov superoxid dismutáz pri vyšších koncentráciách kadmia. Z výsledkov našich experimentov vyplýva, že stanovenie aktivity jednotlivých izoform superoxid dismutáz môže byť spoľahlivým markerom pre testovanie citlivosti rastlín voči sledovanému typu stresu ako aj vhodným ukazovateľom miery znečistenia prostredia ťažkými kovmi.

*Kľúčové slová: sója, kadmium, oxidačný stres, antioxidačná obrana, superoxid dismutáza*

## ÚVOD

Ťažké kovy patria medzi vážne kontaminanty životného prostredia a poškodzujú rastliny dvoma hlavnými spôsobmi, priamym spomalením rastu a biosyntetických dráh, a zapojením sa do produkcie voľných radikálov. Oxidačný stres je stav spôsobený prevahou voľných radikálov v organizme nad antioxidačnými faktormi. Voľné radikály môžu v organizme reagovať s biologickými molekulami (sacharidy, lipidy, proteíny, DNA), narúšať ich štruktúru a funkciu, a tým poškodzovať bunkové organely. V tomto procese patrí medzi najvýznamnejšie práve peroxidácia fosfolipidov bunkových membrán a lipoproteínov. Rastlinný organizmus disponuje rozličnými antioxidačnými mechanizmami, ktoré degradujú voľné radikály a opravujú poškodené molekuly v bunkách. Tieto mechanizmy v sebe zahŕňajú enzymatické a neenzymatické

antioxidanty /1/. Za primární obranu rostlin proti kyslíkovým radikálom sa považuje antioxidačný enzým superoxid dismutáza (SOD). Jej úlohou je redukcia voľného superoxidového aniónu ( $O_2^{\cdot-}$ ) na peroxid vodíka ( $H_2O_2$ ). Dismutácia je katalyzovaná kovovým iónom ( $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{3+}$ ,  $Cu^{2+}/Zn^{2+}$ ) na aktívnej strane enzýmu /2/.

Predmetom tejto práce bolo študovať oxidačný stres v koreňoch sóje fazuľovej odrody Merlin pri ich vystavení rôznym koncentráciám iónov kadmia ako aj relevantnú antioxidačnú odpoveď na vyvolaný stres.

## MATERIÁL A METÓDY

Semená sóje (*Glycine max* L. cv. Merlin) sme po sterilizácii v 0,5 % (w/v) roztoku chlórnanu sodného predkličovali v umelohmotných nádobách na trojitej vrstve filtračných papierov navlhčených sterilnou destilovanou vodou počas 2 dní v tme pri teplote 23°C. Naklíčené semená s rovnako dlhými koreňmi sme preniesli do sterilných Petriho misiek obsahujúcich trojitú vrstvu filtračného papiera a aplikovali sme sedem rôznych koncentrácií kadmia (5, 50, 100, 200, 300, 400 a 500  $mg.l^{-1} Cd^{2+}$ ) vo forme roztokov dihydrátu chloridu kademnatého ( $CdCl_2 \times 2H_2O$ ) po dobu 48 hodín v tme pri 23°C. Kontrolné semená sme inkubovali v sterilnej destilovanej vode. Realizovali sme 3 biologické opakovania experimentu, pričom sme analýzam podrobili najmenej 54 semien pre každú koncentráciu kadmia.

Toleranciu koreňov sóje voči aplikovaným koncentráciám kadmia sme vyjadrili tolerančným indexom (TI) v percentách na základe ich čerstvej hmotnosti. Mieru peroxidácie membránových lipidov sme stanovili podľa protokolu /3/. Obsah peroxidu vodíka v koreňoch sme kvantifikovali podľa /4/. Proteíny izolované podľa /5/ sme separovali na polyakrylamidových géloch a detekovali na nich aktivitu jednotlivých izoforiem SOD podľa /6/.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

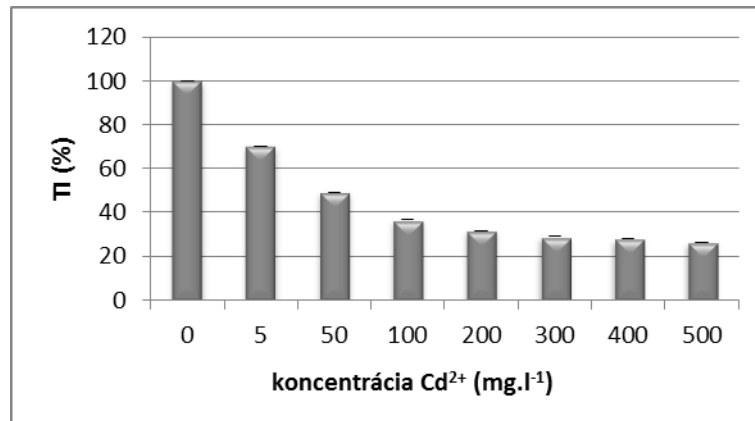
Stanovením tolerančného indexu koreňov voči kadmium sme zistili, že so zvyšujúcou koncentráciou kadmia sa znižuje miera tolerancie koreňov sóje voči tomuto kovu. Najviac toxicky na rast koreňov pôsobila koncentrácia 500  $mg.l^{-1}$ , kedy klesol tolerančný index až na 26 %. Naopak, najväčšiu toleranciu preukázali korene pri 5  $mg.l^{-1}$  (TI = 70 %). Všetky dosiahnuté výsledky boli štatisticky významné ( $P \leq 0,001$ ) (Graf 1).

V rámci našich experimentov sme zistili mierne klesajúci obsah molekuly  $H_2O_2$  so zvyšujúcou sa koncentráciou kadmia, pričom jediný štatisticky významný výsledok sme dosiahli pri koncentrácii 100  $mg.l^{-1} Cd^{2+}$  ( $P \leq 0,05$ ) (Graf 2).

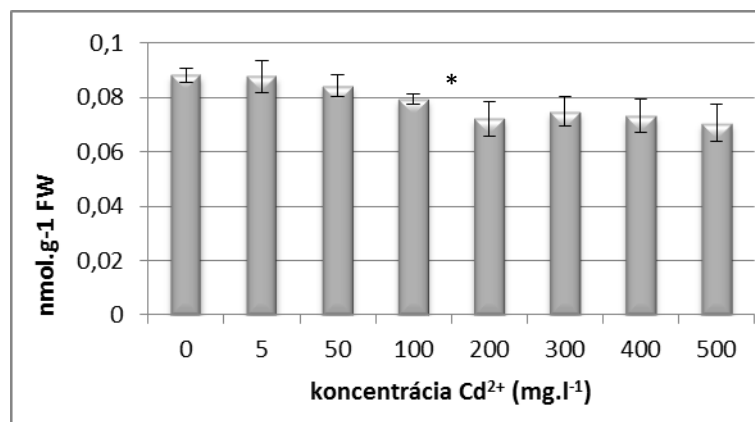
Pri stanovení miery peroxidácie lipidov, sme pozorovali nepravidelné zmeny v obsahu MDA so stúpajúcou koncentráciou  $Cd^{2+}$ . V koreňoch sóje fazuľovej sme pozorovali zvýšenú hladinu MDA už pri koncentrácii 5  $mg.l^{-1}$  ( $P \leq 0,05$ ), na druhej strane však zníženú hladinu MDA pri vyšších koncentráciách kadmia (50 – 500  $mg.l^{-1}$ ), tieto výsledky však neboli štatisticky preukázané (Graf 3).

Nadobudnuté výsledky signalizujú odlišné zapnutie antioxidačných mechanizmov pri nízkych a vysokých koncentráciách kadmia. Kým mierne zvýšený oxidačný stres pri 5  $mg.l^{-1} Cd^{2+}$  signalizuje ešte nezapnutý antioxidačný mechanizmus, pri vysokých koncentráciách ťažkého kovu má rastlina zrejme aktivizované viaceré dráhy tohto mechanizmu, ako to pozorovali aj /7, 8/. Aktivizovaný antioxidačný mechanizmus v odpovedi na vyššie koncentrácie kadmia sme nakoniec zistili aj my pri analýzach aktivít jednotlivých izoforiem SOD.

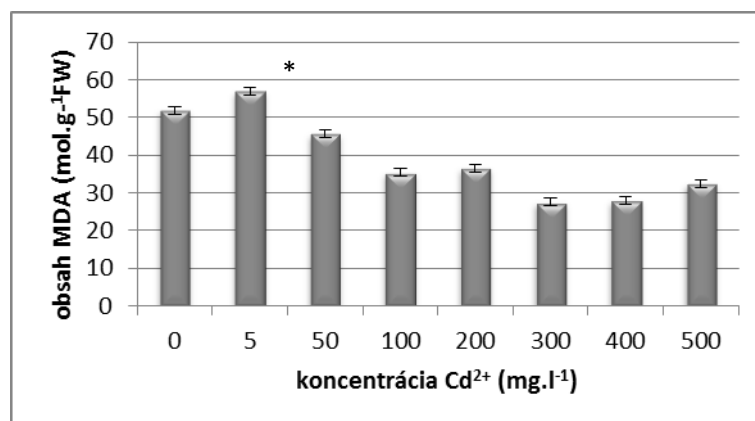
Z koreňov sóje vystavených rôznym koncentráciám kadmia sme izolovali proteíny, ktoré sme následne separovali na polyakrylamidových géloch. Detekovali sme celkovo 6 zreteľných izoforiem antioxidačných enzýmov SOD (Obr. 1). Aktivita väčšiny izoforiem sa vplyvom všetkých aplikovaných koncentrácií kadmia zvýšila, pričom sa našla iba jedna izoforma, ktorej aktivita bola kadmium mierne potlačená.



Graf 1: Index tolerancie koreňov pri rôznych koncentráciách aplikovaného kadmia. Chybové úsečky znázorňujú strednú chybu priemeru hodnôt z 50 – 60 koreňov. Všetky stanovené hodnoty TI sú štatisticky významné pri  $P \leq 0,001$ .



Graf 2: Obsah peroxidu vodíka v koreňoch sóje po ich vystavení toxickým vplyvom rôznych koncentrácií kadmia. Údaje znázorňujú aritmetický priemer z troch biologických opakovaní  $\pm$  strednú chybu priemeru. Hodnoty sú štatisticky významné pri: \*  $P \leq 0,05$ .

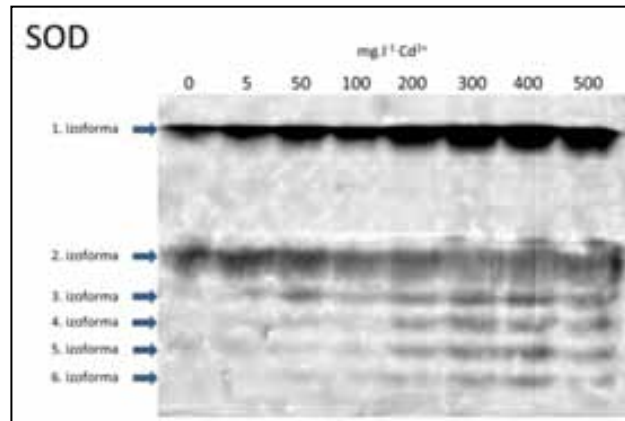


Graf 3: Miera peroxidácie lipidov vyjadrená ako obsah MDA v koreňoch sóje vplyvom aplikovaných koncentrácií kadmia. Chybové úsečky znázorňujú strednú chybu priemeru z troch biologických opakovaní. Hodnoty sú štatisticky významné pri: \*  $P \leq 0,05$ .

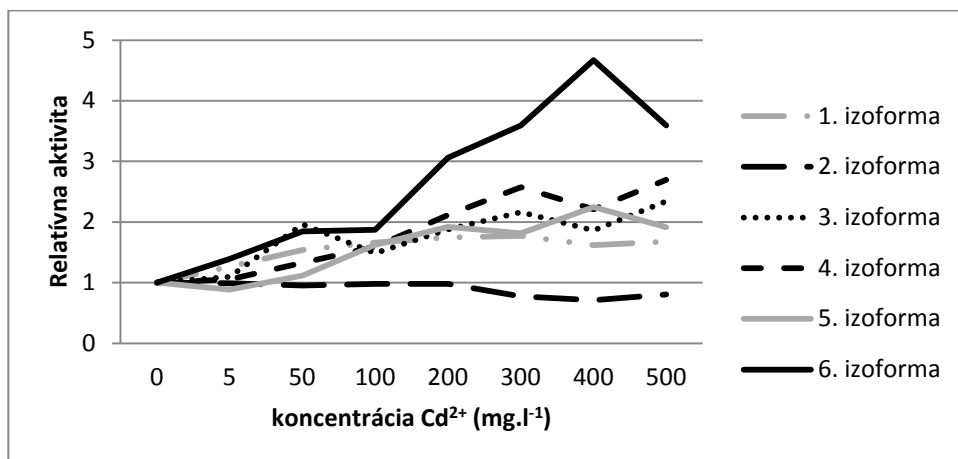
V prítomnosti kadmia sa štatisticky významne ( $P \leq 0,05$ , s výnimkou 5 mg.l<sup>-1</sup> Cd<sup>2+</sup>) zvýšila akumulácia prvej, najväčšej izoformy SOD o 26 až 77 % (najviac pri 300 mg.l<sup>-1</sup> Cd<sup>2+</sup>). Zvýšenú aktivitu sme zaznamenali aj v prípade 3., 4., 5. a 6. izoformy SOD, avšak tieto výsledky prevažne neboli štatisticky preukazné (Graf 4). Naopak, druhá najväčšia izoforma SOD sa zachovala úplne

inak, nakoľko jej aktivita bola vplyvom všetkých testovaných koncentrácií kadmia redukovaná až na 71 % (pri  $400 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ ) (Graf 4). Tieto výsledky však neboli štatisticky významné.

Akumuláciu antioxidantných enzýmov SOD študovali mnohí autori v rôznych rastlinných orgánoch. Niektorí z nich /9, 10/ pozorovali opačné výsledky na rastlinách z čeľade *Fabaceae* v porovnaní s našimi. Z výskumu /8, 11, 12/ však tiež vyplýva, že zvýšená produkcia SOD zabezpečuje väčšiu ochranu rastlín pred oxidačným stresom, a že jeho aktivita je stimulovaná tak nízkymi ako aj vysokými koncentraciami kadmia.



Obr. 1: Detekované izoformy SOD v koreňoch sóje.



Graf 4: Zmeny v aktivite detekovaných izoforiem SOD. V grafe sú znázornené relatívne hodnoty aritmetického priemeru vždy v porovnaní s kontrolou (=1) z 3-4 opakovaní experimentu. Štatistickú významnosť výsledkov uvádzame v texte.

Pre študovanie vzťahov medzi oxidačným poškodením buniek a antioxidantnou aktivitou vybraných enzýmov, ako aj pre zhodnotenie potenciálu niektorej konkrétnej odpovede ako markera citlivosti rastlín na ťažké kovy (kadmium) sme získané výsledky podrobili korelačným analýzám. Tolerančný index koreňov sóje pozitívne koreloval s testovanými biochemickými parametrami, čo zároveň znamená, že so zvyšujúcou sa koncentráciou kadmia sa znižovalo oxidačné poškodenie v pletivách koreňov. Vysvetlenie na túto skutočnosť nám dáva silná nepriama závislosť medzi parametrami oxidačného poškodenia (miera peroxidácie lipidov a obsah  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a antioxidantnej obrany (aktivita jednotlivých izoforiem SOD), v zmysle ktorej zvýšená akumulácia jednotlivých izoforiem antioxidantného enzýmu SOD v koreňoch sóje fazuľovej vysoko účinne potláča oxidačný stres vyvolaný zvyšujúcou sa koncentráciou kadmia ( $r$  vyšší ako 0,9 resp. 0,7). Oxidačný status v koreňoch sóje fazuľovej je teda účinne kontrolovaný každou izoformou antioxidantného enzýmu SOD. Zo vzťahov vyplýva aj to, že predovšetkým sledovanie

aktivít jednotlivých izoforiem SOD má vysoký potenciál pre identifikáciu rastlín citlivých na ťažké kovy (kadmium) a môže byť zároveň vhodným ukazovateľom miery znečistenia prostredia ťažkými kovmi. Aplikovateľnosť tohto predpokladu je však nutné overiť ďalšími analýzami na rôznych iných poľnohospodárskych plodinách.

#### LITERATÚRA

- /1/ Sharma, P., Dubey, R.S.: Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012, 2012: 1 - 26.
- /2/ Amic, D., Amic-Dragovic, D., Bešlo, D., Trinajstić, N.: Structure radical scavenging relationship of flavonoids. *Croatia Chemica Acta*, 2003, 76: 51 – 61.
- /3/ Karabal, E., Yücel, M., Öktem, H.A.: Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. *Plant Science*, 2003, 164: 925 - 933.
- /4/ Konotop, Y., Mészáros, P., Spiess, N., Mistríková, V., Piršelová, B., Libantová, J., Moravčíková, J., Taran, N., Hauptvogel, P., Matušíková, I.: Defense responses of soybean roots during exposure to cadmium, excess of nitrogen supply and combinations of these stressors. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39: 10077 - 10087.
- /5/ Hurkman, W.J., Tanaka, C.K.: Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology*, 1986, 8: 802 – 806.
- /6/ Weydert, C.J., Cullen, J.J.: Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature Protocols*, 2010, 5: 51 - 66.
- /7/ Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A.: Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 2000, 151: 59 – 66.
- /8/ Dominguez, D.M., Garcia, F.C., Raya, A.C., Santiago, R.T.: Cadmium-induced oxidative stress and the response of the antioxidative defense system in *Spartina densiflora*. *Physiologia Plantarum*, 2010, 139: 289 – 302.
- /9/ Sandalio, L. M., Dalurzo, H., Gómez, C., Romero-Puertas, M. C., Del Río, L. A.: Cadmium induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Oxford Journals*, 2001, 52: 2115 - 2126.
- /10/ Cho, U.H., Seo, N.H.: Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science*, 2004, 168: 113 – 120.
- /11/ Grene, R.: Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. *Arabidopsis Book*. 2002, 1, e0036.
- /12/ Lin, A.I., Zhang, X.H., Chen, M.M., Cao, Q.: Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19: 596 – 602.

#### Pod'akovanie

Práca vznikla za finančnej podpory projektov VEGA 1/0061/15 a UGA VIII/31/2015.

## ŠTRUKTÚRNA A FYZIOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA EMBRYOGÉNNÝCH PLETÍV HYBRIDNÝCH JEDLÍ PO OVPLYVNENÍ IÓNNI KADMIA

### **STRUCTURAL AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERISATION OF HYBRID FIR EMBRYOGENIC TISSUES AFTER THE INFLUENCE OF CADMIUM IONS**

Martin Cárach<sup>1</sup>, Radoslava Matúšová<sup>1</sup>, Pavol Labun<sup>2</sup>, Terézia Salaj<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, 95007 Nitra, Slovenská republika

<sup>2</sup> Katedra ekológie, Fakulta humanitných a prírodných vied Prešovská univerzita v Prešove, 17. novembra 01, 081 16 Prešov, Slovenská republika

#### **Summary**

The effect of cadmium ions on the growth, somatic embryo structure as well as on the activity of enzymes chitinases as well as glucanases has been studied. The growth of tissues has been inhibited mostly after longer influence of cadmium ions. Similarly the bipolar organisation of somatic embryos has been disintegrated at the same time. No special isoforms of chitinases glucanases have been detected as a result of cadmium ions effect.

*Key words: somatic embryogenesis, heavy metal stress, Abies alba x A. cephalonica, Abies alba x A. numidica*

#### **Súhrn**

Práca prináša výsledky štúdia iónov kadmia na fyziologické a štruktúrne charakteristiky embryogénnych pletív hybridných jedlí. Po dlhšom pôsobení iónov kadmia rast pletív bol inhibovaný a bipolárna štruktúra somatických embryí bola silne narušená. Nedetegovali sa žiadne špecifické izoformy enzýmov chitináz a glukánáz.

*Kľúčové slová: somatická embryogenéza, ťažké kovy, stres, Abies alba x A. cephalonica, Abies alba x A. numidica*

## **ÚVOD**

*In vitro* kultúry sú považované za cenný a vhodný nástroj na štúdium, testovanie a výber rastlinného materiálu tolerantného na stresové faktory. Ide najmä o dreviny, pre ktoré sú charakteristické dlhé reprodukčné cykly /3/. Kalusové kultúry predstavujú vhodný systém pre vyhodnotenie tolerancie na ťažké kovy a detoxikačné procesy s nimi spojené /1, 9/. *In vitro* kultúrami rastlinných buniek a pletív sa môžeme vyhnúť zložitej interakcie medzi rôznymi faktormi (nekontrolovateľné podmienky *in situ*), ktoré majú vplyv na biologickú dostupnosť ťažkého kovu v pôde, čo umožňuje lepšie štúdium účinkov konkrétneho kovu na rastliny v kontrolovateľných podmienkach *in vitro* /10/. Embryogénne pletivá ihličnatých drevín kultivované v podmienkach *in vitro* reprezentujú experimentálny systém vhodný na štúdium stresových faktorov. Dôležitou súčasťou embryogénnych pletív sú bipolárne somatické embryá, ktoré vo vhodných kultivačných podmienkach regenerujú celé rastliny (somatické semenáče) a vzhľadom na tento fakt, somatická embryogenéza je aj účinnou metódou *in vitro* vegetatívneho rozmnožovania ihličnatých drevín. Cieľom predloženej práce je charakteristika embryogénnych pletív hybridných jedlí po kultivácii v prítomnosti iónov kadmia.

## MATERIÁL A METODIKA

Na kultiváciu embryogénnych pletív hybridných jedlí (*Abies alba* x *A. cephalonica*, bunková línia AC78 a *Abies alba* x *A. numidica*, bunková línia AN72) sme použili médium DCR /5/ obohatené 1 mg.l<sup>-1</sup> BA (6-benzyladenín). Ióny kadmia sa inkorporovali do živného média vo forme Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> v koncentráciách 100 μM a 250 μM. Rast pletív sme vyhodnotili ako akumuláciu čerstvej a suchej hmoty. Štruktúru somatických embryí sme pozorovali pomocou svetelnej a fluorescenčnej mikroskopie. Aktivitu chitináz a glukonáz sme sledovali rozdelením celkových proteínov pomocou SDS-PAGE a následnou detekciou enzýmových aktivít v géloch použitím špecifických substrátov pre glukonázy a chitinázy.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Embryogénne pletivá oboch línií, ktoré rástli na médiu bez iónov kadmia počas celého obdobia kultivácie (20 dní) boli bielej farby a nevykazovali žiadne symptómy nekróz alebo iného druhu poškodenia. Vplyv iónov kadmia v závislosti od použitej koncentrácie sa prejavil pri oboch líniách a bol výrazný najmä na 20. deň kultivácie. Na povrchu kultúr sa objavili výrazné nekrotické škvrny a bol potlačený rast pletív. Nepriaznivý vplyv kadmia sa prejavil aj na akumulácii čerstvej hmoty a sušiny, najmä pri líni AN72. Pri tejto línií prírastky čerstvej hmotnosti na 20. deň kultivácii dosahovali hodnotu 2,95 g, kým pri koncentrácii 250 μM Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> v médiu iba 2,07 g, čo predstavuje štatisticky preukazný rozdiel. Podobne výrazný rozdiel v akumulácii sušiny medzi kontrolnými pletivami a ošetrovanými iónmi kadmia (250 μM) sme zistili na 20. deň kultivácie. Somatické embryá hybridných jedlí rastúcich na kontrolnom médiu sú bipolárne útvary zložené z embryonálnej časti, ktorú tvoria meristemické bunky. K embryonálnej časti je pripojený suspenzor zložený zo silne predĺžených vakuolizovaných buniek. Táto bipolarita bola silne narušená vplyvom iónov kadmia.

Na začiatku rastu pletív (0. deň) pri pozorovaní aktivity glukonáz sme detegovali pri líni AN 72 minimálne 1 izofornu glukonázy. Táto izoforna bola veľká ~25 kDa až ~32 kDa. Rovnako veľkú izofornu sme zistili aj pri líni AC 78. Z chitináz sme zistili niekoľko izoforiem v oboch líniách :najmenšia izoforna mala veľkosť ~14 kDa. Na 10. deň kultivácie boli vo všetkých analyzovaných pletivách detekovateľné minimálne 3 izoforny chitináz (línia AN72), ale pri porovnaní všetkých pokusných médií sme nezistili žiadnu zmenu v počte izoforiem, ale iba v ich intenzite zobrazenia. Pri líni AC78 sme detegovali minimálne 4 izoforny chitináz, ale podobne ako pri AN 72 v rámci pokusných médií sme nezistili zmenu v počte izoforiem. Na 20. deň kultivácie pri líni AN72 sme na pokusných médiách zaznamenali minimálne 3 izoforny chitináz a pri líni AC78 4 izoforny chitináz, ale podobne ako na 10. rastového cyklu zmeny v počte izoforiem na rôznych médiách sme nepozorovali. Podobný jav sme pozorovali pri analýze glukonáz na kontrolnom médiu a na médiu s obsahom iónov kadmia pri oboch líniách. Počas rastového cyklu pletív sa detegovali rôzne izoforny, ale v ich počte sme nepozorovali rozdiely medzi pletivami rastúcimi na kontrolnom médiu a na médiu kde boli prítomné ióny kadmia.

Odpovede živých organizmov na účinky iónov rôznych ťažkých kovov sú veľmi variabilné. Dôležitá je koncentrácia kovu, dĺžka exponovania a v neposlednom rade aj druh organizmu, na ktorý ťažký kov pôsobí /7/. V podmienkach *in vitro* dochádza k spomaľovaniu rastových procesov a po dlhšom pôsobení kovu aj k odumieraniu pletív /4, 6/. Výsledky, ktoré sme získali pri štúdiu embryogénnych pletív línie AN72 ukázali, že ióny kadmia majú nepriaznivý účinok na ich rast , ktorý sa prejaví najmä na konci rastového cyklu (20. deň kultivácie) potlačením akumulácie čerstvej hmoty a sušiny. Štruktúrna dezintegrácia somatických embryí je tiež ukazovateľom pôsobenia stresového faktora. Na druhej strane biochemické ukazovatele (aktivita chitináz a glukonáz) nepreukázali zmenu v expresii detekovaných izoforiem glukonáz a chitináz vplyvom stresového faktora – zvýšenej koncentrácie kadmiových iónov v rastových médiách. Napriek tomu, že sme detegovali rôzny počet izoforiem glukonáz a chitináz v pletivách počas kultivácie, medzi kontrolnými a stresovanými pletivami sme nezistili rozdiely. Oproti tomu intaktné rastliny



niektorých druhov kultúrnych plodín reagovali na pôsobenie iónov ťažkých kovov rozdielnou aktivitou 2-3 izoforiem chitináz v koreňoch klíčiacych rastlín, nedetekovaných v neovplyvnených rastlinách /2/.

#### LITERATÚRA

- /1/ Azevedo, H., Pinto C.G.C., Fernandes, J., Loureiro, S., Santos, C.: Cadmium Effects on Sunflower Growth and Photosynthesis, *Journal of Plant Nutrition*, 28, 2005: 2211-2222
- /2/ Békésiová, B., Hraska, S., Libantova, J., Moravcikova, J., Matusikova, I.: Heavy metal stress induced accumulation of chitinase isoforms in plants, *Molecular Biology Reports*, 35, 2008: 579-588.
- /3/ Confalonieri, M., Balestrazzi, A., Bisoffi, S., Carbonera, D.: *In vitro* culture and genetic engineering of *Populus* spp.: synergy for forest tree improvement, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 72, 2003: 109–138.
- /4/ Fornazier, R., F., Ferreira, R.R., Pereira, G.J.G., Molina, S.M.G., Smith, R.J., Lea, P.J., Azevedo, R.A.: Cadmium stress in sugar cane callus cultures: effect on antioxidant enzymes, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 75, 2002: 125–131
- /5/ Gupta, P. K., Durzan, D. J.: Shoot multiplication from mature trees of Douglas fir (*Pseudotsuga menziessi*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*), *Plant Cell Reports*, 4, 1985: 77-179.
- /6/ Liu, C. P., Shen, Z. G., Li, X. D. 2007. Accumulation and detoxification of cadmium in *Brassica pekinensis* and *B. chinensis*, *Biologia Plantarum*, 51, 2007: 116–120
- /7/ Masarovičová, E., Kráľová, K.: Plant-Heavy Metal Interaction: Phytoremediation, Biofortification and nanoparticles. In: *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*. 2012: 75-102
- /8/ Pan, S. Q., Ye, X. S., Kuc, J.: A technique for detection of chitinase,  $\beta$ -1,3 glucanase and protein patterns after a single separation using polyacrylamide gel electrophoresis or isoelectrofocusing, *Phytopathology*, 81, 1991: 970 - 974
- /9/ Shekhawat, G.S., Verma, K., Jana, S., Singh, K., Teotia, P., Prasad, A.: *In vitro* biochemical evaluation of cadmium tolerance mechanism in callus and seedlings of *Brassica juncea*, *Protoplasma*, 239, 2010: 31–38
- /10/ Thangavel, P., Long, S., Minocha, R: Changes in phytochelatin and their biosynthetic intermediates in red spruce (*Picea rubens* Sarg.) cell suspension cultures under cadmium and zinc stress, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 88, 2007: 201–216

#### Pod'akovanie

Práca vznikla s finančnou podporou agentúry VEGA, projekt 2/0136/14.

## VLIV KADMIA NA DIFERENCIACI APOPLASTICKÝCH BARIÉR V KOŘENI

### *INFLUENCE OF CADMIUM ON DIFFERENTIATION OF APOPLASTIC BARRIERS IN LATERAL ROOTS*

Zuzana Blascheová, Edita Tylová, Eva Pecková, Aleš Soukup  
Katedra experimentální biologie rostlin, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Viničná 5,  
128 44, Praha 2, Česká republika

#### *Summary*

The important part of root system is not only primary root, but also fine lateral roots. They form the major part of root absorptive surface and influence plant stress tolerance (towards e.g. toxic elements). Root apoplastic barriers (endodermis and exodermis) regulate plant solute uptake (nutrient uptake, entrance of pollutants). But the information about apoplastic barriers in lateral roots is limited. Our study brings the first systematic insight into variation of barriers establishment in lateral roots in response to cadmium toxicity. It shows the important role of lateral roots in the maintenance of plant internal environment.

*Key words: Zea mays L.; lateral roots; exodermis; endodermis; apoplastic barriers; stress; permeability*

#### *Souhrn*

Postranní kořeny jsou důležitou součástí kořenového systému. Proto hrají velkou roli při příjmu látek do rostliny. Přesto zatím vývoji jejich apoplastických bariér, endodermis a exodermis, nebyla věnována dostatečná pozornost. Součástí komplexní anatomické studie bylo i studium vlivu Cd na postranní kořeny kukuřice *Zea mays L.*

*Klíčová slova: Zea mays L.; kukuřice; postranní kořeny; exodermis; endodermis; apoplastické bariéry; stres; permeabilita*

## ÚVOD

Pro život rostliny je důležitá rovnováha vnitřního prostředí, jež je zajištěna mimo jiné i selektivním příjmem látek. Přítomnost apoplastických bariér v kořeni je jedním z faktorů, které se spolupodílejí na schopnosti rostliny příjem látek regulovat, neboť zamezují nekontrolovatelnému transportu apoplastem. Téměř vše, co je dosud známo o apoplastických bariérách a jejich vývojové plasticitě, se týká výhradně hlavního kořene. Ovšem postranní kořeny tvoří významnou část kořenového systému, jenž se podílí na absorpci látek. Proto se jeví jako nezbytné prozkoumat i tuto součást kořenového systému.

## MATERIÁL A METODA

Rostliny *Zea mays L.* cv. Cefran (Oseva Bzenec, Česká republika) byly kultivovány v hydroponii v plastových nádobách o objemu 12l. V každé nádobě bylo umístěno 6 rostlin. V kultivační místnosti byly nastaveny konstantní podmínky: 16/8 denní/noční režim (ozáření 435 W.m<sup>-2</sup>), 22/18 denní/noční termoperioda. Ke kultivaci byl použit Hoaglandův roztok o ¼ síle s následujícím složením (μM): NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 3750; PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 254; Ca<sup>2+</sup> 1249; K<sup>+</sup> 1501; Mg<sup>2+</sup> 510; SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 510; BO<sub>3</sub><sup>3-</sup> 11.6; Fe<sup>2+</sup> 5.1; Mn<sup>2+</sup> 2.3; Zn<sup>2+</sup> 0.34; Cu<sup>2+</sup> 0.12; Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub><sup>2-</sup> 0.015. V plastových nádobách byly rostliny pěstovány za různých podmínek (Tab. 1).

Tab. 1 Podmínky kultivací

Zkratka	Podmínky pěstování
AER	Provozdušňovaná hydroponie; saturace kyslíkem > 90%
AER+5Cd	Provozdušňovaná hydroponie + 5 $\mu\text{M}$ $\text{Cd}^{2+}$
AER+50Cd	Provozdušňovaná hydroponie + 50 $\mu\text{M}$ $\text{Cd}^{2+}$

Větvení kořenů bylo analyzováno u primárních kořenů 18 dní starých rostlin pomocí programu Smart Root a NIS elements. Pro zachycení variability vývoje hlavního kořene a kořenů postranních jsme prováděli anatomickou analýzu v několika různých pozicích. Zkoumané pozice kořenů byly HK (hlavní kořen, ve  $\frac{3}{4}$  délky kořene od špičky), PK-D (dlouhé větvené postranní kořeny 1. řádu nacházející se na bázi hlavního kořene), PK-S (středně dlouhé větvené postranní kořeny nacházející se ve  $\frac{3}{4}$  hlavního kořene), PK-K (krátké nevětvené postranní kořeny nacházející se v  $\frac{1}{2}$  hlavního kořene). Kořeny jsme zafixovali v 4 % formaldehydu ve fosfátovém pufru. Řezy kořenů z daných pozic jsme barvili Sudanem red 7B (0,01%w/v, 1h) nebo berberin hemisulfátem (0,1% aq; 1h) a genciánovou violetí (0.05% aq.; 10 min) pro detekci jednotlivých stádií vývoje bariér (Casparyho proužků (CP) a suberinových lamel). Pro elektronovou mikroskopii (TEM) jsme kořeny fixovali v glutaraldehydu v kakodylátovém pufru, post-fixovali oxidem osmičelým a zalili do pryskyřice (LR White).

Pomocí apoplastické sondy, kyseliny jodisté ( $\text{H}_5\text{IO}_6$ ), jsme dále zkoumali propustnost apoplastu povrchových vrstev kořenů. Ta byla vyhodnocována jako vzdálenost průniku kyseliny jodisté do kořene po ponoření intaktních rostlin do roztoku 0.1%  $\text{H}_5\text{IO}_6$  po dobu 30 minut a následnou detekcí Schiffovým činidlem /5/.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

### Morfologie kořenů

Dle vzezření kořenových systémů rostlin z jednotlivých kultivací (AER; AER+5Cd; AER+50Cd) bylo na první pohled jasné, že přítomnost Cd ovlivnila jejich růst a morfologii. Průměrná délka hlavního kořene byla největší u kontrolních rostlin a nejmenší u rostlin vystavených působení 50  $\mu\text{M}$  Cd. Dále měly kořeny vystavené působení Cd méně postranních kořenů než kontrola a tyto kořeny byly v průměru kratší než u kontrolních rostlin. Vystavení tomuto stresovému faktoru tedy mělo za následek zkrácení délky hlavních i postranních kořenů. Postranní kořeny vystavené 50  $\mu\text{M}$  Cd byly v porovnání s ostatními kultivacemi tlustší.

### Diferenciace bariér

Porovnali jsme míru diferenciace bariér v endodermis a exodermis v jednotlivých pozicích u hlavního kořene a kořenů vedlejších vzhledem k tomu, v jakých podmínkách byly rostliny pěstovány. Endodermis se v postranních kořenech zakládá velmi blízko kořenové špičky /6/. Studie provedené na hlavních kořenech ukazují, že exodermální vrstva je daleko variabilnější v odpovědi na okolní podmínky. Ty její vývoj ovlivňují markantněji než vývoj endodermis. Pod vlivem stresových podmínek zpravidla dochází k urychlení diferenciace exodermální vrstvy /2, 3, 4, 7, 8/.

Stres v podobě vystavení rostlin působení Cd stimuloval diferenciaci apoplastických bariér v kořenech (Tab. 2), což je v souladu s předchozími studiemi /3/. Kořeny vystavené působení 5  $\mu\text{M}$  Cd vykazovaly průměrné zvětšení endodermálních CP o 33% a kořeny vystavené 50  $\mu\text{M}$  Cd dokonce o 70% oproti kořenům v kontrolních podmínkách. V exodermis kořenů z 5  $\mu\text{M}$  Cd došlo k urychlení jejich ukládání v delších postranních kořenech (PK-D), ale při 50  $\mu\text{M}$  Cd koncentraci již k posílení tohoto efektu nedošlo (Tab. 2). Namísto toho bylo v 50  $\mu\text{M}$  Cd pozorováno poškození vnitřní struktury kořene, především depozice extracelulárního materiálu v primární kůře a nepravidelné lignifikace buněčných stěn mimo endodermální a exodermální vrstvu, které byly časté především v krátkých postranních kořenech (Obr. 1). Reakce na působení Cd se tedy lišila mezi postranními kořeny různé délky.

V kořenech pod vlivem kadmia byla také posílena depozice sekundární buněčné stěny (vznik U-ztlustlin), které jsou považovány za terciární stádium vývoje endodermis. Tato terciární vrstva se v endodermis uložila v hlavním a nejdelších postranních kořenech (PK-D) u všech typů kultivací, při působení 50  $\mu\text{M}$  Cd byla ale výrazně silnější, což naznačuje její ochrannou funkci (Obr. 2). V kratších postranních kořenech (PK-S;PK-K) vystavených působení 50  $\mu\text{M}$  Cd se nacházela také, ale pouze nepravidelně, v ostatních variantách se téměř nevyskytovala.

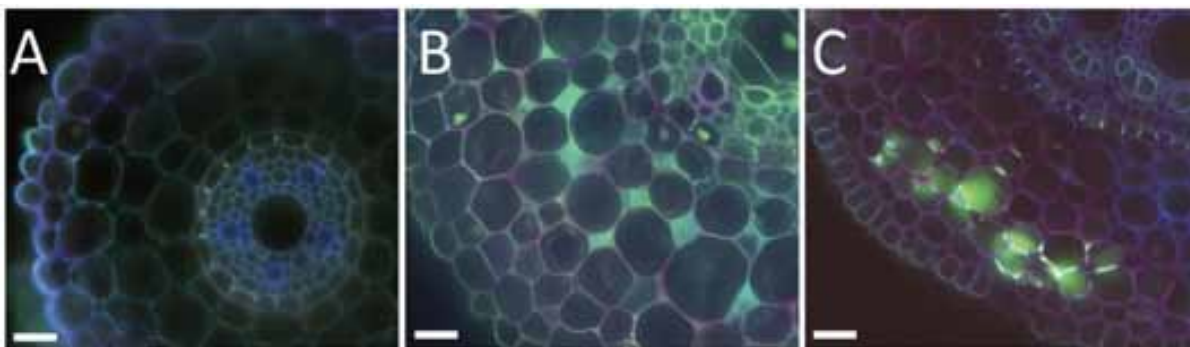
Tab. 2 Výskyt Casparyho proužků a suberinových lamel v exodermis/endodermis

	HK	PK-D	PK-S	PK-K	HK	PK-D	PK-S	PK-K
	<b>Endodermální CP</b>				<b>Exodermální CP</b>			
AER	IV	IV	IV	IV	IV	0-I	I	0
AER+5Cd	IV	IV	IV	IV	IV	II-III	0	0-I
AER+50Cd	IV	IV	IV	IV	IV	0	n.a.	0
	<b>Endodermální SL</b>				<b>Exodermální SL</b>			
AER	III-IV	III-IV	II-III	0-I	III-IV	II-III	I-II	0
AER+5Cd	IV	IV	III-IV	III-IV	IV	III-IV	0-I	0-I
AER+50Cd	IV	IV	n.a.	III-IV	IV	I	n.a.	0-I

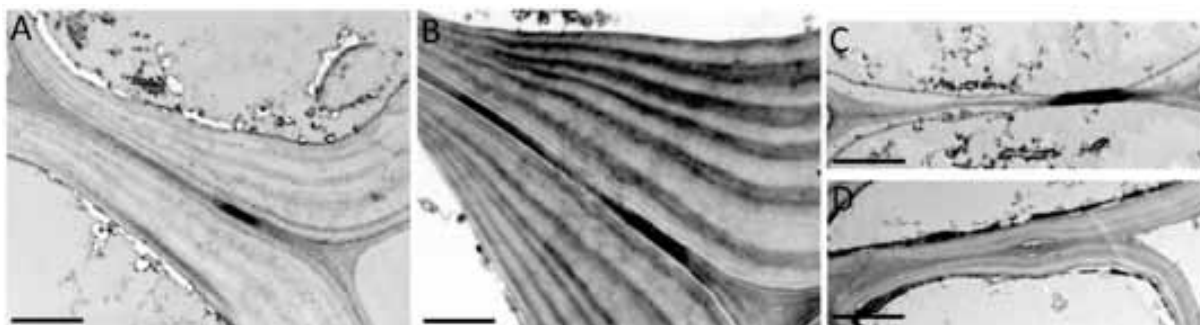
Rozsah diferenciace CP a SL vyjádřený jako kategorie popisující kontinuitu jejich výskytu v endodermální nebo exodermální vrstvě: 0 (žádné buňky se SL), I (<20% buněk se SL), II ( $\pm$ 50% buněk se SL), III (>90% buněk se SL), IV (všechny buňky se SL), stejné kategorie byly použity i pro CP. n.a. = nebyly vyvinuty

#### Propustnost apoplastu

Propustnost kořenů byla vyšší u krátkých postranních kořenů (PK-K), což se shodovalo s výsledky prací na jiných druzích pěstovaných v hydroponii /2, 9/. Nejvyšší propustnost mají místa, kde dochází k vnořování postranních kořenů nebo byly nějak narušeny povrchové vrstvy kořene. Vzdálenost, kam se sonda v kořeni dostala, byla o 20% nižší u rostlin z 5  $\mu\text{M}$  Cd v porovnání s 50  $\mu\text{M}$  Cd a kontrolou. Celkově se ale propustnost hlavní osy kořene a dlouhých postranních kořenů lišila jen velmi málo. Pravděpodobně na tom měla podíl značná variabilita ve vývoji samotné exodermální vrstvy, což se mohlo podepsat i na propustnosti /1/.



Obrázek 1: Uložení CP v nejkratších postranních kořenech (PK-K). Standardní uložení v kontrolní rostlině (A); nahromadění extracelulárního materiálu u kořene z 50  $\mu\text{M}$  Cd (B); lignifikace primární kůry podobná CP u kořene z 50  $\mu\text{M}$  Cd (C); měřítko = 20  $\mu\text{m}$ .



Obrázek 2: CP v endodermis zachycené pomocí TEM. Hlavní kořen kontroly (A) a vystavený 50  $\mu\text{M}$  Cd (B). Krátké postranní kořeny (PK-K) kontroly (C) a vystavené 50  $\mu\text{M}$  Cd (D); měřítko = 100 nm.

## LITERATURA

- /1/ Enstone DE, Peterson CA, Ma F.: Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation* 21, 2003: 335-351.
- /2/ Faiyue B, Al-Azzawi MJ, Flowers TJ. 2010. The role of lateral roots in bypass flow in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant, Cell & Environment* 33: 702-716.
- /3/ Lux A, Martinka M, Vaculik M, White PJ (2011) Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of experimental botany* 62: 21-3
- /4/ Meyer CJ, Seago JL, Jr., Peterson CA.: Environmental effects on the maturation of the endodermis and multiserial exodermis of *Iris germanica* roots. *Annals of Botany* 103, 2009: 687-702.
- /5/ Pearse A. *Histochemistry (theoretical and applied)*. London, UK: J. A. Churchill Ltd. 1968.
- /6/ Peterson CA, Lefcourt BE. 1990. Development of endodermal Casparian bands and xylem in lateral roots of broad bean. *Canadian Journal of Botany* 68: 2729-2735.
- /7/ Redjala T, Zelko I, Sterckeman T, Legué V, Lux A. 2011. Relationship between root structure and root cadmium uptake in maize. *Environmental and Experimental Botany* 71: 241-248.
- /8/ Reinhardt D, Rost T. 1995. Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots. *Environmental and Experimental Botany* 35: 563-574.
- /9/ Soukup A, Armstrong W, Schreiber L, Franke R, Votrubova O. 2007. Apoplastic barriers to radial oxygen loss and solute penetration: a chemical and functional comparison of the exodermis of two wetland species, *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *New Phytologist* 173: 264-278.

## Poděkování

Uvedená práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy – projekt LO1417 a projektu COST LD 11017.

## VPLYV KADMIA NA NIEKTORÉ BIOCHEMICKÉ A RASTOVÉ PARAMETRE HYDROPONICKY PESTOVANÝCH RASTLÍN ŠTYROCH KULTIVAROV REPKY OLEJKY

### *EFFECT OF CADMIUM ON SOME BIOCHEMICAL AND GROWTH PARAMETERS OF FOUR CULTIVARS OF RAPESEED PLANTS CULTIVATED IN HYDROPONICS*

Matúš Peško, Marianna Molnárová, Agáta Fargašová

Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina CH-2, SK-842 15 Bratislava, Slovenská republika; e-mail: pesko@fns.uniba.com

#### *Summary*

The response of rapeseed plants (*Brassica napus* L., cv. Atlantic, Baldur, Californium, Oponent a Verona) to stress induced by  $\text{CdCl}_2$  was investigated. The applied concentration of studied Cd compound was  $24 \mu\text{mol dm}^{-3}$ . The presence of  $\text{CdCl}_2$  in Hoagland solution resulted in reduced shoot and root dry mass of plants. The most significant decrease of dry mass was recorded for plants of cv. Californium (shoots) and cv. Atlantic (roots). Plants of cv. Californium and Oponent showed the most significant decrease of total chlorophyll content in leaves. At the applied concentration  $24 \mu\text{mol dm}^{-3}$   $\text{CdCl}_2$  the content of soluble proteins in leaves declined in following order: BAL>VER>OPO>ATL>CAL. Content of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in leaves was highest for plants of cv. Oponent (240% of control). Amount of Cd accumulated in roots was highest in case of cv. Californium. For shoots the highest accumulation of Cd was recorded for plants of cv. Atlantic. Translocation factor values were  $< 1$  and varied from 0,080 (VER) to 0,185 (ATL).

*Key words: accumulation, cadmium, chlorophyll, proteins, Brassica napus L., TBARS*

#### *Súhrn*

Hodnotila sa odpoveď rastlín repky olejky (*Brassica napus* L., cv. Atlantic, Baldur, Californium, Oponent a Verona) na stres spôsobený prítomnosťou  $24 \mu\text{mol dm}^{-3}$   $\text{CdCl}_2$  v kultivačnom roztoku. V dôsledku aplikácie zlúčeniny študovaného kovu dochádzalo k redukcii suchej hmotnosti rastlinných orgánov rastlín všetkých študovaných kultivarov. Najvyšší pokles obsahu celkového chlorofylu v listoch rastlín bol zaznamenaný pre kultivary Californium a Oponent. Obsah rozpustných proteínov v listoch rastlín jednotlivých kultivarov klesal v poradí BAL>VER>OPO>ATL>CAL. Obsah látok reagujúcich s kyselinou tiobarbiturovou (TBARS) v listoch rastlín kultivovaných v prítomnosti  $24 \mu\text{mol dm}^{-3}$   $\text{CdCl}_2$  bol najvyšší v prípade kultivaru Oponent (240% kontroly). Rastliny kultivaru Californium boli schopné akumulovať do koreňovej sústavy najvyššie množstvo kadmia. V prípade výhonkov bol najvyšší obsah Cd zistený pre kultivar Atlantic. Hodnoty translokačného faktora boli pre všetky kultivary  $< 1$  a pohybovali sa v rozsahu 0,080 (VER) to 0,185 (ATL).

*Kľúčové slová: akumulácia, kadmium, chlorofyl, proteíny, Brassica napus L., TBARS*

## ÚVOD

Kadmium (Cd) je neesenciálny kov a v koncentráciách presahujúcich  $5 - 10 \text{ mg Cd g}^{-1}$  s.h. je toxický pre väčšinu rastlinných druhov. Do životného prostredia sa dostáva predovšetkým z metalurgického priemyslu, spalín odpadu, chemických hnojív a odpadového kalu, ktorý sa často používa ako náhrada priemyselných hnojív. Napriek tomu, že Cd nepatrí do skupiny esenciálnych prvkov, rastliny ho prijímajú koreňovou sústavou a v relatívne vysokej miere translokujú do

nadzemných částí /1/. Kadmium ovplyvňuje mnoho fyziologických procesov, ktoré sú sprevádzané symptómami ako sú napr. inhibícia rastu, porušenie nutričnej rovnováhy, zníženie účinnosti fotosyntézy a chloróza /2/. Plazmatická membrána bunky je prvou prekážkou, ktorú musí ión kadmia prekonať. Peroxidácia lipidov membrány vedie k jej zvýšenej priepustnosti a vyplavovaniu dôležitých metabolitov z rastlinnej bunky, k oxidácii proteínov, inaktivácii membránových enzýmov a následne k poškodeniu membránovej integrity /3/.

## MATERIÁL A METÓDY

Na kultiváciu experimentálnych rastlín sa použili semená repky olejky, cv. Atlantic (ATL), Baldur (BAL), Californium (CAL), Oponent (OPO), Verona (VER) ktoré nám poskytol SCPV-VÚRV v Piešťanoch. Semená repky olejky sa nechali vyklíčiť v tme na filtračnom papieri v Petriho miskách a po troch dňoch sa premiestnili do Hoaglandovho roztoku, kde sa kultivovali ďalších 7 dní. Následne sa premiestnili do kultivačného roztoku s obsahom  $24 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{CdCl}_2$ . Po 5-dňovej kultivácii v kontrolovaných podmienkach (16 h svetlo/8 h tma; žiarenie:  $80 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PAR; priemerná teplota vzduchu:  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) sa stanovila suchá hmotnosť koreňov a výhonkov rastlín. Koncentrácia celkového chlorofylu v listoch rastlín sa po extrakcii 80 %-ým acetómom stanovila spektrofotometricky (Genesys 6, Thermo Scientific, U.S.A). Na stanovenie koncentrácie proteínov a TBARS sa použil homogenát pripravený z čerstvých listov. Metódy stanovenia uvedených biochemických ukazovateľov sú podrobne popísané v prácach /4, 5/. Obsah Cd v rastlinných orgánoch sa stanovil pomocou galvanostatickej rozpúšťacej chronopotenciometrie (EcaFlow 150 GLP, SK) metódou popísanou v práci /6/.

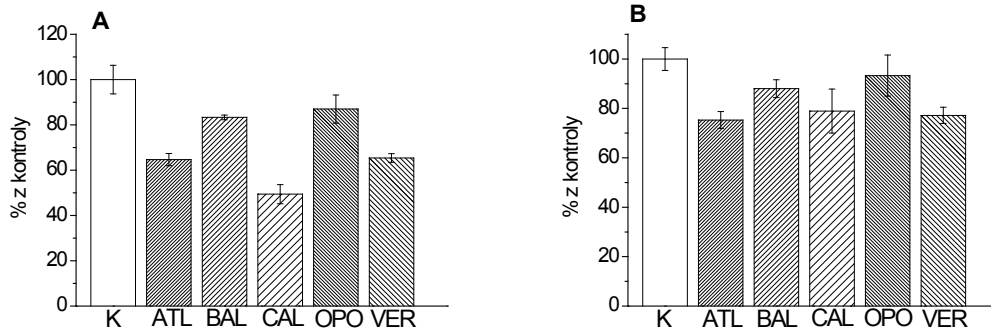
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

U 10-dňových rastlín repky olejky, ktoré sa pestovali hydroponicky v prítomnosti  $24 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{CdCl}_2$  po dobu 5 dní, sa objavila chloróza na listoch kultivarov Californium (CAL) a Oponent (OPO). Niektoré listy rastlín týchto dvoch kultivarov boli zvädnuté a mali zoschnuté okraje. Korene všetkých študovaných kultivarov boli v porovnaní s kontrolou mierne zhnednuté a subtílnejšie. Chloróza vzniká následkom nedostatku Fe a P alebo zníženým transportom Mn. Inhibícia  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -reduktázy koreňa kadmium spôsobuje nedostatok  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , čo vedie k vážnym poruchám fotosyntézy /7/. Inhibícia rastu v prítomnosti Cd je výsledkom priameho vplyvu na bunkové delenie a predlžovanie buniek. /8/.

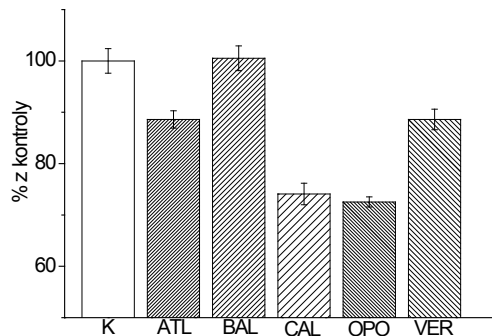
Porovnanie suchej hmotnosti výhonkov a koreňov rastlín jednotlivých kultivarov *B. napus* po 5-dňovej kultivácii v prítomnosti  $24 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{CdCl}_2$  je znázornené na obr. 1A a 1B. Suchá hmotnosť koreňov bola prítomnosťou Cd v živnom roztoku ovplyvnená v menšej miere ako suchá hmotnosť výhonkov. Suchá hmotnosť výhonkov jednotlivých kultivarov klesala v poradí OPO>BAL>VER=ATL>CAL, v prípade koreňov to bolo OPO>BAL>VER=ATL>CAL.

Úbytok fotosyntetických pigmentov je spojený vplyvom kadmia na ich bio-syntézu. Napríklad v rastlinách kukurice, jačmeňa, či pšenice Cd znižuje aktivitu reduktázy  $\delta$ -aminolevulínovej kyseliny, ako aj fotoaktivitu protochlorofylidu a protochlorofylid-oxidoreduktázy interakciou s -SH skupinami tohto enzýmu /9/.

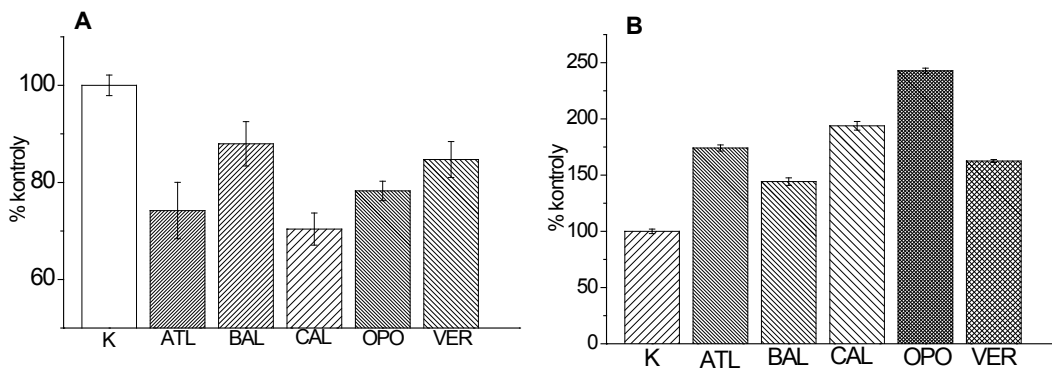
Porovnanie úbytku obsahu rozpustných proteínov v listoch rastlín jednotlivých kultivarov *B. napus* je znázornený na obr. 3A. Obsah rozpustných proteínov v listoch rastlín jednotlivých kultivarov klesal v poradí BAL>VER>OPO>ATL>CAL, pričom percentuálny pokles predstavoval ~12 % (BAL), ~15 % (VER), ~21 % (OPO), ~26 % (OPO), ~26 % (ATL) a ~30 % (CAL) v porovnaní s kontrolou. Toxicita kovov sa často prejavuje oxidačným stresom, ktorý je vyvolaný buď produkciou voľných radikálov, alebo inhibíciou aktivity enzýmov a neenzymatických antioxidantov. Reakcia ROS s proteínmi vedie k ich karbonylácii. Tieto produkty oxidácie sú následne degradované v procese proteolýzy /10/. Výrazný úbytok rozpustných proteínov v listoch rastlín *B. napus* pri aplikovanej koncentrácii  $10 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{Cd}$  pozorovali aj /11/.



Obr. 1: Porovnanie suchej hmotnosti výhonkov (A) a koreňov (B) rastlín piatich kultivarov repky olejky kultivovaných v prítomnosti  $24 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{CdCl}_2$ .



Obr. 2: Porovnanie obsahu celkového chlorofylu (A) v listoch rastlín piatich kultivarov repky olejky kultivovaných v prítomnosti  $24 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{CdCl}_2$ .



Obr. 3: Porovnanie obsahu rozpustných proteínov (A) a TBARS (B) v listoch rastlín piatich kultivarov repky olejky kultivovaných v prítomnosti  $24 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{CdCl}_2$ .

Malondialdehyd, patriaci do skupiny TBARS, je sekundárny koncový produkt oxidácie polyneenasýtených mastných kyselín a považuje sa za mieru peroxidácie lipidov. Akumulácia TBARS (obr. 3B) v listoch rastlín bola najvyššia v prípade kultivaru Oponent a predstavovala 2,4 násobok kontroly. Najnižšia hodnota, 1,4 násobok kontroly, sa zaznamenala pre kultivar Baldur. Anjum et al. /9/ pozorovali po aplikácii  $50 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  pôdy výrazné zvýšenie obsahu TBARS v listoch rastlín *Brassica campestris* L. a *Vigna radiata* L. Obsah TBARS predstavoval 1,6 (*B. campestris*) a 1,4 (*V. radiata*) násobok kontroly.

Obsah Cd v koreňoch rastlín jednotlivých kultivarov pestovaných v prítomnosti  $24 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{CdCl}_2$  klesal v poradí CAL>OPO>VER>BAL>ATL, v prípade výhonkov bolo toto poradie ATL>BAL>CAL>OPO>VER. Hodnoty translokačného faktora boli pre rastliny všetkých kultivarov <1 a pohybovali sa v rozsahu 0,080(VER)–0,185(ATL). Hodnoty bioakumulačného



faktora sa pre korene rastlín jednotlivých kultivarov pohybovali v rozsahu 1106(ATL)–3274(CAL), v prípade výhonkov to bolo v rozsahu 143(VER)–205(ATL).

#### LITERATÚRA

- /1/ Gallego, S.M., Pena, L.B., Barcia, R.A., Azpilicueta, C.E., Lannone, M.F., Rosales, E.P., Zawoznik, M.S, Groppa, M.D., Benavides, M.P.: Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. *Environ. Exp. Bot.*, 83, 2012: 33–46
- /2/ Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M.: Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012: 26
- /3/ Janicka-Russak, M., Kabala, K., Burzynski, M.: Different effect of cadmium and copper on H<sup>+</sup>-ATPase activity in plasma membrane vesicles from *Cucumis sativus* roots. *J. Exp. Bot.*, 63, 2012: 4133–4142
- /4/ Peško, M., Kráľová, K., Blaško, J.: Phytotoxic effects of trivalent chromium on rapeseed plants. *Fresen. Environ. Bull.*, 21(3), 2012: 761–768
- /5/ Kazemi, N., Khavari-Nejad, R.A., Fahimi, H., Saadtmand, S., Nejad-Sattari, T.: Effects of exogenous salicylic acid and nitric oxide on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in leaves of *Brassica napus* L. under nickel stress. *Sci. Hortic-Amsterdam*, 126, 2010: 402–407
- /6/ Molnárová, M, Fargašová, A.: Relationship between various physiological and biochemical parameters activated by cadmium in *Sinapis alba* L. and *Hordeum vulgare* L. *Ecol. Eng.*, 49, 2012: 65–72
- /7/ Alcantara, E., Romera, F.J., Cañete, M., De La Guardia, M.D.: Effect of heavy metals on both induction and function of root Fe(III) reductase in Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. *J. Exp. Bot.* 45, 1994: 1893–1898
- /8/ Kaznina, N.M. Titov, A.F.: The influence of cadmium on physiological processes and productivity of Poaceae plants. *Biol. Bull. Rev.*, 4(4), 2014: 335–348
- /9/ Anjum, N.A., Umar, S., Iqbal, M.: Assessment of cadmium accumulation, toxicity, and tolerance in Brassicaceae and Fabaceae plants-implications for phytoremediation *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 2014: 10286–10293
- /10/ Shringarpure R., Grune T., Mehlhase J., Davies K.J.A.: Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J. Biol. Chem.*, 278, 2003: 311–318
- /11/ Ehsan, S., Ali, S., Noureen, S., Mahmood, K., Farid, M., Ishaque, W., Shakoore, M.B., Rizwan, M.: Citric acid assisted phytoremediation of cadmium by *Brassica napus* L. *Ecotox. Environ. Safety*, 106, 2014: 164–172

#### Pod'akovanie

Túto prácu finančne podporili Vedecká grantová agentúra VEGA MŠVVaŠ SR a SAV, grant č. 1/0098/14.

**DISTINCT PHYTOTOXIC EFFECTS OF ZINC AND CADMIUM ON  
MEMBRANE ELECTRICAL POTENTIAL AND PHOTOELECTRIC  
REACTION OF LEAF EPIDERMAL CELLS OF HEAVY METAL  
INTOLERANT *ARABIDOPSIS THALIANA* AND TOLERANT  
*ARABIDOPSIS HALLERI***

**ODLIŠNÉ FYTOTOXICKÉ ÚČINKY ZINKU A KADMIA NA MEMBRÁNOVÝ ELEKTRICKÝ  
POTENCIÁL A FOTOELEKTRICKÉ REAKCIE EPIDERMÁLNYCH BUNIEK LISTOV  
*ARABIDOPSIS THALIANA* NETOLERANTNEJ RASTLINY VOČI ŤAŽKÝM KOVOM A  
TOLERANTNEJ RASTLINY *ARABIDOPSIS HALLERI***

Ján Pavlovkin<sup>1</sup>, Roderik Fiala<sup>1</sup>, Vladimír Repka<sup>1</sup>, Michal Martinka<sup>1,2</sup>, Milada Čiamporová<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Botany, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, SK-84523, Bratislava, Slovakia, vladimir.repka@savba.sk

<sup>2</sup> Department of Plant Physiology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská dolina B-2, SK-84215 Bratislava, Slovakia

**Summary**

Uptake of heavy metals (HMs) such as zinc (Zn) and cadmium (Cd) by plant leaf cells depends on electro-physiological parameters of the plasma membrane (PM). In this study, electric membrane potential ( $E_M$ ) and photoelectric responses of PM were analyzed in leaf epidermal cells where early HMs ion-induced stress reactions are localized. Two *Arabidopsis* species with diverse strategies of their adaptation to HMs were compared: sensitive *Arabidopsis thaliana* and tolerant *A. halleri*. Elevated Zn and Cd (0.01, 0.1 and 1 mM) concentrations in the culture medium induced rapid changes in  $E_M$ . The reaction was species and metal-specific and was concentration-dependent. *A. halleri* revealed a higher insensitivity of the PM. The results suggest a different mode and extent of early reaction to Zn and Cd in the tolerant and sensitive species of *Arabidopsis* indicating sensitivity of *A. thaliana* and a high tolerance of *A. halleri*. PM depolarization was significantly lower in the Zn and Cd hyperaccumulator *A. halleri* and higher in *A. thaliana*. This indicates that rapid membrane voltage changes are an excellent tool to monitor the effects of HMs.

*Key words: Arabidopsis, zinc, cadmium, leaf epidermal cells, membrane electrical potential, photoelectric reactions*

**Súhrn**

Príjem iónov ťažkých kovov (HMs), ako sú zinok (Zn) a kadmium (Cd) bunkami listov závisí od elektrofyziologických parametrov plazmalemy (PM). V tejto práci sa analyzovali elektrický membránový potenciál ( $E_M$ ) a fotoelektrické odpovede PM v epidermálnych bunkách listov, v ktorých sú lokalizované včasné stresové reakcie indukované iónmi HMs. Porovnávali sa dva druhy rodu *Arabidopsis* s rozdielnymi stratégiami adaptácie na HMs: citlivý *A. thaliana* a tolerantný *A. halleri*. Zvýšené koncentrácie Zn a Cd (0,01mM, 0,1 mM a 1 mM) v kultivačnom médiu indukovali rapídne zmeny  $E_M$ . Reakcia bola špecifická pre druh aj pre kov a závisela od koncentrácie kovu. *A. halleri* vykazovala nižšiu citlivosť PM. Výsledky poukazujú na rozdiely medzi tolerantným a citlivým druhom rodu *Arabidopsis* v spôsobe a rozsahu včasnej reakcie na Zn a Cd a svedčia o citlivosti *A. thaliana* a vysokej tolerancii *A. halleri*. Depolarizácia PM bola preukazne nižšia pri *A. halleri*, ktorý je Zn a Cd hyperakumulátor a vyššia pri druhu *A. thaliana*. Výsledky naznačujú, že rýchle zmeny membránového potenciálu sú excelentný prostriedok na monitorovanie účinkov HMs.

*Klíčové slová: Arabidopsis, zinok, kadmium, mezofylové bunky listov, elektrický membránový potenciál, fotoelektrické reakcie*

## INTRODUCTION

Zinc (Zn) and cadmium (Cd) are transition metals naturally found at trace concentrations in most soils. There is no evidence for Cd acting as a mineral nutrient /6/, whereas Zn is an essential micronutrient required for optimal plant growth and development. In plant cells Zn is involved in the regulation of many metabolic processes, and also plays important roles in structure and functionality of transcription factors, enzymes and membranes /1/. Though beneficial (Zn) or harmless (Cd) at low concentrations, both elements induce phytotoxic effects at concentrations higher than the tolerance threshold of various plant species, since they are taken up through metal transporters with low specificity. Many physiological processes are impaired by Cd and by excess Zn resulting not only in common but also in specific symptoms of metal toxicity.

Understanding the mechanisms of uptake of toxic heavy metals (HMs) by plants is of importance as heavy metal accumulation in crop is the principle route of toxic metal entry into the human food-chain. Previous work with maize and *Arabidopsis* in our laboratory was focused on the effects of Cd and Zn on membranes of root cells, being the first point of contact of ions with the plant body. Our results showed that their effects on membrane electrical potential ( $E_M$ ) were different /2, 3/.

Here we have studied two species of *Arabidopsis*: the heavy metal intolerant *A. thaliana*, and *A. halleri*, known to be tolerant to high concentrations of HMs ions like Cd and Zn and to hyperaccumulate these to high levels. As an initial input into the study of the mechanisms of HMs uptake in plants, we have tested the effects of Zn and Cd on electrical membrane potential differences ( $E_M$ ) and photoelectric reaction in leaf epidermal cell of the two *Arabidopsis* species. Our hypothesis is that differences in Zn and Cd ion transport between these species should be evident in the  $E_M$  characteristics that ultimately drive the ion uptake.

## MATERIAL AND METHOD

For our study, seeds of *Arabidopsis thaliana* Columbia wild-type and the seeds of *A. halleri* [*Cardaminopsis halleri* (L.) Hayek] subsp. *tatica* originating from natural metallicolous population growing on heavily Cu, Zn and Cd polluted soil in East Slovakia (Krompachy 48°55'04-07''N, 20°53'24-29'' E, 420 m a.s.l.) were used. Both plants were grown on soil for 21 days. Segments (1 x 3 mm) of the first leaves were cut out with razor blade avoiding the midrib and large veins.

Before the experiments the leaf segments were incubated in basic solution containing 1 mM KCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 0.25 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 5.5 for 2 h. After this period single leaf segments were transferred in to a perfusion Plexiglas chamber, which was mounted on a vertically placed microscope stage. The standard microelectrode technique was used for  $E_M$  measurements, as previously described /4/. The microelectrodes were inserted into adaxial epidermal cells, under microscope by the use of micromanipulator. After stabilization of  $E_M$  (<30 min) the external medium was changed for a new one, of the same salt composition, in addition containing ZnCl<sub>2</sub> or CdCl<sub>2</sub> at the final concentrations 1.0, 0.1 and 0.01mM. In short-term experiment the  $E_M$  in the presence of metals was measured continuously within 120 min. The effects of the metals on light-induced electrical reaction (photoelectric reaction) were tested in leaf epidermal cells after 12 h treatments with 0.01, 0.1, and 1.0 mM Zn or Cd concentrations for 12 h. In this case, the visible light (60 W.m<sup>-2</sup>) was switched on.

## RESULTS AND DISCUSSION

The presence of high, toxic concentrations of Zn and Cd in the culture medium provoke defense and adaptation responses of plants. The  $E_M$  of epidermal cells, before being exposed to Zn

and Cd was  $-153 \pm 8.9$  mV (means  $\pm$  SD,  $n = 12$ ) and  $-156 \pm 9.1$  mV (means  $\pm$  SD,  $n = 12$ ) in *A. thaliana* and *A. halleri*, respectively.

In the short-term experiments HMs induced immediate changes of  $E_M$  of the leaf epidermal cells (Fig. 1). Both Zn and Cd, at the concentration 1.0 mM caused an immediate depolarization of  $E_M$ , value of which was significantly higher for Cd: by  $71 \pm 5$  mV, (means  $\pm$  SD,  $n = 5$ ) in *A. thaliana* and by  $46 \pm 5$  mV, (means  $\pm$  SD,  $n = 6$ ) in *A. halleri* than for Zn: by  $29 \pm 3$  mV (means  $\pm$  SD,  $n = 7$ ) in *A. thaliana* and  $25 \pm 3$  mV, (means  $\pm$  SD,  $n = 7$ ) in *A. halleri*. The treatment with Cd at 0.1 mM caused depolarization of  $E_M$  by  $50 \pm 4$  mV (means  $\pm$  SE,  $n = 8$ ) whereas Cd at 0.01 mM did not change the  $E_M$  (Fig. 1). Zn, in contrast to Cd, applied at 0.01 mM and 0.1 mM concentrations brought about membrane hyperpolarization by  $6 \pm 2$  mV (means  $\pm$  SE,  $n = 8$ ) and  $16 \pm 4$  mV (means  $\pm$  SD,  $n = 8$ ) in *A. thaliana* and *A. halleri* respectively, or a very low transient depolarization (1 to 3 mV).

These data show that Cd and Zn at 1.0 mM caused depolarization of the  $E_M$ , whereas both metals at lower concentrations changed the  $E_M$  differently. Zn at 0.1 mM and 0.01 mM hyperpolarized the  $E_M$ , whereas Cd at the same concentrations depolarized and did not change the  $E_M$ , respectively (Fig. 1). Similar results were also obtained in our previous study /2, 3/ performed with cortical cells of maize roots and *Arabidopsis* species, which were treated with Zn and Cd. We have suggested that the effect of Cd on  $E_M$  of epidermal cells might be, at least in part, caused via the reduced PM  $H^+$ -ATPase activity. Taking into account that Cd is more easily taken up into the cells than Zn it could be suggested that Zn only at high concentration (1.0 mM) caused depolarization, while Cd ions did this at lower concentrations (0.1 mM).

The kinetics of light-induced membrane potential changes in leaf epidermal cells incubated in the presence of Zn or Cd for 12 h in the dark was also investigated. We have shown that the exposure of the cells to visible light (medium without metals) caused a transient depolarization of  $E_M$  after which a delayed hyperpolarization of  $E_M$  by  $25.7 \pm 3.9$  mV (means  $\pm$  SD,  $n = 5$ ) in *A. thaliana* and  $26.1 \pm 3.5$  mV (means  $\pm$  SD,  $n = 9$ ) in *A. halleri* occurred. In the presence of Zn or Cd the photoelectric reaction (the light-induced membrane hyperpolarization) of epidermal cells changed in both *Arabidopsis* species differently. The hyperpolarization at 0.01, and 0.1 Zn was higher by  $10 \pm 2$  mV (means  $\pm$  SD,  $n = 8$ ) in *A. thaliana* and by  $18 \pm 4$  mV (means  $\pm$  SD,  $n = 6$ ) in *A. halleri* as compared to the control, whereas Cd at the 0.01 mM concentration as well as Zn at 0.1 mM did not change the light-induced membrane hyperpolarization in *A. thaliana* and *A. halleri*. However in the presence of 0.1 mM Cd and 1.0 mM Zn the light-induced hyperpolarization of  $E_M$  was reduced by about 30 % and was 1.5-fold lower in *A. thaliana* as compared to the control or to that in *A. halleri*. Interestingly, Cd at the highest concentration (1.0 mM) totally abolished the photoelectric reaction of the light-induced hyperpolarization in *A. thaliana* cells and only insignificantly decreased the hyperpolarization in *A. halleri*.

It has already been demonstrated that the  $E_M$  of higher plant cells is very sensitive to light/dark and dark/light transitions. In photosynthesizing higher plant cells, the light can rapidly modulate the PM  $H^+$ -ATPase activity and voltage-dependent ion channels. The typical light-induced reaction consists of a quick initial depolarization of the  $E_M$ , followed by a slow membrane repolarization which very often resulted in plasma membrane hyperpolarization /5/. Similar to the above cited author we have shown that the exposure of the *Arabidopsis* cells to visible light caused a transient depolarization of  $E_M$  after which a delayed hyperpolarization of  $E_M$  was observed. Several authors have suggested that  $Ca^{2+}$  could be a potent depolarizing ion, which enters cytosol and can stimulate the PM  $H^+$ -ATPase activity, resulting in an increase of  $H^+$  efflux /5/. The data presented in this paper clearly show that the Cd ions are much more effective than Zn ions, in altering the light-induced membrane hyperpolarization. This effect is probably connected with the fact that  $Cd^{2+}$  ions, which are taken up by cells more easily than Zn, alter the membrane permeability, especially for Ca and K ions. Furthermore, it is also possible that the inhibitory effect of Cd on photoelectric reactions were related to inhibition of photosynthesis (PS II) by this metal.

Taken together, these results suggest that at high Zn and Cd concentrations both depolarization of the  $E_M$  and decrease of light-induced membrane hyperpolarization in *A. thaliana* and *A. halleri* cells are probably due to inhibition of the PM  $H^+$ -ATPase activity, whereas both metals at lower concentrations differ in the mechanism of membrane potential changes. On the other hand the results indicate a similar mode of early reaction to Zn and Cd, but with different extent in tolerant and sensitive species of *Arabidopsis*. The sensitivity of *A. thaliana* and a high tolerance of *A. halleri* were demonstrated. Plasma membrane depolarization was lowest in the Zn and Cd hyperaccumulator *A. halleri* and higher in *A. thaliana*. This indicates that rapid membrane voltage changes are an excellent tool to monitor the effects of heavy metals.

#### REFERENCES

- /1/ Broadley, M. R., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I., Lux, A.: Zinc in plants. *New Phytologist*, 173, 2007: 677 – 702.
- /2/ Fiala, R., Luxová, M., Čiamporová, M., Repka, V., Martinka, M., Pavlovkin J.: Dissimilar responses of membrane potential ( $E_M$ ), permeability properties and respiration to cadmium and nickel in maize root cells. *Cereal Research Communications*, 41, 2015: 52 – 60.
- /3/ Kenderešová, L., Staňová, A., Pavlovkin, J., Ďurišová, E., Nadubinská, M., Čiamporová, M., Ovečka, M.: Early  $Zn^{2+}$ -induced effects on membrane potentials account for primary, unspecific demonstration of heavy metal susceptibility level in tolerant and sensitive *Arabidopsis* species. *Annals of Botany*, 110, 445 – 449.
- /4/ Pavlovkin, J., Novacky, A., Ullrich-Eberius, C.-I.: Membrane potential changes during bacteria-induced hypersensitive reaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 28, 1986: 125 – 135.
- /5/ Shabala, S., Newman, I.: Light-induced changes in hydrogen, calcium, potassium, and chloride ion fluxes and concentrations from the mesophyll and epidermal tissues of bean leaves. Understanding the ionic basis of light-induced bioelectrogenesis. *Plant Physiology*, 119, 1999:1115 – 1124.
- /6/ Tran, T.A., Popova, L.P.: Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. *Turkish Journal of Botany*, 37, 2013: 1 – 13.

#### Acknowledgement

This research was supported by Slovak Grant Agency VEGA, grant 02/0023/13.

## MICROARRAY EXPRESSION PROFILING OF CULTIVAR SPECIFIC RESPONSES IN MAIZE ROOT EXPLANTS TREATED WITH CADMIUM AND NICKEL

### "MICROARRAY EXPRESSION" PROFILOVANIE KULTIVAR-ŠPECIFICKÝCH ODPOVEDÍ KOREŇOVÝCH EXPLANTÁTOV KUKURICE OVPLYVNENÝCH KADMIOM A NIKLOM

Vladimír Repka<sup>1</sup>, Roderik Fiala<sup>1</sup>, Michal Martinka<sup>1,2</sup>, Milada Čiamporová<sup>1</sup>, Ján Pavlovkin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Botany, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, SK-84523, Bratislava, Slovakia, vladimir.repka@savba.sk

<sup>2</sup> Department of Plant Physiology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská dolina B-2, SK-84215 Bratislava, Slovakia

#### Summary

Large-scale antibody microarray expression profiling (AbMEP) procedure was used to examine similarities and differences between two maize cultivars (Premia and Blitz) exposed to various concentrations of cadmium (Cd), nickel (Ni), as well as simultaneously both metals (Cd+Ni) for 0, 12 and 24 h. The protein extracts were used for the AbMEP procedure and Western blot analysis. Using the AbMEP approach, the timing, dynamics and regulation of the expression of 101 specific genes in untreated and HM-treated roots of maize cultivars were determined. The microarray results revealed 23, 15 and 10 up/down-regulated proteins in Cd, Ni and Cd+Ni treated roots in cv. Premia, respectively. In contrast, the microarray results of cv. Blitz revealed 15, 11 and 7 up/down-regulated proteins in Cd, Ni and Cd+Ni treated roots, respectively. Data obtained from the AbMEP array experiment were validated by Western blot analyses with more than 89% (the Pearson's correlation coefficient  $R_r = 0.78$ ) correlation between the two methods.

*Keywords: Zea mays L., root explants, heavy metals, proteomics, profiling, microarray*

#### Súhrn

V práci bol použitý postup veľkoformátového profilovania na báze protilátkových „microarrays“ (AbMEP) k preskúmaniu podobností a rozdielov medzi dvoma odrodami kukurice (Premia a Blitz) vystavených rôznym koncentráciám kadmia (Cd), niklu (Ni), ako aj oboch súčasne (Cd+Ni) po dobu 0, 12 a 24 h. Pomocou AbMEP sme stanovili dynamiku a reguláciu expresie 101 špecifických génov u kontrolných a ovplyvnených koreňov. Microarray analýza odhalila 23 (Cd), 15 (Ni) a 10 (Cd+Ni) up/down-regulovaných proteínov pri odrode Premia a 15 (Cd), 11 (Ni) a 7 (Cd+Ni) up-regulovaných/down-regulovaných proteínov pri odrode Blitz. Údaje získané z analýzy AbMEP boli overené pomocou Western blotu s viac ako 89% koreláciou medzi oboma metódami (Pearsonov korelačný koeficient  $R_r = 0,78$ ).

*Kľúčové slová: Zea mays L., koreňové explantáty, ťažké kovy, proteomika, profilovanie, microarray*

## INTRODUCTION

The biological effects of individual heavy metals (HM) are more or less known, but even though combinations HM are common in nature, their simultaneous effects still need to be thoroughly investigated. It is well known that metals in mixtures may act independently or interact to produce additive, synergistic, or antagonistic effects /1/. Our previous studies of Cd and Ni uptake, antioxidant status, membrane potentials and cell survival /2, 3, 4/ of two maize cultivars, Premia and Blitz, have revealed mostly synergistic interaction between these two metals and also better metal tolerance in cv. Premia.

However, little information is available in the field of plant proteomics related to Cd and Ni toxicity /5/. Antibody-based microarray expression profiling represents a powerful technology in the field of proteomics, in which protein abundance and/or alterations are measured /6/. To date, the protein microarray expression profiling has been strictly used to address specific problems in animal pathogenesis, cancer diagnosis, etc. However, no information has been reported for a commercial crop. In the present study we have optimized the method for printing protein microarrays with alternative signal detection (fluorescence vs. chemiluminescence). Next we have explored the use of these protein microarrays for the highly parallel quantization and function determination of specific proteins in response to Cd and Ni exposure/toxicity of the two maize cultivars, Premia and Blitz, differing in their susceptibility to these two metals.

## MATERIALS AND METHODS

Two Ukrainian maize hybrids, Premia FAO 190 and Blitz FAO 160 (hereinafter referred as Premia and Blitz) differing in environmental stress tolerance, yield and productivity were used. Preparation and treatment of plant material /4/, as well as protein extraction, microarray profiling, bioinformatics, and immunoblot analyses of the root proteins were performed as described previously /7/.

## RESULTS AND DISCUSSION

A set of 101 antibody/antigen pairs was divided into 10 functional families and assembled onto avidin-coated antibody microarrays incubated with total cell-free extracts prepared from water (control) or respective HM-treated roots. A coupled two-way clustering approach to protein microarray data analysis was performed (Figure 1).

Various patterns of HM-stimulated protein expression were obtained. As shown by cluster analysis (Figure 1), the exposure of maize roots to 100  $\mu\text{M}$  Cd, 100  $\mu\text{M}$  Ni, or 100  $\mu\text{M}$  Cd+Ni induced the accumulation/repression of some apoptosis-related/anti-apoptotic proteins, e.g. DAD1. DAD1 protein disappeared in the temperature-sensitive cells following a shift to the non-permissive temperature /8/, suggesting that a loss of DAD1 protein triggered the apoptosis. Thus, the HM-induced down-regulated expression of DAD1 in cv. Blitz may lead to the observed increased sensitivity to other HM stresses.

Depending on the type of HM and maize cultivar, other proteins showed to be HM-induced including those that encode PR-2, catalase, glutathione S-transferase, and HPRG functions. These microarray observations are in good correlation with our recent results, demonstrating attenuated ROS detoxification capacity in Cd-treated roots of maize /4/.

A number of potential regulators were also identified including putative transcription factors, post-translational modifiers, and coactivators of protein-protein interactions such as 14-3-3 proteins. From this point of view, it is possible that the observed differential expression of 14-3-3 proteins may reflect the reported cultivar and concentration-dependent sensitivity to the studied Cd and Ni stresses.

A cluster of a major interest consists of a group of proteins sharing a protein kinase (Erk1/2) or protein phosphatase activities. All of these expression patterns indicate that specific subsets of proteins have different regulatory responses to HM stimulation. Distinct MAPK pathways were activated with Cd in alfalfa /9/, rice /10/, *Arabidopsis* /11/ and tobacco /12/. These results collectively suggest that excess of HM may induce different signalling pathways in plant cells.

Overall, of the 48 proteins that exhibited HM regulation in cv. Premia, 23 retained twofold or more up/down-regulation by Cd, and 15 or 10 retained twofold or more up/down-regulation by Ni or Cd+Ni, respectively (Figure 2). In contrast, only 33 proteins exhibited HM regulation in cv. Blitz. In this cultivar, 15, 11 and 7 proteins retained twofold or more up/down-regulation by Cd, Ni or Cd+Ni, respectively (Figure 2).

To validate and extend the microarray data, expression profiles of eight functionally representative proteins were monitored by western blot analyses (Figure 3).

Our observations that different proteome profiles are expressed in response to HM stress may encourage new crop strategies to improve plant tolerance to HM and subsequent effective phytoremediation. Moreover, these findings provide an initial framework for future investigations of the role of the stress-induced proteins in the HM response pathways.

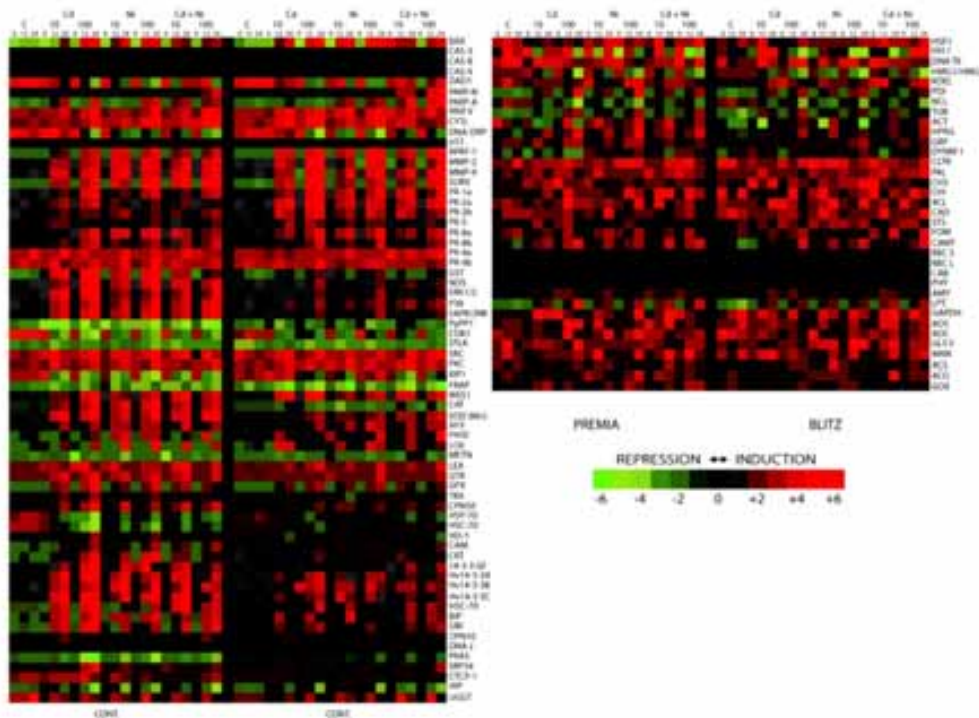


Figure 1. AbMEP of responses of maize cultivars to treatment with respective HMs.

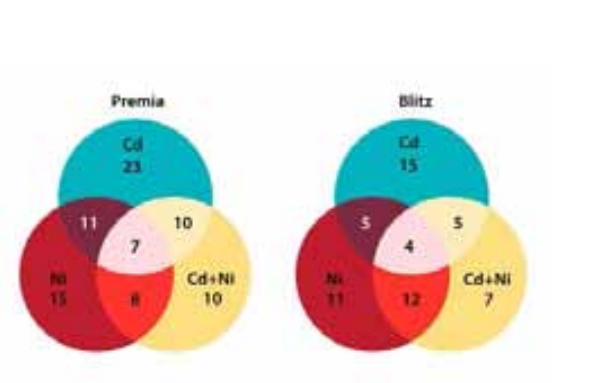


Figure 2. Interlocking diagram of the numbers of responsive proteins that show twofold or more up/down-regulation by HMs in maize cultivars. The numbers in overlapping area indicate the shared number of proteins in the respective HM treatments.

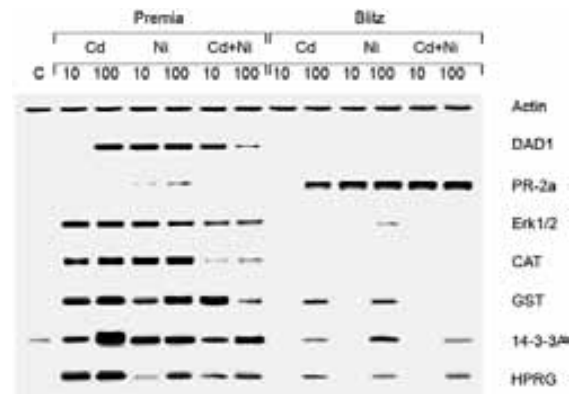


Figure 3. Western blot confirmation of microarray data of the eight candidate proteins under different HM regimes in the studied maize cultivars.



**REFERENCES**

- /1/ Wilde, K.L., Stauber, J.L., Markich, S.J., Franklin, N.M., Brown, P.L.: The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51, 2006: 174–185
- /2/ Artiushenko, T., Syschykov, D., Gryshko, V., Čiamporová, M., Fiala, R., Repka, V., Martinka, M., Pavlovkin, J.: Metal uptake, antioxidant status and membrane potential in maize roots exposed to cadmium and nickel. *Biologia*, 69, 2014: 1142–1147
- /3/ Fiala, R., Luxová, M., Čiamporová, M., Repka, V., Martinka, M., Pavlovkin, J.: Dissimilar responses of membrane potential ( $E_M$ ), permeability properties and respiration to cadmium and nickel in maize root cells. *Cereal Research Communications*, 43, 2015: 52–60
- /4/ Fiala, R., Repka, V., Čiamporová, M., Martinka, M., Pavlovkin, J.: The effect of cadmium-nickel interactions on superoxide production, cell viability and membrane potential ( $E_M$ ) in roots of two maize cultivars. *Acta Biologica Hungarica*, 66, no. 2, 2015: 192–204
- /5/ Villiers, F., Ducruix, C., Hugouvioux, V., Jarno, N., Ezan, E., Garin, J.: Investigating the plant response to cadmium exposure by proteomic and metabolomic approaches. *Proteomics*, 11, 2011: 1650–1663
- /6/ Haab, B.B., Dunham, M.J., Brown, P. O.: Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solution. *Genome Biology*, 2, 2001: 1–13
- /7/ Repka, V., Kubíková, J., Fischerová, I.: Immunodetection of PR-1-like proteins in grapevine leaves infected with *Oidium tuckeri* and in elicited suspension cell cultures. *Vitis*, 39, 2000: 123–127
- /8/ Nakashima, T., Sekiguchi, T., Kuraoka, A., Fukushima, K., Shibata, Y., Komiyama, S., Nishimoto, T.: Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DAD1, whose defect causes apoptotic cell death in hamster BHK21 cells. *Molecular Cell Biology*, 13, 1993: 6367–6374
- /9/ Jonak, C., Nakagami, H., Hirt, H.: Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiology*, 136, 2004: 3276–3283
- /10/ Yeh, C.M., Chien, P.S., Huang, H.J.: Distinct signalling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots. *Journal of Experimental Botany*, 58, 2007: 659–671
- /11/ Liu, X.M., Kim, K.E., Kim, K.C., Nguyen, X.C., Han, H.J., Jung, M.S., Kim, H.S., Kim, S.H., Park, H.C., Yun, D.J.: Cadmium activates *Arabidopsis* MPK3 and MPK6 via accumulation of reactive oxygen species. *Phytochemistry*, 71, 2010: 614–618
- /12/ Kulik, A., Anielska-Mazur, A., Bucholc, M., Koen, E., Szymanska, K., Żmienko, A., Krzywinska, E., Wawer, I., McLoughlin, F., Ruskowski, D., Figlerowicz, M., Testerink, C., Skłodowska, A., Wendehenne, D., Dobrowolska, G.: SNF1-Related Protein Kinases Type 2 Are Involved in Plant Responses to Cadmium Stress. *Plant Physiology*, 160, 2012: 868–883

**Acknowledgement**

This research was supported by the grant 02/0023/13 of Slovak Grant Agency VEGA.

## VLIV KADMIA A OLOVA NA OBSAH VYBRANÝCH PRVKŮ V SEMENNÉ PRODUKCI OLEJNÉHO LNU, HRACHU, JEČMENE A KONOPI SETÉHO

### *CADMIUM AND LEAD INFLUENCE TO CONTENT OF SELECTED ELEMENT IN THE SEED PRODUCTION OF LINSEED, PEAS, BARLEY AND HEMP*

Marie Bjelková, Martina Větrovcová

Agritec Plant Research s.r.o., Zemědělská 2520/16, Šumperk, bjelkova@agritec.cz

#### *Summary*

From 2012 to 2014 there was monitored influence of graded supplementation of soil with Cd, Pb, Zn, Se and Fe on the content of selected elements in biomass of linseed, peas, barley and hemp seed under simulated natural conditions. Experiments were conducted in triplicate replications. Results demonstrated the highest content of Cd, Pb, Cu and Zn in hemp seeds compared to other crops. With increasing Cd supplementation in the soil there was shown increasing tendency to accumulate undesirable elements in seed production. The highest potential for accumulation of Cd and Pb was found in linseed seeds.

*Key words: seed, linseed, Linum usitatissimum L., hemp, Cannabis sativa L., ječmen, Hordeum vulgare L., hrách setý, Pisum sativum L., heavy metals, Cd, Pb, Zn, Cu, Se, Co.*

#### *Souhrn*

V letech 2012 až 2014 byl v simulovaných přírodních podmínkách sledován vliv stupňované suplementace půdy Cd, Pb, Zn, Se a Fe na obsah vybraných prvků v semenné biomase olejného lnu, hrachu, ječmene a konopí setého. Experimenty byly vedeny v trojnásobné replikaci. Výsledky prokázaly nejvyšší obsah Cd, Pb, Cu a Zn v semeni konopí setého oproti ostatním plodinám. Se zvyšující se suplementací Cd v půdě byla prokázána rostoucí tendence kumulace nežádoucích prvků v semenné produkci. Nejvyšší potenciál pro akumulaci Cd a Pb byl zjištěn v semenech olejného lnu.

*Klíčová slova: semena, olejný len, Linum usitatissimum L., konopí seté, Cannabis sativa L., ječmen jarní, Hordeum vulgare L., hrách setý, Pisum sativum L., těžké kovy, Cd, Pb, Zn, Cu, Se, Co.*

## ÚVOD

Kvalita životního prostředí je mimo jiné ovlivňována přítomností těžkých kovů v ovzduší, vodě a půdě. Z tohoto důvodu v posledních letech stoupá zájem o pochopení toxických účinků těžkých kovů při pěstování zemědělských plodin, jejichž absorpce v nich je různá. Většina zemědělských plodin se nevyznačuje hyperakumulačními schopnostmi a existence variability mezi druhy a jejich odrůdami byla dokumentována mnoha autory /1, 2/. V případě, že je koncentrace znečišťujících látek v biomase plodin detekována pod kritickou hygienickou úrovní, mohou tyto plodiny tvořit důležitou ekonomickou hodnotu k procesu spotřeby jako potravinového nebo krmivářského zdroje a naopak v případě zvýšeného obsahu těžkých kovů mohou být některé zemědělské plodiny využity v technických odvětvích průmyslu. Technické přadné plodiny jako len a konopí představují dobrý kompromis mezi jejich akumulačním potenciálem z pohledů absorpce těžkých kovů a možností průmyslového (nepotravinářského) zpracování kontaminovaného biomasy jako je využití v papírenském průmyslu, kompozitních materiálu, stavebnictví /3/.

## MATERIÁL A METODA

Pokusy byly vedeny v nádobách zapařovaných do země. Byly testovány plodiny: lín, konopí, ječmen jarní, jetel luční, hrách setý. Pokusné varianty byly členěny na kontrolu (přirozené pozadí Cd, Pb) a dále byl obsah Cd a Pb v zemině zvýšen o 5, 10 a 30 mg Cd.kg<sup>-1</sup> ve (všechny v dusičnanové formě) a v trojnásobném opakování. Dalšími variantami byly suplementace pro zinek, kadmium, olovo (všechny v dusičnanové formě), selen (seleničitan sodný) železo (síran železnatý), které byly aplikovány v množství 3 a 6 mg.kg<sup>-1</sup> zeminy. Varianty byly přihnojeny základními živinami, formou hnojiva NPK 10-10-10 do dávky 30 kg N.kg<sup>-1</sup> u lnu, hrachu a ječmene a 100 kg N.kg<sup>-1</sup> u konopí. Ve fázi prvních pravých listů byl redukován počet rostlin v nádobách olejných línů na 30 rostlin, u ostatních plodin na 5 rostlin. Rostliny byly sklizeny ve fázi plné zralosti, usušeny, následně byly laboratorně rozborovány a analyzovány na obsah MIE v jednotlivých částech rostliny. Stanovení celkového obsahu prvků bylo prováděno po rozkladu vzorků v mikrovlnném rozkladném zařízení Milestone ETHOS D. Navážka 0,25-0,5 g vzorku rostlinného materiálu byla rozložena v teflonové rozkladné nádobce s 5 ml 65% HNO<sub>3</sub> a 1 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, následně byl mineralizát převeden do odměrné baňky a doplněn redestilovanou vodou na objem 25ml. Byl použit rozkladný program pro zemědělské vzorky doporučený výrobcem. Vlastní měření bylo provedeno na atomovém absorpčním spektrometru (SOLLAR M, Unicam Ltd., Cambridge, U.K.) vybaveném QuadLine (D2) a Zeemanovou korekcí pozadí. Pro ověření správnosti metody byl analyzován certifikovaný referenční materiál NCS ZC73014 (GSB-7) čaj (Beijing Čína), přesnost metody byla zajištěna opakovaným měřením vzorku se srovnatelným obsahem daného prvku. Výsledná data byla statisticky zpracována pomocí statistického balíku programu Statistica 12.1.

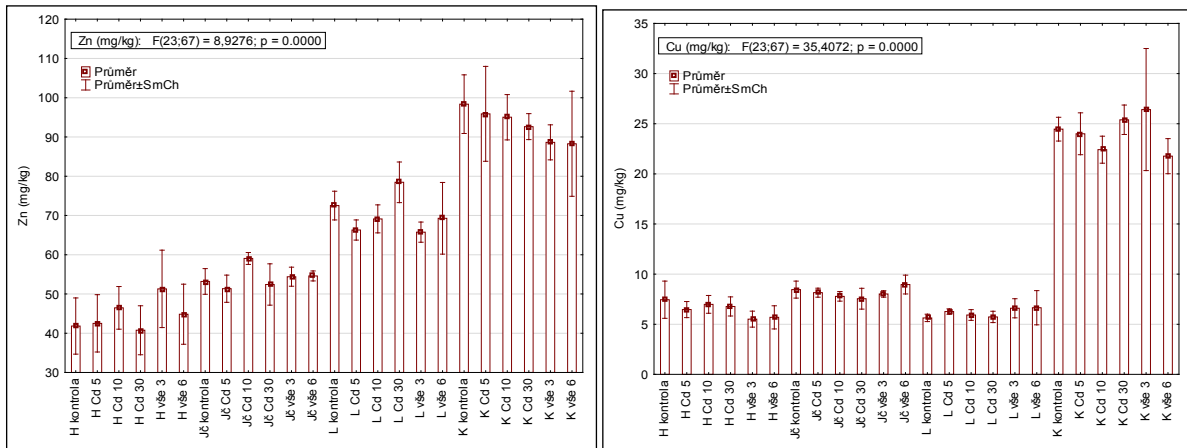
## VÝSLEDKY A DISKUSE

V semenné produkci plodin byl nejvyšší obsah **Zn** zjištěn u konopí, u hrachu a ječmene, kde byla jeho koncentrace téměř poloviční oproti konopí. Každá plodina reagovala variabilně v jednotlivých testovaných variantách (graf 1). Nejnižší koncentrace zinku byla 40,764 mg.kg<sup>-1</sup> (varianta u hrachu) a nejvyšší 98,356 mg.kg<sup>-1</sup> (kontrolní varianta konopí setého). Graf 2 ukazuje vyšší schopnost konopí setého akumulovat **Cu** do semene oproti ostatním sledovaným plodinám. Semeno hrachu a ječmene v kontrolní variantě akumulovalo více Cu oproti ostatním variantám. Podobně, zrno ječmene a semeno lnu akumulovalo více Cu ve variantách, kde byly aplikovány všechny prvky (3 a 6 Zn, Pb, Cd, Fe a Se mg.kg<sup>-1</sup> zeminy). Koncentrace Cu v semenné produkci plodin se pohybovala od 5,513 do 26,415 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny.

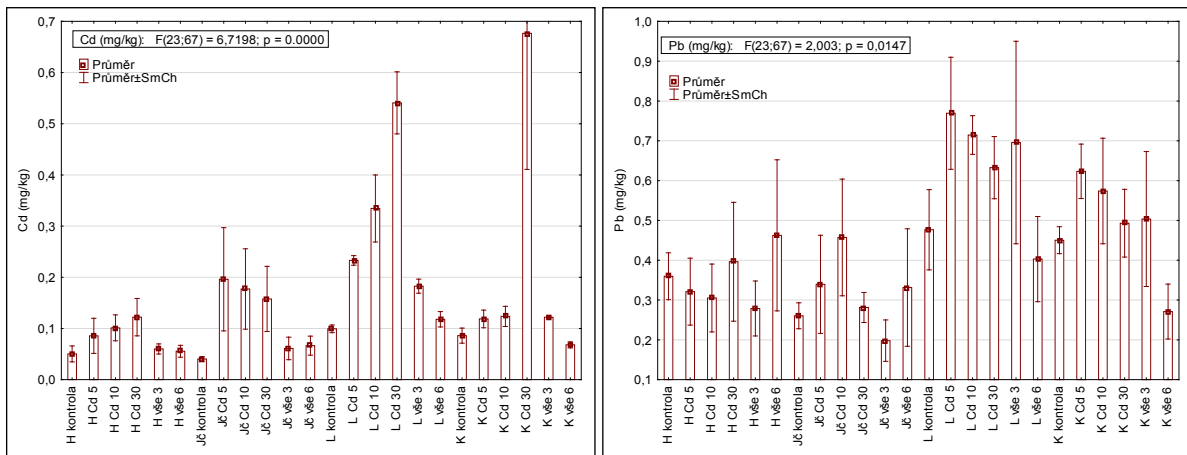
Koncentrace **Cd** v semeni plodin mimo zrna ječmene jednoznačně měla narůstající trend se vzrůstající koncentrací Cd v půdě. Z grafu 3 je jasně viditelný akumulací potenciál pro Cd u olejného lnu. Uvedené výsledky jsou v souladu s pracemi např. /1, 2, 3/.

Rozsah zjištěné koncentrace Cd u jednotlivých plodin kolísal od 0,041 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny až po 0,678 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny. Koncentrace Cd u semenné produkce hrachu a lnu a konopí měla velmi podobný trend. **Olovo** bylo nejvíce koncentrováno v semeni lnu a konopí oproti semeni hrachu a zrnu ječmene (graf 4), ale jeho koncentrace byla v jednotlivých variantách odlišná. Z pohledu suplementace Cd je možno konstatovat, že u hrachu měla koncentrace Pb klesající trend s narůstající koncentrací Cd v půdě, mimo koncentrace 30 mg Cd.kg<sup>-1</sup> zeminy a variant, kde byly suplementovány všechny vybrané prvky (3 a 6 mg Zn, Pb, Cd, Fe a Se.kg<sup>-1</sup> zeminy). Zajímavé je zjištění celkem vyššího nárůstu koncentrace Pb ve variantě suplementace všech prvků (6 mg Zn, Pb, Cd, Fe a Se.kg<sup>-1</sup> zeminy) u hrachu a zrna ječmene. Semeno lnu a konopí vykazovalo vyšší koncentraci olova v nižších koncentracích Cd v půdě. Graf 5 ukazuje, že semeno lnu a konopí je celkem bohatým zdrojem **Co** oproti semeni hrachu a zrnu ječmene. Jeho koncentrace v semeni lnu, zrnu ječmene a hrachu byla vyšší v nižších koncentracích Cd, u semene konopí je naopak vyšší u vyšších koncentrací Cd v půdě. **Fe** (graf 6), podobně jako měď, bylo kumulováno především do semene konopí setého. U semene hrachu byla nejvyšší koncentrace Fe zjištěna u kontrolní

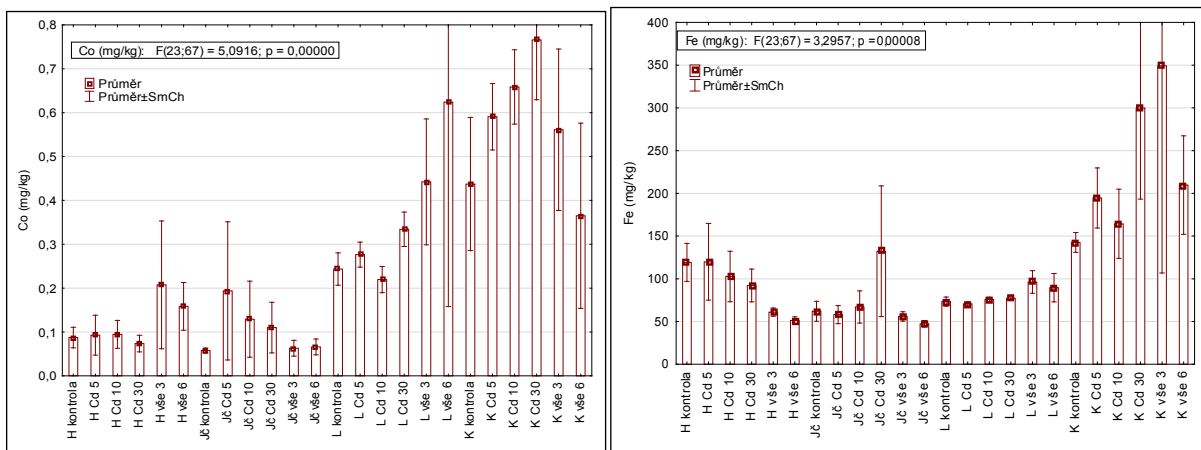
varianty, dále došlo ke snižování koncentrace Fe u variant se zvyšující se suplementací Cd a jejího dalšího snižování se zvyšující se koncentrací 3 a 6 u Zn, Pb, Cd, Fe a Se mg.kg<sup>-1</sup> zeminy.



Grafy 1,2: Obsah zinku a mědi v semenné produkci (mg.kg<sup>-1</sup>) plodin (2012 – 2014)



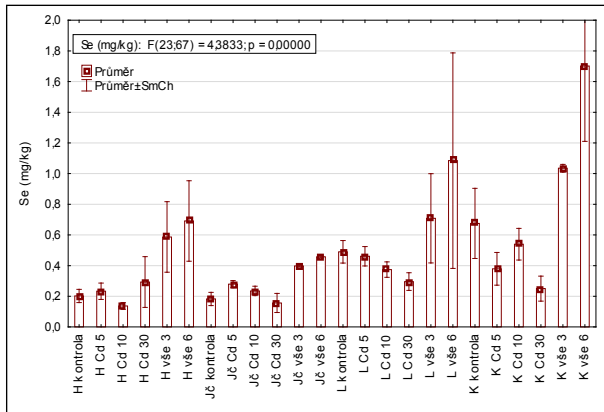
Grafy 3, 4: Obsah kadmia a olova v semenné produkci (mg.kg<sup>-1</sup>) plodin (2012 – 2014)



Grafy 5, 6: Obsah kobaltu a železa v semenné produkci (mg.kg<sup>-1</sup>) plodin (2012 – 2014)

Při této směsi kovů v půdě len naopak zvyšoval koncentraci Fe v semeni. Obsah Fe v zru ječmene vykazoval vzájemnou variabilitu mezi variantami a také studované plodiny v obsahu Fe byly vůči sobě ve vzájemně průkazné diferenci. Jak ukazuje graf 7, koncentrace **selenu** v semeni byla jednoznačně vyšší ve variantách, ve kterých byla provedena suplementace selenu, ale

především u olejného lnu a konopí se současně snižovala se zvyšující se koncentrací kadmia v půdě. Zjištěné koncentrace selenu byly nejnižší u hrachu, varianty s koncentrací 30 mg Cd.kg<sup>-1</sup> zeminy (0,049 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny) a nejvyšší u varianty, kde byly aplikovány Zn, Pb, Cd, Fe a Se v dávce 6 mg.kg<sup>-1</sup> zeminy. Také v případě lnu a konopí byl vyšší obsah selenu zjištěn ve variantě se suplementací směsí prvků 3 a 6 mg Zn, Pb, Cd, Fe a Se.kg<sup>-1</sup> zeminy.



Graf 7: Obsah selenu v semenné produkci (mg.kg<sup>-1</sup>) plodin (2012 – 2014)

Legenda.:

H, Jč, L, K – kontrola = kontrola jednotlivých plodin

H, Jč, L, K 5 5 = 5 mg Cd.kg<sup>-1</sup> zeminy, aplikace před setím do půdy

H, Jč, L, K 10 = 10 mg Cd.kg<sup>-1</sup>, aplikace před setím do půdy

H, Jč, L, K 30 = 30 mg Cd.kg<sup>-1</sup>, aplikace před setím do půdy

H, Jč, L, K vše 3 = 3 mg Cd, Pb, Zn, Fe, Se kg<sup>-1</sup> aplikace před setím do půdy

H, Jč, L, K vše 6 = 6 mg Cd, Pb, Zn, Fe, Se.kg<sup>-1</sup> aplikace před setím do půdy

Zkratky písmen: H = hrách setý, Jč = ječmen jarní, L = olejný len, K = konopí seté

## LITERATURA

- /1/ Bjelková M., Genčurová V., Griga M. (2011): Accumulation of cadmium by flax and linseed cultivars in field-simulated conditions: A potential for phytoremediation of Cd-contaminated soils. *Industrial Crop and Production*, 33: 761-774.
- /2/ Griga M., Bjelková M. (2013): Flax (*Linum usitatissimum* L.) and Hemp (*Cannabis sativa* L.) as Fibre Crops for Phytoextraction of Heavy Metals: Biological, Agro-technological and Economical Point of View. In book: *Plant-Based Remediation Processes, Soil Biology Volume 35*, 2013, pp 199-237.
- /3/ Pavelek, M., Tejklová, E., Bjelková, M., 2015: Flax and Linseed, Chapter 11, *Handbook of Plant Breeding, Industrial Crops, Breeding for BioEnergy and Bioproducts*, Ed. Von Mark V. Cruz, David A Dierig, Springer Science + Business Media New York 2015, ISBN 978-1-4939-1446-3, ISBN 978-1-4939-1447-0 (eBook), DOI 10.1007/978-1-4939-1447-0, Springer New York Heidelberg Dordrecht London, p. 233 – 263.

## Poděkování

Uvedená práce vznikla za finanční podpory projektu MŠMT COST CZ LD11053 a MZe RO0113.

## POZIČNÉ ZMENY V I-PBS PROFILOCH ĽANU RASTÚCEHO V PODMIENKACH ČERNOBYLU

### *I-PBS PROFILE CHANGES OF FLAX PLANTED IN CHERNOBYL AREA*

Veronika Lancíková<sup>1</sup>, Jana Žiarovská<sup>2</sup>, Milan Bežo<sup>2</sup>, Katarína Ražná<sup>2</sup>, Maxim Danchenko<sup>3</sup>, Valentina Berezhna<sup>3</sup>, Namik Rashydov<sup>3</sup>, Martin Hajduch<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Slovak Academy of Sciences, Akademická 2, 950 07 Nitra, Slovak Republic, jana.ziarovska@uniag.sk

<sup>2</sup> Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Agrobiological and Food Resources, Department of Genetics and Plant Breeding, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic

<sup>3</sup> Institute of Cell Biology and Genetic Engineering in Ukraine, 148 Akademika Zabolotnoho St. Kiev, Ukraine

#### *Summary*

The study is dealt with the positional changes of iPBS profiles of common flax that was planted under the conditions of radioactivity in Chernobyl area. Two varieties of flax were analysed - Kyivskiy and Bethune. The iPBS polymorphism was detected by a flax specific primer that amplified the polymorphic fragments of FL11 group of flax transposable element. Length polymorphism profiles were obtained for plants that were planted in radioactive, as well as uncontaminated control growth conditions. An amplified PCR product of 1100 bp size was detected in the irradiated samples of both analysed flax varieties.

*Key words: common flax, Chernobyl, retrotransposon, iPBS, length polymorphism*

#### *Súhrn*

Príspevok vyhodnocuje pozičné zmeny v iPBS profiloch ľanu siateho rastúceho v podmienkach kontaminácie prostredia rádioaktivitou v Černobyle. V práci sú analyzované dve odrody ľanu – Kyivskiy a Bethune. iPBS polymorfizmus bol hodnotený ľan špecifickým prajmerom zachytávajúcím polymorfizmus FL11 skupiny transponovateľného prvku ľanu siateho. V analýzach boli porovnávané získané profily dĺžkového polymorfizmu rastlín ľanu rastúceho v rádioaktívnom a kontrolnom – nekontaminovanom prostredí. V iPBS profiloch bol zaznamenaný polymorfny fragment veľkosti 1100 bp, ktorý bol amplifikovaný vo vzorkách kontaminovaného rastu.

*Kľúčové slová: ľan, Černobyl, retrotranspozóny, iPBS, dĺžkový polymorfizmus*

## ÚVOD

S každým ďalším rokom od Černobyľskej jadrovej havárie v roku 1986 pribúdajú otázky o možnostiach jednotlivých organizmov adaptovať sa na prostredie so zvýšenou úrovňou rádiácie (Kovalchuk *et al.*, 2004). Rádioaktívna kontaminácia životného prostredia vo veľkej miere aktivuje genetické mechanizmy a vedie k zmenám odolnosti danej populácie voči radiačnému pôsobeniu. Rovnako existujú prípady kedy sa zvýšená rádiorezistencia nevyvinula alebo dlhodobo nepretrvala. Rozvoj systému ochrany životného prostredia pred ionizujúcim žiarením by mal byť založený na jasnom pochopení účinkov rádiácie (Geras'kin *et al.*, 2011). Adaptácia je komplexný proces, ktorým populácia organizmov odpovedá na dlhotrvajúcu environmentálnu záťaž trvalou zmenou na úrovni genómu (Kovalchuk *et al.*, 2003).

V posledných rokoch sa objavujú vzrastajúce tendencie remediovať radiáciou kontaminované plochy pre poľnohospodárske účely (Klubicová *et al.*, 2011). Molekulárna charakterizácia plodín pestovaných v remediovaných oblastiach Černobyľu môže byť dôležitá pre

budúce poľnohospodárske smerovanie vo využití týchto plôch (Klubíková *et al.*, 2011). Úroveň akumulácie rádionuklidov rastlinami v Černobyľskej oblasti závisí najmä od vlastností pôdy, podnebia, biosféry, ročného obdobia, druhov a populácií rastlín na danom území (Yablokov *et al.*, 2009).

Biotický aj abiotický stres vplýva na genómy rastlín rôznymi smermi. Jedny z genetických prvkov genómu, pri ktorých je reakcia na stres dokumentovaná, sú transponovateľné elementy (Marakli *et al.*, 2012). V rastlinných genómoch sú početne zastúpené dva typy transponovateľných elementov - LTR (long terminal repeat) retrotranspozóny a MITEs (miniature-inverted transposable elements) transpozóny, ktoré môžu predstavovať 50 až 80 % z celkového obsahu DNA. Pre štúdium aktivity retrotranspozónov boli rozvinuté viaceré markérovacie techniky. Na amplifikácii genómovej oblasti medzi dvomi LTR-retrotranspozónmi sú založené techniky IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) a iPBS (inter Primer Binding Site). Prostredníctvom uvedených techník je polymorfizmus LTR-retrotranspozónov detekovaný na základe prítomnosti alebo neprítomnosti PCR produktu po vyhodnotení na agarózovom géli. Neprítomnosť amplifikovaného PCR produktu indikuje absenciu retrotranspozónu v konkrétnom lóku (Kartal-Alacam *et al.*, 2014).

Cieľom tejto štúdie bolo vyhodnotiť zmeny v dĺžkovom polymorfizme včlenení retrotranspozónov v genómoch divoch odrôd ľanu siateho pestovaného v podmienkach Černobyľu.

## MATERIÁL A METÓDY

Ľan siaty použitý v analýzách (odrody Kyivskiy a Bethune) je pestovaný na experimentálnych plochách v Černobyľskej oblasti. Experimentálna plocha kontaminovaná rádioaktívnymi izotopmi  $^{137}\text{Cs}$  ( $20650 \pm 1050 \text{ Bq.kg}^{-1}$ ) a  $^{90}\text{Sr}$  ( $5180 \pm 550 \text{ Bq.kg}^{-1}$ ) je lokalizovaná 5 km od miesta Černobyľskej jadrovej havárie. Remediovaná plocha (nerádioaktívna,  $^{137}\text{Cs}$   $1414 \pm 71 \text{ Bq.kg}^{-1}$ ,  $^{90}\text{Sr}$   $550 \pm 55 \text{ Bq.kg}^{-1}$ ) je lokalizovaná priamo v meste Černobyľ.

Celková genomická DNA analyzovaných odrôd bola izolovaná podľa metodiky Rogers and Bendich (1994).

PCR reakcie boli uskutočnené v reakčnej zmesi obsahujúcej: Thermo Scientific Dream *Taq* PCR Master Mix (2x);  $400 \text{ nmol.dm}^{-3}$  prajmer a  $5 \times$  TBT-PAR v celkovom objeme  $15 \mu\text{l}$  s prídavkom 1U Dream *Taq* Polymerázy. Amplifikácia bola realizovaná v MyCycler<sup>TM</sup> Bio-Rad s nasledovným protokolom:  $95 \text{ }^\circ\text{C} - 4 \text{ min}$ ; 34 cyklov ( $95 \text{ }^\circ\text{C} - 1 \text{ min}$ ,  $52 \text{ }^\circ\text{C} - 1 \text{ min}$ ,  $72 \text{ }^\circ\text{C} - 2 \text{ min}$ ) a záverečných  $72 \text{ }^\circ\text{C} - 10 \text{ min}$ .

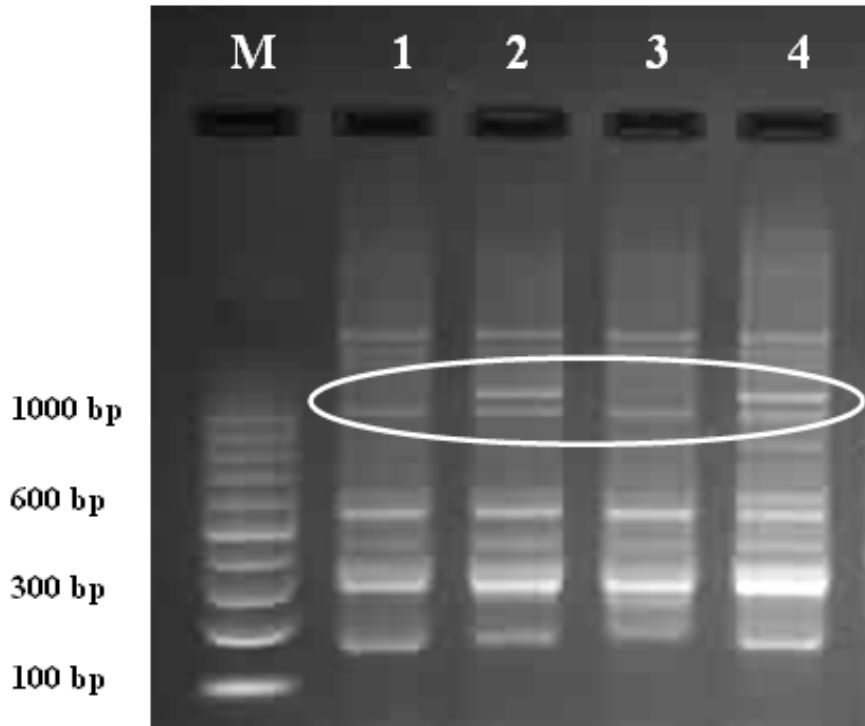
DNA amplifikácia bola uskutočnená pre ľan špecifickým iPBS prajmerom s nasledovným poradím nukleotidov: 5'agcctgaaagtgttggtgtcg 3'.

Amplifikované fragmenty boli rozdeľované v 1,5 % agarózovom géle (Agarose Basic, AppliChem) s prídavkom  $1 \times$  TBE and Gel Red 10 000  $\times$  (Biotium). Electroforéza prebiehala pri 65 V počas 2 h. Electroforeogramy boli nasnímané v dokumentačnom systéme G:Box v programe GeneSnap 7.09 (Syngene) a GeneTools 4.01 (Syngene).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Analýzy dĺžkového polymorfizmu včlenení retrotranspozónov uskutočnené v štúdiu boli realizované podľa originálu metódy publikovanej autormi (Kalendar *et al.*, 2011) použitím jedného z univerzálnych prajmerov zabezpečujúcich amplifikáciu tRNA miesta naväzovania sa prajmerov, ktoré sa nachádza v sekvenciách všetkých retrotranspozónov. Do analýz boli zahrnuté dve odrody ľanu siateho Kyivskiy a Bethune, pričom boli porovnané získané dĺžkové profily pre biologický materiál z rádiáciou kontaminovaných podmienok rastu a z podmienok rastu v nekontaminovanom prostredí. Amplifikované iPBS profily kontrolných ako aj experimentálnych rastlín boli porovnané a vyhodnotené v zmysle inzerčného polymorfizmu.

Použitý iPBS prajmer je ľan špecifický, nakoľko jeho sekvencia je plne komplementárna k poradiu nukleotidov 1111 – 1133 transponovateľného prvku FL11 ľanu siateho. Vyhodnotenie amplikónov v porovnávaných odrodách a variantoch rastu bolo uskutočnené ako priradenie prítomnosti alebo neprítomnosti inzerčného miesta príslušného transponovateľného prvku (Kalendar et al. 2011). Získaný iPBS profil bol polymorfný, nakoľko v prípade oboch analyzovaných odrôd (Kyivskyy, Bethune) bol nájdený lokus FL11 transponovateľného prvku ľanu o veľkosti 1100 bp, a to len v prípade rastlín rastúcich v podmienkach kontaminácie prostredia radioaktivitou (obrázok 1).



Obrázok 1 iPBS profily ľanu siateho. M – molekulárny markér; 1 - odroda Kyivskyy, kontrola; 2 – odroda Kyivskyy, rast v podmienkach rádioaktivity; 3 – odroda Bethune, kontrola; 4 – odroda Bethune, rast v podmienkach rádioaktivity

Transponovateľné prvky sú vo väčšine prípadov počas vývinu rastlín neaktívne, v podmienkach stresu však viaceré z nich podliehajú aktivácii. Stresové podmienky biotického alebo abiotického pôvodu sú prirodzenou súčasťou životného cyklu rastlín, pričom aktivácia transponovateľných prvkov môže byť vyvolaná rôznymi situáciami. Pozorované zmeny v dĺžkovom polymorfizme iPBS profilov analyzovaných odrôd ľanu siateho tak môžeme spájať s pôsobením stresu v podobe rádioaktivity, keďže v literatúre je uvádzaných viacero stresorov ako schopných ovplyvniť aktiváciu a transpozíciu mobilných prvkov genómov rastlín. Schopnosť jednotlivých tried transponovateľných elementov byť aktivovaných určitými stresovými podmienkami však nie je univerzálna ani z hľadiska aktivácie určitým stresorom, ani z hľadiska takejto schopnosti ako charakteristiky spoločnej pre celú triedu (Beguiristain et al., 2001). Pre konkrétne skupiny retrotranspozónov je dokumentovaná aktivácia vplyvom rôznych typov environmentálneho stresu (Mansour et al., 2008). Ku konkrétnym stresovým podmienkam popísaným v literatúre patrí mráz, infekčný tlak, mechanické poškodenie, regenerácia *in vitro*, hybridizácia či produkcia haploidov, pričom aktivácia transponovateľných prvkov bola zaznamenaná v celom spektre ich klasifikácie.



**LITERATÚRA**

- /1/ Buguiristain, T. – Grandbastien, M.A. – Puigdoménech, P. – Casacuberta, J.M. 2001. Three Tnt1 Subfamilies Show Different Stress-Associated Patterns of Expression in Tobacco. In: *Plant Physiol*, vol. 127, pp. 212-221.
- /2/ Geras'kin, S. - Oudalova, A. - Dikareva, N. - Dikarev, V. - Prytkova, J. - Chernonog, E. - Novikova, T. Impact assessment of long-term chronic radiation exposure on plant populations. In *Radioprotection*, vol. 46, 2011, no. 6, p. 341-347.
- /3/ Kalendar, R. - Flavel, A. J. - Ellis, T. H. - Sjakste, T. - Moisy, C. - Schulman, A. H. 2011. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. In *Heredity*, vol. 106, 2011, no. 4, p. 520-530.
- /4/ Kartal-Alacam, G. – Yilmaz, S. – Marakli, S. – Gozukirmizi, N. Sikkula Retrotransposon Insertion Polymorphisms in Barley. In *Russian Journal of Plant Physiology*, vol. 61, 2014, no. 6, p. 828-833.
- /5/ Kovalchuk, I. - Abramov, V. - Pogribny, I. - Kovalchuk, O. Molecular Aspects of Plant Adaptation to Life in the Chernobyl Zone. In *Plant Physiology*, vol. 135, 2004, p. 357-363.
- /6/ Kovalchuk, O. - Burke, P.- Arkhipov, A. - Kuchma, N. - Jill James, S. - Kovalchuk, I. - Pogribny, I. Genome hypermethylation in *Pinus silvestris* of Chernobyl - a mechanism for radiation adaptation? In *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 529, 2003, no. 1-2, p. 13-20.
- /7/ Klubíková, K. - Berčák, M. - Danchenko, M. - Skultety, L. - Rashydov, M. N. - Berezhna, V. V. - Miernyk, A. J. - Hajdúch, M. Agricultural recovery of a formerly radioactive area: I. Establishment of high-resolution quantitative protein map of mature flax seeds harvested from the remediated Chernobyl area. In *Phytochemistry*, vol. 72, 2011, p. 1308-1315.
- /8/ Marakli, S. - Yilmaz, S. - Gozukirmizi, N. 2012. BARE1 and BAGY2 Retrotransposon movements and expression analyses in developing barley seedlings. In *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, vol. 26, 2012, no. 6, p. 3451-3456.
- /9/ Mansour, A. 2007. Epigenetic activation of genomic retrotransposons. *Journal of Cell and Molecular Biology*, vol. 6, pp. 99-107.
- /10/ Yablokov, A. V. – Nesterenko, B. V. – Nesterenko, V. A. 2009. Chapter III. Consequences of the Chernobyl Catastrophe for the Environment. In *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1181, 2009, p. 221-286.

**Pod'akovanie**

Uvedená práca vznikla za finančnej podpory projektov: APVV-0231-11 Výskum adaptácie rastlín v rádioaktívnej Černobyľskej oblasti a ich možné využitie; ŠF EÚ AgroBioTech - Kód ITMS projektu: 26220220180.

## Príspevky do sborníku

# FENOLOGICKÁ AKTIVITA DREVÍN AKO NÁSTROJ HODNOTENIA ICH VITALITY

## *PHENOLOGICAL ACTIVITY OF TREES AS A TOOL FOR THEIR VITALITY ASSESSEMENT*

Ladislav Bakay<sup>1</sup>, Michal Pástor<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra biotechniky zelene, Slovenská Poľnohospodárska Univerzita, Tr. A. Hlinku 2, Nitra 94901, email: lazlo.bakay@gmail.com

<sup>2</sup>Katedra plánovania a krajiny, Technická univerzita vo Zvolene, Ul. T. G. Masaryka 24 960 53 Zvolen, email: michalpastor65@gmail.com

### *Summary*

Vitality of trees is a theoretical concept which can be assessed by different indicators. Since the optimal vitality of trees is not defined it is crucial to determine reference trees and selection of right indicators of vitality assesment. The article emphasizes the importance of phenological activity of woody plants in relationship with their vitality. Phenological activity of woody plants must be combined with different indicators to gain objective results of tree vitality.

*Key words: vitality, phenology, stress, vitality of trees*

### *Souhrn*

Vitalita drevín je teoretický koncept a doposiaľ nebol definovaný pojem optimálna vitalita dreviny. Pri zisťovaní vitality drevín sa používajú viaceré indikátory. Jedným z indikátorov je fenologická aktivita drevín, ktorá musí byť kombinovaná s inými indikátormi, aby sme získali objektívny náhľad na vitalitu skúmanej dreviny.

*Klíčová slova: vitalita, fenológia, stres, vitalita dreviny*

## ÚVOD

Dreviny majú výraznú úlohu v krajine a ich význam rastie s mierou urbanizácie v krajine. Aby dreviny mohli spĺňať svoje funkcie optimálne, musia byť vitálne a mať aj dobrý zdravotný stav. O vitalite drevín vieme relatívne málo oproti tomu, koľko výskumu sa v tejto oblasti podniklo, najmä, keď sa jedná o kvantifikáciu vitality drevín. Vitalita drevín sa síce hodnotí viacerými metódami. Úlohou tohto článku je načrtnúť možnosti využitia fenologickej aktivity drevín ako pomocného nástroja pri hodnotení vitality drevín.

## VITALITA DREVÍN

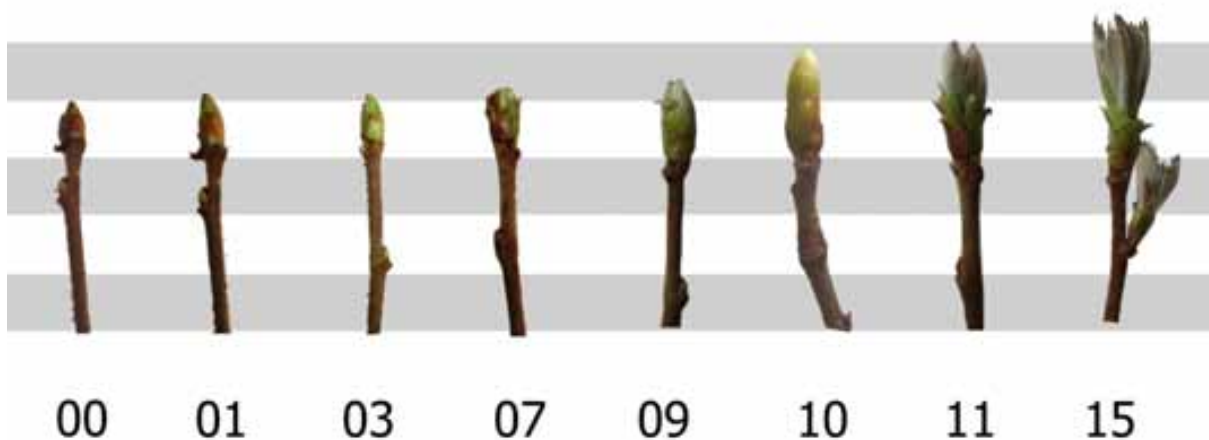
Vitalita drevín je teoretický koncept a doposiaľ nebol definovaný pojem optimálna vitalita dreviny /3/. V literatúre môžeme nájsť viacero definícií čo vitalita drevín je /2, 9, 26/ a všeobecne by sme ju mohli opísať ako potenciál rastu, vývinu a prežívania danej dreviny. /9/ vitalitu dreviny opisuje ako ľubovoľný bod v trojuholníku - tolerancia voči stresu, dlhovekosť a rast a rozmnožovanie. /20/ uvádza, že vitalita (životaschopnosť) je faktor, ktorý je súčasťou každého hodnotenia stromov v urbanizovanej krajine. S týmto pojmom býva často nesprávne stotožňovaný zdravotný stav drevín. Zdravotný stav /19/ chápe ako prejav a súčasne ukazovateľ vitality. Vyjadruje, nakoľko je súčasný stav stromu zhodný alebo odlišný od normálnych pomerov. Vitalita drevín nemôže byť priamo a presne kvantifikovaná, ale vieme získať „obraz“ vitality drevín pomocou rôznych indikátorov /9/. Na bunkovej úrovni sú to rôzne fyziologické ukazovatele /12/,

ale rovnako dôležité sú praktické terénne metódy ako priehľadnosť korún /4/, morfológia koruny /22/, analýza obsahu živín v ihliciach /27/ v listoch /28/ alebo v belovom dreve /6/, analýza hrubnutia stonky /30/, elektrický odpor kambia /8/, morfológia ihlíc /7/, fluorescencia chlorofylu /14/ alebo analýza luminiscencie /25/, emisná analýza ihlíc /13/, fenologická aktivita drevín (<http://www.futmon.org/d1-tree-vitality-and-adaptation>) a na záver meranie elektrického potenciálu /10/. Spomínané metódy nám pomáhajú odhadovať vitalitu skúmanej dreviny. Keďže optimálna vitalita dreviny nie je exaktne definovaná, dôležitý je výber referenčných drevín v reprezentatívnej vzorke (drevina, ktorá sa na základe meraní javí najvitálnejšia a drevina s najnižšou vitalitou) /3/. Pri hodnotení vitality rastlín je taktiež žiadúce aplikovať viacero indikátorov pre získanie objektívnejších záverov /16, 18/. /5/ považuje za najefektívnejšiu metódu stanovenia vitality drevín kombinovanie resp. porovnanie výsledkov vybraných fyziologických ukazovateľov s výsledkami rastovej analýzy. Vitalitu drevín hodnotia lesníci inak ako správcovia zelene. Pre lesníkov znamená vitalita rast drevín vyjadrená parametrami ako priemer kmeňa vo výške 1,3m, stav koruny a výškové prírastky /23/.

### FENOLOGICKÁ AKTIVITA DREVÍN V PODMIENKACH STRESU

Fenologická aktivita drevín je ich prejavom v závislosti od poveternostných podmienok a ročných období. Na drevinách môžeme sledovať krátkodobé zmeny ich prejavov pri pôsobení určitého stresora (napr. nedostatok vody), ale aj dlhodobé zmeny prejavov a trendy ich vývoja v súvislosti so zmenou klímy. V ročnom fenologickom cykle dreviny na základe medzinárodnej stupnice BBCH /15/ a modifikovaných stupníc BBCH pre konkrétne dreviny /1, 21/ rozdeľujeme primárne fenofázy (makroštádiá) a sekundárne fenofázy (mikroštádiá). Primárnymi faktormi, ktoré vplývajú na fenologickú aktivitu rastlín sú priemerné denné teploty, fotoperiód a vodný stres, konkrétnejšie nedostatok vody v pôde /24/. Jednotlivé primárne fenologické fázy sú citlivejšie na stesy ako iné. Jedná sa o primárne fenofázy: 1 pučanie a vývin pukov (oneskorené pučanie), 3. vývin terminálneho výhonu (kvantifikácia prírastkov, výskyt májskych a jánskych výhonov), 7. vývin plodov (opadávanie plodov) a 9. senescencia a začiatok dormancie (listy neopadávajú). Treba prihliadať aj na rozdiely vo fenologickej aktivite drevín v juvenilnom a dospelom štádiu. Semenáčiky majú preukazne odlišnú fenologickú aktivitu ako dospelé jedince, čo súvisí skoncurenciou a s prežívaním jedincov v lesných spoločenstvách /17, 29/.

Fenologická aktivita drevín sama o sebe nie je objektívnym hodnotiacim kritériom ich vitality. Musí byť doplnená aj inými indikátormi, ktoré umožnia získať objektívnejší pohľad na vitalitu danej dreviny.



Obr 1: Modifikovaná stupnica BBCH – primárna fenofáza 1. Pučanie a vývin pukov /1/.

**LITERATURA**

- /1/ Bakay, L.: Identification Key for Phenological Growth Stages of *Sorbus domestica* L. and *S. torminalis* (L.) Crantz. In II International Symposium on Woody Ornamentals of the Temperate Zone 990, 2012:181-185
- /2/ Brang P. (eds): Sanasilva-Bericht 1997. Gesundheit und Gefährdung des Schweizer Waldes - eine Zwischenbilanz nach 15 Jahren Waldschadenforschung. Berichte der Eidg. Forschungsanstalt fuer Wald, Schnee und Landschaft, Birmensdorf, 1997
- /3/ Dobbertin, M.: Tree growth as indicator of tree vitality and of tree reaction to environmental stress: a review. *European Journal of Forest Research*, 124(4), 2005: 319-333.
- /4/ Eichkorn T.: Wachstumsanalysen an Fichten in Südwürttemberg. *Allg Forst- Jagdztg* 157,1986:125–139
- /5/ Johnstone, D., Moore, G., Tausz, M., & Nicolas, M.: The measurement of plant vitality in landscape trees. *Arboricultural Journal*, 35(1), 2013: 18-27.
- /6/ Joos K.: Untersuchung der Zusammenhaenge zwischen Nadeldichte, Zuwachsleistung und Naehrstoffversorgung bei der Fichte unter besonderer Beruecksichtigung des Ionentransportes im Splintsaft. Diss. ETH, No. 12117, 1997
- /7/ Kozlov M.V., Niemela P.: Difference in needle length - A new and objective indicator of pollution impact on Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Water Air Soil Pollut* 116,1999: 365–370
- /8/ Kucera L.J. : Kernspintomographie und elektrische Widerstandsmessung als Diagnosemethode der Vitalität erkrankter Bäume. *Schweiz Z Forstwes* 137, 1986:673–690
- /9/ Gehrig M.: Methoden zur Vitalitätsbeurteilung von Bäumen. Vergleichende Untersuchungen mit visuellen, nadelanalytischen und bioelektrischen Verfahren. Diss. No. 15341, ETH Zuerich
- /10/ Goldstein A.H., Gensler W.: A physiological basis for electrophytograms. *Bioelectrochemistry Bioenergetics* 8, 1981:645–659
- /11/ Hossain, A., da Silva, J. A. T., Lozovskaya, M. V., & Zvolinsky, V. P.: The Effect of High Temperature Stress on the Phenology, Growth and Yield of Five Wheat (*Triticum aestivum* L.) Varieties. *Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*, 6(1), 2012:14-23.
- /12/ Larcher W.: Oekophysiologie der Pflanzen. Ulmer Verlag, Stuttgart, 6. Auflage, 2001
- /13/ Lewinsohn E., Gijzen M., Croteau R.: Defense-mechanisms of conifers. Differences in constitutive and wound-induced monoterpene biosynthesis among species. *Plant Physiol.* 96,1991: 44–49
- /14/ Lichtenthaler H.K., Rinderle U.: The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *J Plant Physiol* 148, 1988: 4–14
- /15/ Meier, U.: Growth stages of mono- and dicotyledonous plants. BBCH Monograph. German federal biological research centre for agriculture and forestry, Berlin, 2001
- /16/ Paganová, V.: Physiological responses of service tree (*Sorbus domestica* L.) in conditions of the differentiated water regime. *Acta horticulturae et Regio Tecturae*, 2009: 31-33.
- /17/ Paganová V., Gavorová M.: Zhodnotenie rastu potomstiev jarabiny oskorušovej (*Sorbus domestica* L.) z voľného opelenia na katedre Jelenec. In: Mňahončáková E., Baruszová M. (Eds.). *Sídlo, Park, Krajina IV.*: 11. Kolokvium katedrie záhradnej a parkovej tvorby. Nitra, SPU, 2006 273-281
- /18/ Paganová, V., Jureková, Z., Dragúňová, M., Lichtnerová, H.: Physiological response of service tree (*Sorbus domestica* L.) under conditions of differentiated water regime, In: *Acta horticulturae et regiotecturae*, mimoriadne číslo, Nitra, 2009.s. 2009:13-33
- /19/ Pejchal, M.: Vyhodnocení vitality stromů v městských ulicích. In *Sborník z konference „Stromy v ulicích“*, 1994: 32 – 44.
- /20/ Pejchal, M.: Hodnocení vitality dřevin z pohledu záhradní a krajinné tvorby. In *Zborník z konferencie s medzinárodnou účasťou „Dreviny vo verejnej zeleni“*, Zvolen, 2005: 39 – 46.
- /21/ Rajan, S., Tiwari, D., Singh, V. K., Saxena, P., Singh, S., Reddy, Y. T. N., & Kennedy, R.: Application of extended BBCH scale for phenological studies in mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Applied Horticulture*, 13(2), 2011:108-114.
- /22/ Roloff A.: Morphology of crown development of *Fagus sylvatica* L. (beech) in consideration of new modifications. 1. Morphogenetic cycle, abnormalities specific to proleptic shoots and leaf fall. *Flora* 179, 1987: 355–378
- /23/ Rötzer, T., Grote, R., & Pretzsch, H.: Effects of environmental changes on the vitality of forest stands. *European Journal of Forest Research*, 124(4), 2005: 349-362.
- /24/ Sivertsen, T. H., Nejedlik, P., Oger, R., & Sigvald, R.: The phenology of crops and the development of pests and diseases. Literature, research, models and future operational integration. A report from a working group on phenology, pests and diseases on crops. COST 711. Rapport-Planteforsk (Norway), 1999
- /25/ Schmidt W., Schneckenburger H.: Time-resolving luminescence techniques for possible detection of forest decline: I. Long term delayed luminescence. *Radiation and Environ Biophys* 31, 1992:63–72
- /26/ Shigo A.L.: Die neue Baumbiologie. Bernhard Thalacker Verlag, Braunschweig, 1990

- /27/ Stefan K, Fuřrst A, Hacker R, Bartels U: Forest Foliar Condition in Europe. Results of the large-scale foliar chemistry surveys (survey 1995 and data from previous years), Austrian Federal Forest Research Centre, EC, UN/ECE, Vienna Brussels Geneva, 1997
- /28/ Van den Driessche, R.: Prediction of mineral nutrient status of trees by foliar analysis. *The Botanical Review*, 40(3), 1974: 347-394.
- /29/ Vitasse, Y.: Ontogenic changes rather than difference in temperature cause understory trees to leaf out earlier. *New Phytologist*, 198(1), 2013: 149-155.
- /30/ Waring R.H., Thies W.G., Muscato D.: Stem growth per unit of leaf area: a measure of tree vigor. *For Sci* 26, 1980:112–117

### **Poděkování**

Uvedená práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru KEGA 012SPU-4/2013 Program celoživotného vzdelávania arboristov na Slovensku.

## HODNOTENIE VPLYVU ABIOTICKÉHO STRESU A ÚČINKU REGULÁTOROV RASTU NA VYBRANÉ FYZIOLOGICKÉ UKAZOVATELE PŠENICI OZIMNEJ

### *IMPACT ASSESSMENT ABIOTIC STRESS AND EFFECT OF GROWTH REGULATORS ON SELECTED PHYSIOLOGICAL PARAMETERS OF WINTER WHEAT*

Irena Barányiová

Mendelova univerzita v Brne, AF, Ústav agrosystému a bioklimatologie, Zemědělská 1, 613 00  
Brno, irenka2308@azet.sk

#### *Summary*

The aim of this study was to determine the impact of growth regulators on the physiological parameters and quality of winter wheat under drought stress simulated by experimental rain-out shelters. The experiment was conducted in a field experimental station in Žabčice (49°00'41.3"N) on winter wheat variety Matylda in 2013/2014. Within this experiment following growth regulators and fungicide with growth regulation effect were used: Retacel extra R68 (chlormequat chloride 720 g/l), Moddus (trinexapac-ethyl 250 g/l), Cerone (ethephon 480 g/l), Amistar (azoxystrobin 250 g/l). These growth regulators were applied at growth stages between BBCH 31 and BBCH 59. Definitely positive effect on water use efficiency was found in fungicide treatment with growth regulation effect - azoxystrobin. Under drought stress the decrease of chlorophyll content in leaves and grain protein content was found. The highest mitigating effect in the decline of chlorophyll from drought was observed in the active substance azoxystrobin. Reduced protein content in grain was highest in the untreated control and the application of azoxystrobin.

*Key words: cereals, winter wheat, water stress, growth regulators, chlorophyll content*

#### *Súhrn*

Cieľom tejto štúdie bolo zistiť vplyv rastových regulátorov na fyziologické parametre a kvalitu ozimnej pšenice za sucha simulovaného pomocou experimentálnych prístreškov. Experiment bol založený na poľnej pokusnej stanici Žabčice (49°00'41.3"N) u ozimnej pšenici, odrody Matylda v roku 2013/2014. V tomto pokuse boli použité rastové regulátory a fungicíd s rastovým regulačným účinkom: Retacel extra R68 (chlormequat chlorid 720 g/l), Moddus (trinexapac-etyl 250 g/l), Cerone (ethephon 480 g/l), Amistar (azoxystrobin 250 g/l). Tieto regulátory rastu boli aplikované v rastových fázach medzi BBCH 31 a BBCH 59. Rozhodne pozitívny vplyv na efektivitu využívania vody bol zistený u fungicídu ošetrený rastovým regulačným účinkom - azoxystrobín. Za sucha došlo k poklesu obsahu chlorofylu v listoch a obsahu bielkovín v zrne. Najvyšší zmiernujúci efekt v poklese obsahu chlorofylu spôsobený suchom bol pozorovaný pri účinnej látke azoxystrobín. Znížený obsah bielkovín v zrne bol najvyšší v neošetrenej kontrole a po aplikácii azoxystrobínu.

*Klíčovú slova: obilniny, pšenica ozimná, vodný stres, rastové regulátory, obsah chlorofylu*

## ÚVOD

Klimatické zmeny predstavujú v súčasnosti jeden z najzávažnejších environmentálnych, sociálnych a hospodárskych problémov. Na jednej strane sa môže vďaka teplejšiemu podnebiu pestovanie niektorých plodín posunúť do severnejších zemepisných šírok, na strane druhej, oblasti, ktoré už teraz sužujú suchá, sa budú ďalej rozširovať. Najväčšie riziko vyplývajúce z meniacej sa klímy súvisí v poľnohospodárstve s nedostatkom vody. Veď v súčasnej dobe viac ako 40 %

svetovej produkcie potravín pochádza zo zavlažovaných plôch a závlahy tvoria 2/3 celosvetovej spotreby vody. Najalarmujúcejšia situácia v Európe je v Stredomorí, kde viac ako 70 % vodných zdrojov je využitých na závlahy. Stres sucha v pšenici ozimnej je evidentnejší v Strednej Európe a očakáva sa, že periódy sucha budú výraznejšie a dlhšie /7/. Schopnosť rastlín sa prispôbiť nepriaznivým podmienkam prostredia je považovaná za základnú podmienku ich prežitia. V podmienkach negatívnej bilancie vody dochádza k biochemickým a funkčným zmenám na úrovni koreňov i nadzemnej časti. V podmienkach vodného deficitu rastliny obmedzujú príjem minerálnych živín, napr. dusíka a jeho asimiláciu v listoch /3/. Rezistencia k vodnému stresu sa dá dosiahnuť tým, že rastlina stresu unikne, skoro dozrie a vyhne sa perióde sucha, alebo je ku stresu tolerantná tým, že udrží príjem vody nad stratou. Znakom tolerantnosti voči stresu je napr. redukcia priemeru cievnych zväzkov spojená zo zmenou rezistencie voči toku vody xylémom. Pre kontrolu straty vody transpiráciou ako znak slúži stupeň prieduchovej (stomatálnej) vodivosti /5/. Stomatálna kontrola stresovaných rastlín závisí výlučne od vodného stavu listu (vodného potenciálu) /1/ a požiadaviek rastlín na transpiráciu. Už dlhšiu dobu je známe, že niektoré rastliny (napr. obilniny) redukujú prieduchovú vodivosť aj v tom prípade, ak sa vodný potenciál vplyvom sucha nemení /4/; /6/. Novým prístupom v štúdiu správania sa prieduchov v deficitných podmienkach je teória kombinovaného účinku chemického signálu a vodného stavu listu na redukciu prieduchovej vodivosti a tým na kontrolu vody v rastline. Transpirácia, vyparovanie vody z rastliny, sa uskutočňuje hlavne cez listy /8/.

Negatívne účinky sucha môžeme ovplyvniť okrem iného aplikáciou rastových regulátorov, ktoré majú vplyv na priebeh fyziologických a metabolických reakcií, súvisiace s rastom koreňa, zvyšovaním pomeru korene : nadzemná biomasa až po reguláciu uzatváranie prieduchov. Taktiež majú vplyv na akumuláciu antioxidantov, ktoré prispievajú k odolnosti voči suchu. Aplikácia regulátorov rastu je jedným z dôležitých faktorov intenzifikácie pestovania obilnín a v súčasnej dobe aj nevyhnutným opatrením. Problematika používania regulátorov je veľmi zložitá, pretože nepôsobíme na rastliny priamo, ale prostredníctvom ich hormonálneho systému, a navyše je toto pôsobenie ovplyvnené mnohými faktormi. Preto správne použitie regulátorov rastu je neoddeliteľnou súčasťou intenzívnej pestovateľskej technológie, ktorá priamo súvisí s modelovaním porastu, úrodou a následne ekonomikou pestovania /2/.

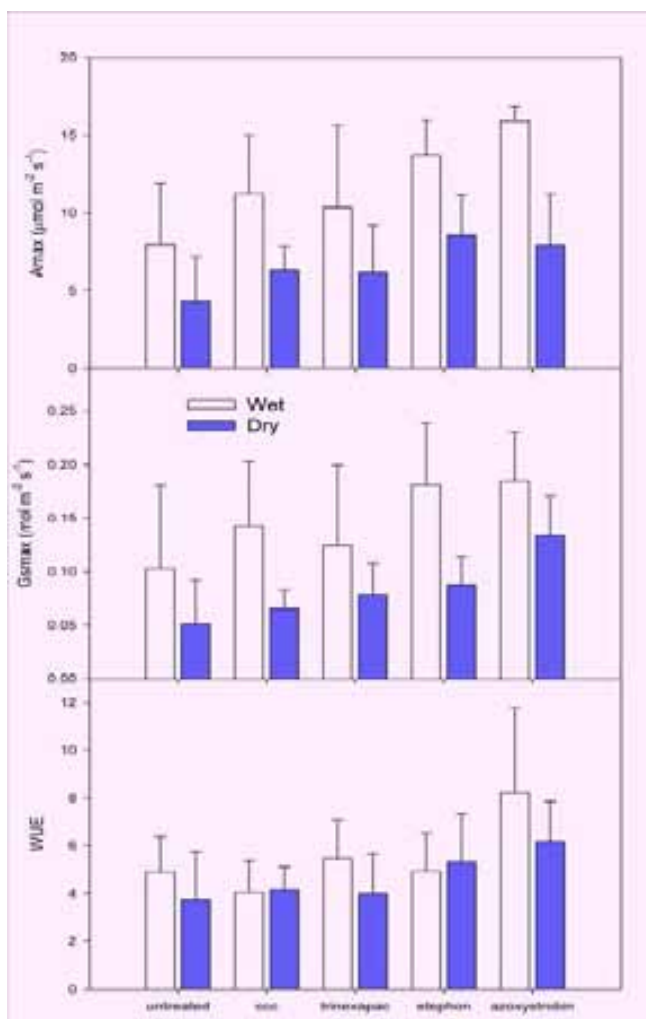
## MATERIÁL A METÓDA

Maloparcelný pokus bol založený na poľnej pokusnej stanici v Žabčiciach (49°00'41.3"N), kde boli vyhodnocované rozne varianty ošetrované regulátormi rastu u pšenici ozimnej. Experimentálna stanica sa nachádza v teplej oblasti s prevahou kontinentálneho podnebia (priemerný ročný úhrn zrážok 482 mm a teplota 9,3 ° C. Tento pokus bol založený v roku 2013/2014 s odrodou Matylda, ktorá bola vysiatá 15. 10. 2013. Výsevok bol 4 MKS, predplodinou bola sója. Varieta Matylda patrí do súboru skorých odrôd. Odroda Matylda má veľmi vysoký výnosový potenciál. Meranie fyziologických parametrov (efektívnosť využívania vody, rýchlosť asimilácie CO<sub>2</sub> a obsah chlorofylu v listoch bolo vykonané v polovici sucha (26. mája 2014), a na konci účinku sucha. Dusíkaté hnojenie bolo vykonané pomocou hnojiva LAD 27 na dávku 160 kg N/ha a hnojiva DAM 390 (roztok vody, dusičnanu amónneho a močoviny) v dávke 30 kg N/ha. Porast bol ošetrovaný za použitia herbicídu COUGAR FORTE + fungicídu HUTTON FORTE. Jednotlivé regulátory boli aplikované v nasledujúcich fenofázach: Retacel extra R68 (chlormequat chloride 720 g/l) v BBCH 31, Moddus (trinexapac-ethyl 250 g/l) v BBCH 32-35, Cerone (ethephon 480 g/l) v BBCH 39-49, Amistar (azoxystrobin 250 g/l) v BBCH 45-49. V rastovej fáze koncom steblovania BBCH 39 boli nad polovicou experimentálnej plochy postavené krátkodobé striešky zaisťujúce indukciu stresu sucha. Pre hodnotenie rýchlosti asimilácie CO<sub>2</sub>, transpirácie a vodivosti prieduchov bol použitý systém LI 6400 XT. Meranie sa uskutočnilo pri konštantnej teplote, relatívnej vlhkosti vzduchu a koncentrácii CO<sub>2</sub>. Sledované parametre umožnili výpočet efektivity využívania vody (WUE) a nepriameho parametru efektivity využitia vody A/GS.

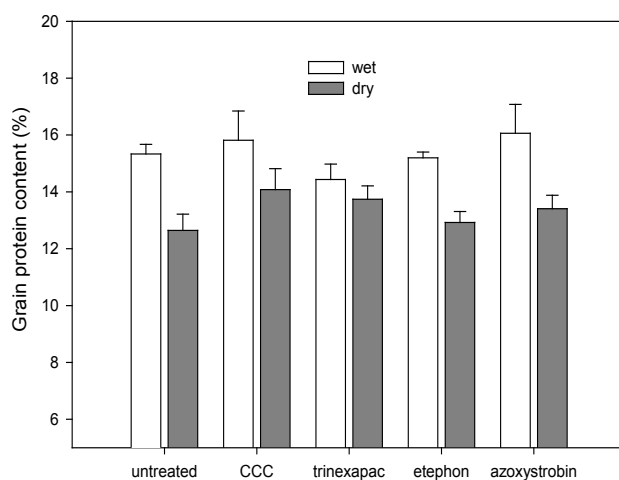


## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Jednoznačne pozitívny vplyv na efektivitu využitia vody mal predovšetkým len fungicíd s regulačnými účinkami - azoxystrobin.



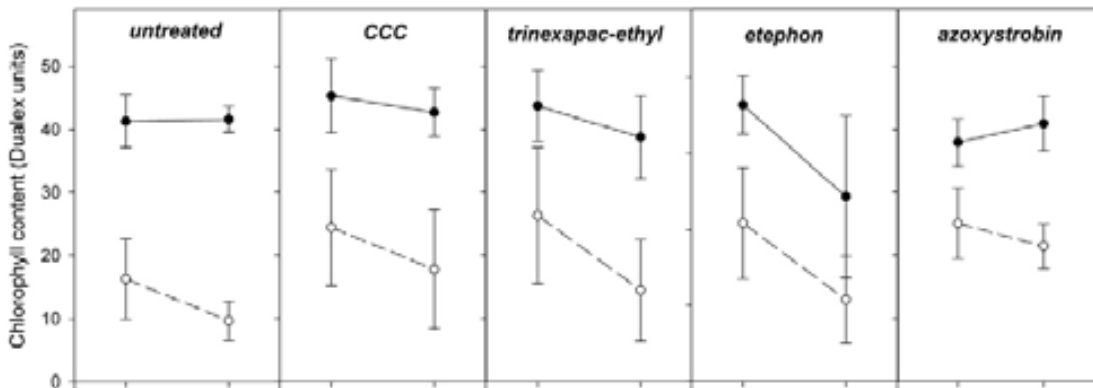
Graf 1: Rýchlosť fotosyntézy ( $A_{max}$ ), prieduchová vodivosť ( $G_{smax}$ ) a efektívnosť využitia vody rastlinami (WUE)



Graf 2: Obsah bielkovín v zrne

Stres sucha všeobecne znížil obsah bielkovín v zrne. Tento účinok bol najvyšší v neošetrenej kontrole a po aplikácii azoxystrobínu. Negatívny vplyv sucha na obsah proteínu bol mierne znížený aplikáciou CCC a trinexapac etyl. V dobre zavlažovaných ošetreniach bol obsah bielkovín posilnený najmä aplikáciou CCC a azoxystrobínu.

Sucho viedlo k celkovému poklesu obsahu chlorofylu v oboch horných listoch (F a F-1). Všetky regulátory rastu použité v experimente znížili tento pokles. Najvyšší zmierňujúci efekt v poklese obsahu chlorofylu spôsobený suchom bol pozorovaný pri účinnej látke azoxystrobín. Aktívna zložka etephon znižuje negatívny vplyv sucha na obsahu chlorofylu, ale tiež vedie k zníženiu obsahu chlorofylu v dolných listoch (F-1).



Graf 3: Obsah chlorofylu v listoch v poradí od praporcového listu (F) ku štvrtému listu zhora (F-3)

● — Wet  
○ — Dry

## LITERATÚRA

- 1/ Assman, S.: Signal transduction in guard cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 1993, 345-375
- 2/ Bezdičková, A.: Ako správne používať regulátory pri pestovaní obilnín. In: *Ako udržať ziskovosť pestovania obilnín*. Praha, 2011, s.59-63.
- 3/ Brestič, M., Olšovská, K.: Vodný stres rastlín: príčiny, dôsledky, perspektívy. Nitra: SPU, 2001. 15-70 s. ISBN 80-7137-902-6.
- 4/ Davies, W. J., Zhang.: Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. 1991, *Ann.Rev.Pl.Physiol.Pl.Mol.Biol.* 42, 55-76.
- 5/ Lewitt, J.: *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress*, J. Willey, New York. 1980, 437-439.
- 6/ Raschke, K.: Involvement of abscisic acid in the regulation of gas exchange: evidence and inconsistencies. In: *Plant Growth Substances* (P.F.Wareing ed.) Academic Press, London. 1982, 581-590.
- 7/ Richardson, K., et al.: *Synthesis Report from Climate Change Global Risks, Challenges and Decisions*. Copenhagen, Denmark: University of Copenhagen, 2009.
- 8/ Tardieu, F. – Davies, W.J.: Integration of hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and water status of droughted plants. *Pl. Cell and Environment*, 16, 1993, 341-349.

## Poděkování

Príspevok vznikol ako výstup projektu Internej grantovej agentúry AF MENDELU číslo: IP 23/2015 “Vliv regulátorů růstu na efektivitu využití vody a odolnost vůči suchu u vybraných odrůd ozimé pšenice“.

## FORMOVANIE ÚRODY PŠENICE LETNEJ V KLIMATICKY TEPLEJ OBLASTI

### FORMATION OF WHEAT HARVEST IN CLIMATIC WARM AREA

Eva Candráková

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FAPZ, katedra rastlinnej výroby, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Eva.Candrakova@uniag.sk

#### Summary

In the years 2007/2008 to 2009/2010 winter wheat of variety Verita has been grown in warm climate regions of Slovakia. We investigated the influence of growing conditions, soil tillage methods O1 (plowing to 0.24 m), O2 (plowing to 0.15 m), O3 (disk tools to 0.12 meters) and variants of fertilization H1 (control), H2 (fertilization P and K), H3 (P and K fertilization + post harvest residues (red clover) on the yield and quality of grain. The highest grain yield was achieved in 2008 (5.46 t ha<sup>-1</sup>) and the lowest yield in 2010 (4.23 t ha<sup>-1</sup>) where sufficient water supply resulted primarily in the production of straw (5.79 t ha<sup>-1</sup>). Significantly the highest grain yield (5.81 t ha<sup>-1</sup>) was after utilization of the disc plowing (O3) and H3 variant (5.36 t ha<sup>-1</sup>). The quality of wheat grain was positively influenced by fertilization with fertilizers and post harvest residues. The grain quality was satisfactory and it complied with standard class B.

*Key words: winter wheat, fertilization, soil cultivation, yield, crude protein*

#### Súhrn

V rokoch 2007/2008 až 2009/2010 bola v klimaticky teplej oblasti Slovenska pestovaná pšenica letná forma ozimná, odroda Verita. Skúmali sme vplyv podmienok pestovania, spôsobov obrábania pôdy O1 (orba do 0,24 m), O2 (orba do 0,15 m), O3 (tanierové náradie do 0,12 m) a variantov hnojenia H1 (kontrola), H2 (hnojenie P a K), H3 (hnojenie P a K + pozberové zvyšky predplodiny (ďateľina lúčna) na úrodu a kvalitu zrna. Vysoko preukazne najvyššia úroda zrna bola dosiahnutá v roku 2008 (5,46 t.ha<sup>-1</sup>) a najnižšia v roku 2010 (4,23 t.ha<sup>-1</sup>), kde dostatok vody pôsobil najmä na produkciu slamy (5,79 t.ha<sup>-1</sup>). Preukazne najvyššia úroda zrna (5,81 t.ha<sup>-1</sup>) bola po tanierovaní (O3) a na variante H3 (5,36 t.ha<sup>-1</sup>). Kvalitu zrna pšenice pozitívne ovplyvnilo hnojenie priemyselnými hnojivami a pozberovými zvyškami predplodiny. Kvalita zrna bola vyhovujúca a podľa normy zodpovedala triede B.

*Kľúčové slová: pšenica, hnojenie, obrábanie pôdy, úroda, bielkoviny*

## ÚVOD

Obilniny sú najvýznamnejšou skupinou plodín, ktorých hlavný produkt má nezastupiteľný význam vo výžive ľudí a zvierat. Na Slovensku sa v roku 2014 pestovali na výmere 761,7 tis. hektárov.- z toho pšenica zaberala plochu 380,2 tis. ha, čo je 49,91 %. V roku 2013 sa urodilo 4,58 t zrna z 1 ha a rok 2014 bol zatiaľ rekordný s úrodou zrna 5,27 ton /4/.

Vysoké a stabilné úrody poľných plodín ovplyvňujú faktory prostredia a výživa dusíkom /6/. Vplyvom dusíkatého hnojenia sa dosiaľ udržuujú úrody, najmä v poveternostne priaznivých rokoch, na prijateľnej úrovni, čo ale vedie k odberu živín z pôdných zásob. Tento mobilizačný (koristnícky) stav je dlhodobo neudržateľný /11/.

Základ systému harmonickej výživy a hnojenia rastlín s cieľom dosiahnuť uzatvorený kolobeh živín s minimálnymi stratami tvoria hospodárske hnojivá /3/.

Z ďalších faktorov má dôležitú úlohu technologický systém zameraný na rôzne spôsoby obrábania pôdy. Klasické spôsoby sú nahradzované minimalizačnými a bezorbovými technológiami, ktoré šetria spotrebu pohonných hmôt a zvyšujú výkonnosť strojov a náradí.

Cieľom príspevku je posúdiť vplyv spôsobov obrábania pôdy, hnojenia a faktorov prostredia na úrodu a kvalitu zrna pšenice letnej formy ozimnej.

## MATERIÁL A METÓDY

Na Experimentálnej báze FAPZ SPU Nitra - Dolná Malanta (48°19' s.z.š., 18°09' v.z.d.) je realizovaný dlhoročný poľný polyfaktorový pokus, kde súčasťou osevného postupu je pšenice letná f. ozimná nasledujúca po predplodine ďateline lúčnej. Lokalita patrí do klimatického okrsku A3, ktorý je charakterizovaný ako teplý, mierne suchý so sumou teplôt (TS) 2600-3000 °C ročne. Podoblasť je veľmi suchá, klimatický okrsk s miernou zimou. Pôdnym typom je hnedozem. Hodnoty objemovej hmotnosti prekročili kritickú hranicu 1450 kg.m<sup>-3</sup>. Zeminy z orníc na lokalite sú prachovito-hlinité (10). Teplotné a vlhové podmienky v rokoch pokusu sú uvedené na Obr. 1.

Pokus bol založený metódou kolmo delených blokov s parcelkami v 3 opakovaniach s veľkosťou jednej parcelky 20 m<sup>2</sup> (10 x 2,0 m). Skúmané boli tri spôsoby obrábania pôdy a v rámci nich tri úrovne hnojenia.

Spôsoby obrábanie pôdy: O1 - konvenčný (stredne hlboká orba, 0,24 m), O2 - redukovaný (plytká orba, 0,15 m), O3 - minimalizačný (tanierové náradie, 0,12 m).

Variety hnojenia: H1 - kontrolný variant (bez hnojenia), H2 - hnojenie priemyselnými hnojivami (P a K), H3 - hnojenie priemyselnými hnojivami + pozberové zvyšky predplodiny.

Živiny boli doplnené na základe bilančnej metódy na úrodu zrna 6 t.ha<sup>-1</sup>. Použitý normatív odberu živín na 1 tonu úrody hlavného produktu a príslušného množstva slamy pre pšenicu letnú formu ozimnú podľa autorov /1/: N 25 kg, 5,7 P kg, 21 kg K. Obsah živín v pôde je uvedený v Tab. 1.

Tab. 1: Agrochemický rozbor pôdy (Mehlich III), experimentálna báza Dolná Malanta

Rok	Obsah živín v pôde (mg kg <sup>-1</sup> )			pH <sub>KCl</sub>	Humus (%)
	P	K	Mg		
2008	81	332	235	6,20	2,03
2009	84	310	241	6,13	2,02
2010	88	305	325	6,08	2,12

Pred zberom pšenice kombajnom boli odobraté vzorky rastlín, rozborom ktorých sa vyhodnocovali prvky úrodnosti. Výsledky boli vyhodnotené štatisticky programom Anova za použitia Tukey testu.

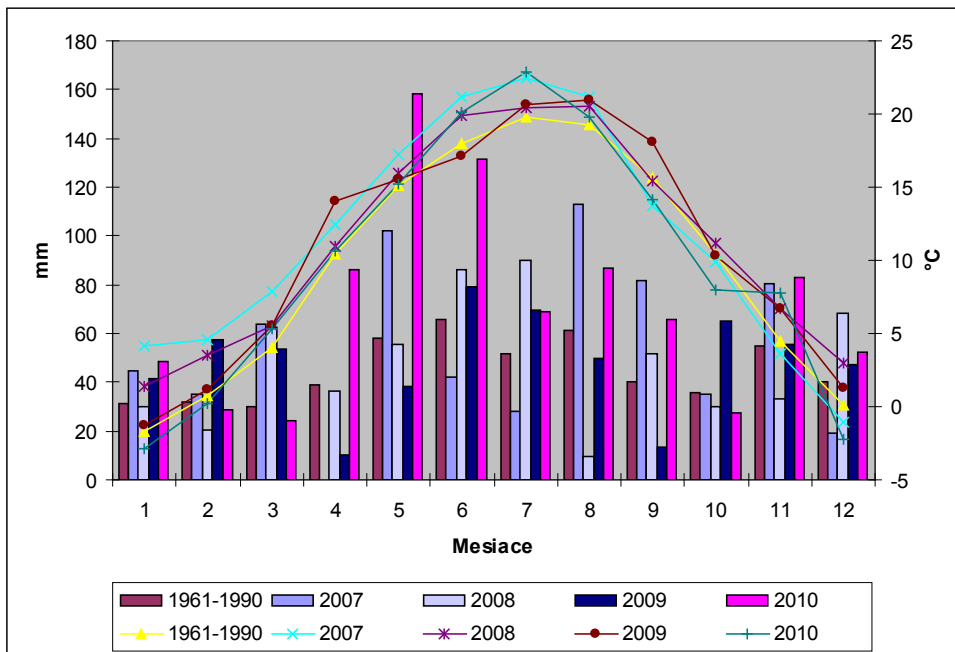
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Obilniny vo všeobecnosti patria medzi plodiny, ktoré majú dobré schopnosti využívať agrometeorologické faktory prostredia na tvorbu úrody. Vzhľadom k zložitým vzťahom medzi množstvom vody v rastline a v okolitom prostredí, vrátane pôdy, nie je možné zaviesť jednoduché kritérium, podľa ktorého by bolo možné objektívne hodnotiť ako veľkému stresu z nedostatku vody je rastlina vystavená /9/.

Ozimná forma pšenice má dlhé vegetačné obdobie a nakoľko sa seje na jeseň, dôležité sú najmä vlhové podmienky v termíne sejby pre vzchádzanie a tvorbu odnoží. Priebeh teplotných a vlhových podmienok je na Obr. 1.

Produkčný proces je cieľavedome realizovaný výrobný systém, pri ktorom sa využívajú podmienky vonkajšieho prostredia pri racionálnej a ekologicky únosnej technológii pestovania cez vyššie produkčné potenciály odrôd s toleranciou voči nepriaznivým a meniacim sa faktorom prostredia. Výsledkom produkčného procesu porastu je množstvo vyprodukovanej suchej hmoty,

ktorú môžeme vyjadriť ako biologická úroda. Cieľom je získať nielen vysokú biologickú úrodu, ale aj hospodársku úrodu. Pomer medzi úrodou hospodárskou a úrodou biologickou vyjadrujeme zberovým indexom /5/.



Obr. 1 Teplotné a vlhové podmienky v rokoch pestovania pšenice letnej formy ozimnej a dlhoročný priemer (1961-1990)

Zo štatistického vyhodnotenia vyplýva, že úroda zrna a fytomasy bola vysoko preukazne ovplyvnená ročníkom. Vysoko preukazne najvyššia úroda zrna bola dosiahnutá v roku 2008 ( $5,46 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) a paradoxne najnižšia vo vlhkom roku 2010 ( $4,23 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ), kde dostatok vody pôsobil najmä na produkciu slamy ( $5,79 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ), ktorá bola vyššia na úkor zrna (Tab. 2). Hanáčková /2/ vo svojich pokusoch potvrdila, že úroda zrna pšenice bola ovplyvnená ročníkom, spôsobom obrábania pôdy a hnojením.

Vysoká biologická a hospodárska úroda sa dosiahne, ak sú v súlade faktory, ktoré určujú veľkosť asimilačného aparátu a dĺžku jeho aktívnej činnosti, výkonnosť asimilačného aparátu (rýchlosť fotosyntézy, rýchlosť transportu a rozdelenie asimilátov medzi orgány, počet, veľkosť zŕn a ich aktivitu v akumulácii asimilátov). Zložitosť procesu je v tom, že podmienky pre tvorbu biologickej úrody môžu byť iné, ako podmienky pre tvorbu hospodárskej úrody /8/, čo sa potvrdilo aj v našom pokuse.

Zo spôsobov obrábania pôdy sa najvyššie úrody zrna ( $5,81 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) aj slamy ( $7,82 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) dosiahli po použití minimalizačnej technológie.

Variety hnojenia pôsobili na úrodu fytomasy pozitívne. Najvyššia úroda zrna ( $5,36 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) a slamy ( $7,44 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) bola dosiahnutá po aplikácii priemyselných hnojív a pozberových zvyškov predplodiny. /7/ odporúča hnojenie plodín dusíkom na základe ich požiadaviek a obsahu v pôde v čase aplikácie hnojiva.

Pomer medzi úrodou zrna a fytomasy vyjadruje zberový index, ktorý bol za všetky tri roky za obrábanie aj za varianty hnojenia pomerne vyrovnaný. Najviac bol ovplyvnený podmienkami ročníka, kedy vo vlhkom roku 2010 sa pohyboval na úrovni 0,31 a v roku 2009 až na úrovni 0,50. Potvrdili sme tak poznatky, ktoré uvádza /5/, že zberové indexy (ZI) porastov obilnín sa všeobecne pohybujú od 0,35 do 0,50. Pri speňažovaní finálneho produktu, okrem výšky úrody, významnú úlohu zohráva i jej kvalita. Zrno pšenice letnej je využívané prednostne na potravinárske účely. Požiadavky na kvalitu *Triticum aestivum* L. sú uvedené v norme STN 46 1100-2.

Tab. 2: Úrody fytohmoty pšenice letnej f. ozimnej odrody Verita, vyhodnotené analýzou rozptylu, Tukey test

Faktor		Úroda zrna (t.ha <sup>-1</sup> )	Úroda slamy (t.ha <sup>-1</sup> )
		$\alpha 0,05 = 0,0932$	$\alpha 0,05 = 0,1060$
Rok	2008	5,46c	5,58b
	2009	4,94b	5,01a
	2010	4,23a	5,79c
Obrábanie pôdy	Konvenčné	4,17a	5,91a
	Redukované	4,64b	6,66b
	Minimalizačné	5,81c	7,82c
Hnojenie	H1	4,34a	6,06a
	H2	4,93b	6,90b
	H3	5,36c	7,44c

Podľa technických požiadaviek na kvalitu sa potravinárska pšenica letná určená na mlynské spracovanie člení na tieto triedy kvality: E - elitná, A - štandardná, B - ustanovuje minimálne požiadavky na kvalitu pre intervenčný nákup pšenice, P - pečivárska.

Redukované obrábanie pôdy (O<sub>2</sub>) priaznivo vplývalo na väčšinu ukazovateľov (obsah mokrého lepku, obsah NL, hodnotu sedimentačného testu). Naopak, minimalizačný postup pôsobil na všetky hodnotené zložky kvality zrna negatívne, okrem roka 2010, kedy sa vyrovnal hodnotám z redukovaného obrábania pôdy. Technologickú kvalitu zrna pšenice pozitívne ovplyvnilo hnojenie priemyselnými hnojivami a pozberovými zvyškami predplodiny (H<sub>3</sub>). Na základe dosiahnutých výsledkov možno zrno pšenice zaradiť do triedy B, v ktorej sa vyžaduje obsah dusíkatých látok 10,5 %, obsah mokrého lepku 23 %, číslo poklesu 220 s a sedimentačný test 22 ml.

## LITERATÚRA

- /1/ Fecenko, J., Ložek, O. et al.: Výživa a hnojenie poľných plodín. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2000 : 441 s.
- /2/ Hanáčková, E.: Výživa a hnojenie rastlín v trvalo udržateľných poľnohospodárskych systémoch. In *Demo, M., Látečka, M. et al.: Projektovanie trvalo udržateľných poľnohospodárskych systémov v krajine*. Nitra: spu, bratislava: VÚPOP, hydromeliorácie, š. p., 2004 : 723 s.
- /3/ Hanáčková E.: Vplyv dusíkatej výživy na úrodu a kvalitu zrna ozimnej pšenice. In *Agrochémia*. SPU Nitra a Duslo, a.s., Šaľa, 2012 : XVI. (52), s. 3 - 9.
- /4/ Jamborová, M.: Obilniny. Situačná a výhľadová správa. MPRV SR. Roč. XXI, 2014 : č. 1.
- /5/ Kostrej, A. et al.: Ekofyziológia produkčného procesu porastu a plodín. SPU v Nitre, 1998 : 187 s.
- /6/ Michalík I.: Dusíkatá výživa a produkčný proces ozimnej pšenice. In *Agrochémia*. SPU Nitra a Duslo, a.s., Šaľa, VI. (42), 2002 : s. 24 - 27.
- /7/ Ondříšek, P.: Dynamika anorganického dusíka v pôde a možnosti jej regulácie. Vedecká monografia. SPU v Nitre, 2013 : 97 s.
- /8/ Petr, Černý, Hruška et al.: Tvorba výnosu hlavných poľných plodín. Praha, 1980 : 448
- /9/ Procházka, S. et al.: Fyziologie rostlin. Praha : Academia, 1998 : 484 s.
- /10/ Tobiášová, E., Šimanský, V.: Kvantifikácia pôdných vlastností a ich vzájomných vzťahov ovplyvnených antropickou činnosťou. 1. vydanie. Nitra, SPU. 2009 : s. 114.
- /11/ Vaněk, V. et al.: Současná úroveň výživy a hnojení dusíkem. Racionální použití hnojiv. Praha : ČZU, 2007 : s. 11 - 19.

## Pod'akovanie

Projekt VEGA 1/0816/11 „Produkčný proces poľných plodín pri rôznych systémoch obrábania pôdy, aplikácie priemyselných hnojív a zvyškov rastlín s ohľadom na zachovanie a zvyšovanie úrodnosti pôdy“

## KOVY AKO ABIOTICKÝ FAKTOR VPLÝVAJÚCI NA VITALITU RASTLÍN

### *METALS AS ABIOTIC FACTOR EXERCISE AN INFLUENCE ON PLANTS' VITALITY*

Agáta Fargašová, Marianna Molnárová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra environmentálnej ekológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, fargasova@fns.uniba.sk

#### *Summary*

The contribution provide brief review of works mainly focused on evaluation of physiological and biochemical mechanisms related to stress induced by heavy metals presence in the environment. Describes metals influence on growth and production parameters, including seeds germination, and physiological and biochemical parameters evaluating contents of photosynthetic pigments, proteins, phytochelatins and metallothioneins, heat shock proteins (HSPs) and enzymes activity.

*Key words: metals; phytotoxicity; growth, produce, physiological and biochemical parameters*

#### *Souhrn*

Príspevok podáva stručný prehľad prác zameraných na zhodnotenie predovšetkým fyziologických a biochemických mechanizmov odpovedí rastlín na stres vyvolaný prítomnosťou ťažkých kovov. Popisuje vplyv kovov na rastové a produkčné parametre, vrátane klíčivosti semien, ako aj fyziologické a biochemické parametre hodnotiace obsah fotosyntetických pigmentov, bielkovín, fylochelatínov a metalotioneínov, proteínov teplotného šoku (HSPs) a aktivitu enzýmov.

*Kľúčové slová: kovy; fytotoxicita; rastové, produkčné, fyziologické a biochemické parametre*

## ÚVOD

Kovy sa dostávajú do životného prostredia ako z prírodných (vulkanická činnosť, pevninový prach) tak aj z antropogénnych zdrojov (baníctvo, spaľovanie fosílnych palív, poľnohospodárstvo - používanie fosfátových hnojív, armáda, metalurgia, a pod.) a ich emisie vyúsťujú do akumulácie ťažkých kovov v ekosystémoch. Od začiatku priemyselnej revolúcie sa znečistenie biosféry ťažkými kovmi dramaticky zvýšilo. Z hľadiska potrieb všetkých živých organizmov, môžeme o ťažkých kovoch hovoriť z dvoch hľadísk: (1) Kovy ako Cu, Zn, Ni, Co, Fe, Mo a Mn patria k esenciálnym prvkom, ktoré hrajú významnú úlohu pri expresii génov, biosyntéze bielkovín, nukleových kyselín, rastových faktorov, chlorofylu a sekundárnych metabolitov a pri metabolizme uhľovodíkov a lipidov. Všetky tieto procesy si vyžadujú ich stopové množstvá a pri prekročení týchto nízkych koncentrácií sa začnú prejavovať toxicky /1/. (2) Kovy ako Pb, Cd, Cr, As, Hg, ktoré sa prejavujú toxicky už pri nízkych koncentráciách. Pôdy kontaminované rôznymi kombináciami a koncentraciami akýchkoľvek kovov ovplyvňujú nepriaznivo zdravie nielen miliónov ľudí na celom svete ale aj vitalitu a produktivitu ekosystémov. Z hľadiska zdravotného sa dá povedať, že dnes je najmä v Bangladéši a v Indii v oblasti západného Bengálska viac ako 400 mil. ľudí vystavených riziku otravy As z pitnej vody a pôdy /2/. Kontaminácia prostredia takými kovmi ako Pb, Cd, Cr a As sa prejavuje ako u ľudí tak aj u zvierat v dôsledku poškodenia DNA mutagénnym a karcinogénnym účinkom /3/. Vplyv ťažkých kovov sa výrazne odráža aj na kvalite rastlínstva vyskytujúceho sa v kontaminovaných oblastiach. Kým pri nízkych koncentráciách, napr. Ni, je klíčenie a rast rôznych plodín stimulovaný /4/, vysoké koncentrácie rast ako koreňa tak aj výhonkov inhibujú /5/.

Za najtoxickéjšie kovy sa z hľadiska antropogénnej činnosti považujú Pb, Hg, Cd, Cu a As. Ich nebezpečnosť spočíva v tom, že sú v životnom prostredí perzistentné, nerozložiteľné a bez

zásahu ostávají v pôde po celé stáročia, napr. retenčný čas Pb je 150-5000 rokov /6/. Kontaminácia ťažkými kovmi dosahuje toxické hladiny v ovzduší, pôde a vode v mnohých oblastiach sveta a výrazne zasahuje do potravinových reťazcov. Jednou z možností, ako znížiť ich environmentálne dopady, je zredukovanie ich rozšírenia. Paradoxne, hoci rastliny sú jednou z ciest, ktorou sa toxické kovy v rámci potravinových reťazcov dostávajú k človeku, poskytujú aj možnosť ako ich obsah v prostredí zredukovať. Fytoremediácie, ktoré sú pomerne lacné a neinvazívne, poskytujú možnosť extrakcie, sequestrácie a/alebo detoxikácie ťažkých kovov a iných polutantov. Sú ekologicky vhodnou alternatívou k drahým priemyselným čisteniam /7/. Prežitie rastlín v kovmi kontaminovanom prostredí je zaistené komplexom bunkových ochranných mechanizmov, z ktorých najdôležitejšími sú (1) de novo syntéza fytochelatínov a metalotioneínov, ktoré kovy viažu a takto ich vyradujú z aktívneho metabolizmu bunky; (2) syntéza homologov HSP70, HSP90 (heat shock protein), a pod; a (3) tvorba a funkcia antioxidantných systémov. Okrem týchto biochemických zmien zasahujúcich do fyziológie rastlín sa kontaminácia prostredia ťažkými kovmi výrazne odráža aj na morfológii, anatómii a produkčnosti rastlín.

## VPLYV ŤAŽKÝCH KOVOV NA RASTOVÉ A PRODUKČNÉ PARAMETRE RASTLÍN

Pojem vitalita v sebe odráža životaschopnosť, ktorá umožňuje živým organizmom v prostredí existovať a rozmnožovať sa. Často je ovplyvnená intenzitou a priebehom fyziologických a metabolických procesov, ktoré sa dajú hodnotiť ako biochemicky tak aj morfológicky.

### *Vplyv kovov na klíčivosť semien*

Väčšina ťažkých kovov je pre rastliny neesenciálna a aj tie, ktoré sa zaraďujú medzi esenciálne sú vo vyšších koncentráciách toxické, poškodzujú metabolizmus a ovplyvňujú rast a reprodukciu /8/. Pokiaľ ide o klíčivosť semien, tak tá je ovplyvnená ako druhom rastliny tak aj koncentráciou kovu a dĺžkou expozície. Všeobecne sa uvádza, že semená sú na prítomnosť kovov menej citlivé ako semenáčky /8, 9/. Nepriaznivý vplyv kovov na klíčivosť semien sa potvrdil aj pri hyperakumulátoroch, kedy Pb v koncentrácii 250 µg/ml znížilo klíčivosť *Brassica pekinensis* Rupr. na 66 % a po zvýšení jeho koncentrácie na 1000 µg/ml dosahovala klíčivosť len 43 % /8/.

### *Vplyv kovov na rast rastlín*

Väčšina ohlasov vzťahujúcich sa na hodnotenie environmentálneho stresu na rastliny sa zameriava na rast, diferenciáciu a fyziologické parametre /10/. Často sa objavujú zmenami sú chloróza, stáčanie listov a zakrpatenosť rastlín. Významným parametrom pri hodnotení toxicity kovov je dĺžka koreňa a výhonku a s intenzitou rastu súvisiaca produkcia biomasy. Všeobecne sa uvádza, že nízke koncentrácie kovov rast koreňa stimulujú a pri vyšších koncentráciách je jeho rast inhibovaný intenzívnejšie ako rast výhonku /11/. Vplyv kovov na rast rastlín závisí od fázy ich vývoja a semenáčky sú vývojovým štádiom, ktoré je prítomnosťou polutantov veľmi ľahko poškodzované /12, 13/. Redukcia vitality koreňov v dôsledku stresu je uvádzaná pri mnohých druhoch rastlín a ťažkých kovov (Pb, Zn, Cu, Cd, Hg, Ni, Cr, Zn) /9,11, 14, 15, 16/. Ťažké kovy ovplyvňujú v rastlinách delenie buniek, pričom ich účinok je rôzny a závisí od koncentrácie /8/.

Pokiaľ ide o ostatné časti rastlín, tak toxické účinky kovov sa prejavujú aj na raste výhonkov a počte listov, ale redukcia je zvyčajne miernejšia ako pri koreni /14, 16/.

Kovy výrazne ovplyvňujú aj produkciu ako čerstvej tak aj suchej biomasy, pričom v závislosti od koncentrácie kovu dochádza často k lineárnej redukcii čerstvej hmotnosti a zvýšeniu hmotnosti sušiny. Pokles čerstvej hmotnosti sprevádzaný zvýšením hmotnosti sušiny je výsledkom obmedzeného príjmu vody a pravdepodobne zväčšenia buniek /16, 17/. Ako uvádza Dutta /18/ pri vysokých koncentráciách kovov sa redukuje selektivita a permeabilita bunkových membrán, čo umožňuje rýchlejší vstup kovov do bunky.



## VPLYV ŤAŽKÝCH KOVŮ NA FYZIOLOGICKÉ A BIOCHEMICKÉ PARAMETRE RAS TLÍN

Účinky kovů na některé fyziologické procesy v rostlinách sú pri nízkých a vysokých koncentráciách protichodné. V prípade slabého stresu z prítomnosti kovů sa v rastlinách môžu pozorovať stimulačné reakcie, pri ktorých sa vytvára značné množstvo metabolických produktů, akými sú glutation (GSH), kyselina oxálová, histidín, citrát a kovy viažuce proteíny. Tieto produkty umožňujú jednak naviazanie kovů jednak ich detoxikáciu /8/. Naopak, vysoké koncentrácie kovů vedú ku zrýchleniu metabolizmu a zvýšenému vstupu ťažkých kovů do buniek. Ak je metabolizmus inhibovaný, objavuje sa toxicita spôsobená často znížením príjmu živín /19/, zmenami v metabolizme dusíka /20/, bilancii vody a inhibícií otvárania stomatů /21/.

### *Vplyv kovů na obsah chlorofylov a fotosyntetický systém*

Fotosyntéza je zložitý, niekoľkostupňový proces odohrávajúci sa v chloroplastoch obsahujúcich asimilačné farbivá, ktorých základ tvoria chlorofyly a ako doplnkové pigmenty sú v nich prítomné karotenoidy (karotény a xantofyly) a fykobilíny. Je to proces, ktorý je citlivý na stres vyvolaný kovmi. Kovy pôsobia priamo na biosyntézu chlorofylu /22/ a správny vývoj chloroplastů /23/. Pokiaľ ide o obsah zelených pigmentů, tak rastliny vystavené kovom vykazujú výrazné zníženie obsahu chlorofylov, čo vedie k enormnému poklesu intenzity fotosyntézy. Tento pokles je priamo závislý na koncentrácii kovu. Redukcia obsahu chlorofylov je výsledkom zásahu kovů do mnohých metabolických reakcií, akými sú inhibícia aktivity enzýmov  $\delta$ -aminolevulinovej kyseliny (ALA dehydrogenáza) /24/ a protochlorofylidovej reductázy /25/, nahradenie Mg v chlorofylovej štruktúre iným kovom /26/, pokles obsahu esenciálnych prvků zahrnutých do syntézy chlorofylu, akými sú  $Fe^{2+}$  a  $Zn^{2+}$  /25, 26/, deštrukcie membrány chloroplastů lipidovou peroxidáciou spôsobenou zvýšením peroxidázovej aktivity a nedostatkom antioxidantů, akými sú karotenoidy /27/, pokles syntézy chlorofylov a inhibícia aktivity niektorých enzýmov Calvinovho cyklu /14, 28/. Dá sa povedať, že chloroplasty obsahujú veľa rôznych častí, ktoré reagujú na prítomnosť kovů a preto sa na hodnotenie priameho účinku kovů dajú použiť akékoľvek zmeny v syntéze chlorofylov.

### *Vplyv kovů na obsah karotenoidů*

Karotenoidy pôsobia vo fotosyntéze ako doplnkové pigmenty a ako farbivo v kvetoch a plodoch. Sú to neenzymatické antioxidačné pigmenty, ktoré chránia chlorofyl, membránu a genetický materiál bunky pred ROS vyvolaným v dôsledku stresu z prítomnosti ťažkých kovů /29/. Zníženie obsahu karotenoidů je bežnou odpoveďou na toxicitu kovů /30/, ale zvýšenie jeho obsahu poukazuje na jeho dôležitú úlohu pri detoxikácii ROS /31/. Úlohu karotenoidů pri ochrane bunky a jej komponentů v prítomnosti ťažkých kovů potvrdzuje aj skutočnosť, že ich produkcia sa pri nižších koncentráciách kovů zvyšuje, ale pri vysokých koncentráciách (100  $\mu$ M) kovů sa aktivujú niektoré mechanizmy, ktoré karotenoidy degradujú, v dôsledku čoho dochádza k poklesu ich množstva.

### *Obsah bielkovín a aminokyselín*

Vplyvom environmentálneho stresu často dochádza k poškodeniu lipidů a bielkovín /32/ a akákoľvek zmena týchto látok sa dá považovať za dôležitý indikátor oxidačného stresu v rastlinách. Predpokladá sa, že pokles obsahu celkových rozpustných bielkovín v dôsledku stresu vyvolaného ťažkými kovmi, môže vyvolať zvýšenú aktivitu proteáz /33/, rôzne štruktúrne a funkčné modifikácie pri denaturácii a fragmentácii bielkovín /34/, crossing-over DNA proteínů /35/, interakcie s tiolovými skupinami bielkovín a ich nahradenie ťažkými kovmi v metaloproteínoch /14/. Zvýšenie obsahu celkových rozpustných bielkovín v dôsledku stresu z prítomnosti ťažkých kovů môže súvisieť s indukciou syntézy stresových bielkovín, akými sú enzýmy zahrnuté do Krebsovho cyklu, biosyntézy glutatiónu a fytochelatínu (PCs) a niektorých bielkovín teplotného šoku (HSPs) /36/.

### ***Fytochelatíny (PCs)***

Jedinečnosť rastlín a niektorých húb spočíva v ich schopnosti produkovať v prítomnosti kovov peptidy viažuce kovy nazývané fytochelatíny (PCs) /37/. Syntézu PCs stimulujú mnohé kovy, ale tvorba PC-kov komplexov sa sleduje hlavne pri Cd a Cu. Len niekoľko prác uvádza, že PCs chelatujú aj s Ag, Hg, Pb a Zn /38, 39/. V prípade Cd boli popísané dva PC-kov komplexy: s nízkou molekulovou hmotnosťou (LMW) PC-Cd komplex a stabilnejší PC-CdS komplex s vysokou molekulovou hmotnosťou (HMW), ktorý ešte navyše obsahuje v kyslom prostredí nestabilný sulfid /39/. Výskyt a lokalizácia dvoch komplexov poukazuje, že PC je cytoplazmatický Cd/kov zberač, ktorý zabezpečuje ukladanie kovov do vakuol vo forme stabilných HMW PC-CdS komplexov. Okrem PCs môžu rastliny syntetizovať aj malé na cysteín bohaté proteíny známe ako metalotioneíny /40/.

### ***Metalotioneíny (MTs)***

Metalotioneíny (MTs) sú na cysteín bohaté nízkomolekulové proteíny (6-7 kDa), ktoré sa vyskytujú v živočíchoch, eukaryotických a prokaryotických organizmoch a len v niektorých druhoch rastlinách /41/. Biosyntéza MTs je regulovaná na úrovni transkripcie a stimuluje ju niekoľko faktorov ako hormóny, cytotoxické látky a kovy, vrátane Cd, Zn, Hg, Cu, Au, Ag, Co, Ni a Bi /37, 40, 41/. Hoci sa predpokladá, že MTs môžu hrať úlohu pri metabolizme kovov, ich úloha v rastlinách ostáva v dôsledku nedostatku informácií o ich presnej funkcii nejasná /42/. Môžu pôsobiť aj ako antioxidanty, hoci dôkazy o tom zatiaľ chýbajú /42/, alebo môžu zohrávať úlohu pri obnove plazmatickej membrány /43/.

### ***Proteíny teplotného šoku (HSPs) – heat shock proteins***

Pre HSPs je charakteristické, že ich obsah sa pri raste rôznych organizmov v teplotách presahujúcich ich optimum zvyšuje. Ich výskyt sa potvrdil vo všetkých skupinách živých organizmov, sú klasifikované na základe veľkosti ich molekúl a prejavujú sa pri rôznych typoch stresu, vrátane 5 ťažkých kovov /44/. Pôsobia ako molekulárny sprievodcovia bežných bielkovín, ale v prítomnosti stresu môžu mať úlohu aj v ochrane a obnove bielkovín. Zvýšenie ich prejavu v prítomnosti stresu vyvolaného ťažkými kovmi sa uvádza aj v literatúre /44, 45/.

### ***Aktivita enzýmov***

Indikátorom lipidovej peroxidácie je v rastlinách obsah malondialdehydu (MDA). Jeho zvýšený obsah v listoch, výhonkoch a koreňoch semenáčikov v prítomnosti kovov potvrdili aj Pang et al. /46/ a Molnárová a Fargašová /14/. Huang a Hong /47/ uvádzajú, že akumulácia MDA v semenáčikoch rastlín závisí od koncentrácie kovu a peroxidácia membrány v nadbytku voľných radikálov je výsledkom vážnych vplyvov ťažkých kovov na rastliny.

Superoxiddizmutáza (SOD), peroxidáza (POD) a kataláza (CAT) sú dôležitými enzýmami pri adaptácii rastlín k environmentálnemu stresu a nazývajú sa ochranným enzymatickým systémom rastlín. Harmonické interakcie týchto enzýmov vytvárajú rovnováhu medzi produkciou a elimináciou voľných radikálov a udržiavajú v rastlinách ich nízku hladinu, čím vytvárajú ochranu proti poškodeniu buniek voľnými radikálmi. Aktivity POD, SOD a CAT sa pri strese vyvolanom ťažkými kovmi, napr. Cd, Cr<sup>6+</sup>, Hg, Ni, Pb a Fe, zvyčajne zvyšujú už pri ich nízkych koncentráciách /8, 46/, ale so zvyšovaním sa koncentrácie ťažkých kovov ich aktivita klesá.

Okrem SOD, POD a CAT ovplyvňujú ťažké kovy aj aktivitu iných enzýmov, ako alkoholdehydrogenázy (ADH), amylázy, DNázy, RNázy, proteínázy a nitrát reduktázy /8/. Väčšina z týchto účinkov je inhibičná.

## **ZÁVER**

Na stres vyvolaný prítomnosťou ťažkých kovov sa rastliny adaptovali na fyziologickej, biochemickej aj molekulárnej úrovni tak, aby potlačili ich toxické účinky. Práve sledovanie toxických účinkov je dôležité pre pochopenie mechanizmov, ktorými rastliny na takýto stres odpovedajú. Zmeny, ktoré v rastlinách vyvolávajú ťažké kovy a poznanie ich podstaty otvára

možnosti zlepšení bioakumulačních schopností rostlin (genetické modifikácie) a ich následného využitia pri fytoremediáciách plôch kontaminovaných kovmi.

#### LITERATURA

- /1/ Rengel, Z.: Physiological mechanisms underlying differential nutrient efficiency of crop genotypes. In: Rengel, Z. (ed.): Mineral Nutrition of Crops, Food Products Press, NY, 1999: 231–269
- /2/ Chakraborti, D., Das, B., Nayak, B., Pal, A., Rahman, M. M., Sengupta, M.K., Hossain, M.A., Ahamed, S., Biswas, K.C., Sahu, M., Saha, K.C., Mukherjee, S.C., Pati, S., Dutta, R.N., Quamruzzaman, Q.: Groundwater arsenic contamination and its adverse health effects in the Ganga-Meghna-Brahmaputra plain. In: Kingsuk, R. (ed.): Arsenic Calamity of Groundwater in Bangladesh: Contamination in Water, Soil and Plants. Nihon University, Japan, 2008: 13–52
- /3/ Baudouin, C., Charveron, M., Tarrouse, R., Gall, Y.: Environmental pollutants and skin cancer, Cell Biology and Toxicology, 18, 2002: 341–348
- /4/ Mishra, D., Kar, M.: Nickel in plant growth and metabolism. Botanical Review, 40, 1974: 395–452
- /5/ Brune, A., Dietz, K.J.: A comparative analysis of element composition of roots and leaves of barley seedlings grown in the presence of toxic cadmium-, molybdenum-, nickel- and zinc concentrations. Journal of Plant Nutrition, 18, 1995: 853–868
- /6/ Friedland, A.J.: The movement of metals through soils and ecosystems. In: Shaw, A.J. (ed.): Heavy Metals Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects. CRC Press, Boca Raton, FL, 1990: 7–19
- /7/ Raskin, I.: Plant genetic engineering may help with environmental cleanup. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 93, 1996: 3164–3166
- /8/ Cheng, S.: Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms. Environmental Science and Pollution Research, 10, 2003: 256–264
- /9/ Fargašová, A.: Effect of Pb, Cd, Hg, As and Cr on germination and root growth of *Sinapis alba* seeds. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 52, 1994: 452–456
- /10/ Cseh, E.: Metal permeability, transport and efflux in plants. In: Prasad, M.N.V., Strazalka, K. (eds.): Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. London. Kluwer Academic Publishers, 2002: 1–36
- /11/ Cook, C.M., Kostidou, A., Vardaka, E., Lanaras, T.: Effects of copper on the growth, photosynthesis and nutrient concentrations of Phaseolus plants. Photosynthetica, 34, 1997: 179–193
- /12/ Fargašová, A.: Phytotoxic effects of Cd, Zn, Pb, Cu and Fe on *Sinapis alba* L. seedlings and their accumulation in roots and shoots. Biology Plantarum, 44, 2001: 471–473
- /13/ Fargašová, A.: Cd, Cu, Zn, Se and Pb effects on some physiological parameters (root growth, pigments production, accumulation) in plant *Sinapis alba*. Chemické Listy, 96, 2002: 499
- /14/ Molnárová, M., Fargašová, A.: Relationship between various physiological and biochemical parameters activated by cadmium in *Sinapis alba* L. and *Hordeum vulgare* L. Ecological Engineering, 49, 2012: 65–72
- /15/ Lešková, A., Molnárová, M., Fargašová, A.: Biochemický pohľad na príjem, metabolizmus a toxické účinky zlúčenín arzénu na rastliny. Chemické Listy, 106, 2012: 1110–1115
- /16/ Hasnain, S., Sabri, A.N.: Growth stimulation of *Triticum aestivum* seedlings under Cr-stresses by non-rhizospheric *Pseudomonad* strains. Environmental Pollution, 97, 1997: 265–273
- /17/ Fargašová, A., Markert, B., Mičieta, K.: Chromium and nickel phytotoxicity and genotoxicity. Chapter 4. In: Öztürk, M., Ashraf, M., Aksoy, A., Ahmad, M.S.A. (eds.): Phytoremediation for Green Energy. Springer Dordrecht Heidelberg NewYork London, 2015: 69–78
- /18/ Dutta, I.: Lead effects on some aspects of growth metabolism of forage Sorghum (*Sorghum vulgare*). Indian Journal of Experimental Biology, 18, 1980: 197–201
- /19/ Ghnaya, T., Slama, I., Messedi, D., Grignon, C., Ghorbel, M.H., Abdelly, C.: Effects of Cd<sup>2+</sup> on K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and N uptake in two halophytes *Sesuvium portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum*: Consequences on growth. Chemosphere, 67, 2007: 72–79
- /20/ Wang, L., Zhou, Q., Ding, L., Sun, Y.: Effect of cadmium toxicity on nitrogen metabolism in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found cadmium hyperaccumulator. Journal of Hazardous Materials, 154, 2008: 818–825
- /21/ Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gomez, M., Romero-Puertas, M.C., del Rio, L.A.: Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. Journal of Experimental Botany, 52, 2001: 2115–2126
- /22/ Ekmekçi, Y., Tanyolac, D., Ayhan, B.: Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. Plant Physiology, 165, 2008: 600–611
- /23/ Jin, X., Yang, X., Islam, E., Liu, D., Mahmood, Q.: Effects of cadmium on ultrastructure and antioxidative defense system in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator ecotypes of *Sedum alfredii* Hance. Journal of Hazardous Materials, 156, 2008: 387–397

- /24/ Padmaja, K., Prasad, D.D.K., Prasad, A.R.K.: Inhibition of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings by cadmium acetate. *Photosynthetica*, 24, 1990: 399–405
- /25/ Van Assche F, Clijsters H.: Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment*, 13, 1990: 195–206.
- /26/ Küpper, H., Küpper, F. Spiller, M.: In situ detection of heavy metal substitution chlorophylls in water plants. *Photosynthesis Research*, 58, 1998: 123–133
- /27/ Prasad, M.N.V., Strzalka, K.: Impact of heavy metals on photosynthesis. In: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J. (eds): *Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystem*. Springer, Berlin, 1999: 73–97
- /28/ Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.L.: Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 2005: 21–35
- /29/ Hou, W., Chen, X., Song, G., Wang, Q. Chang, C.C.: Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 2007: 62 – 69
- /30/ Fargašová, A., Pastierová, J., Svetková, K.: Effect of Se-metal pair combinations (Cd, Zn, Cu, Pb) on photosynthetic pigments production and metal accumulation in *Sinapis alba* L. seedlings. *Plant Soil and Environment*, 52, 2006: 8-15
- /31/ Chandra, R., Bharagava, R.N., Yadav, S. Mohan, D.: Accumulation and distribution of toxic metals in wheat (*Triticum aestivum* L.) and Indian mustard (*Brassica campestris* L.) irrigated with distillery and tannery effluents. *Journal of Hazardous Materials*, 162, 2009: 1514–1521
- /32/ Prasad, T.K.: Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *The Plant Journal*, 10, 1996: 1017–1026
- /33/ Palma, J.M., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Romero-Puertas, M.C., McCarthy, I. del Rio, L. A.: Plant proteases, protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes: *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 2002: 521–530
- /34/ John, P., Ahmad, P., Gadgil, K and Sharma, S.: Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemic parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. *International Journal of Plant Production*, 3, 2009: 65–76
- /35/ van Hoof, N.A.L.M., Hassinen, V.H., Hakvoort, H.W.J., Ballintijn, K.F., Schat, H.: Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke Populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type melophionein gene. *Plant Physiology*, 126, 2001: 1511–1526
- /36/ Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Kumar, R., Seth, C.S., Gupta, D.K.: Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatin and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere*, 65, 2006: 1027–1039
- /37/ Goldbrough, P.: Metal tolerance in plants: role of phytochelatin and metallothioneins. In: Terry, N., Banuelos, G., (eds.) *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. CRC Press LLC, 2000: 221–233
- /38/ Maitani, T., Kubota, H., Sato, K., Yamada, T.: The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelin and its desglycyl peptide) induced by variol metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiology*, 110, 1996: 1145–1150
- /39/ Dameron, C.T., Reese, R.N., Mehra, R.K., Kortan, A.R., Carroll, P.J., Steigerwald, M.L., Brus, L.E., Winge, D.R.: Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites. *Nature*, 338, 1989: 596–597
- /40/ Robinson, N.J., Tommey, A.M., Kuske, C. Jackson, P.J.: Plant metallothioneins. *Biochemical Journal*, 295, 1993: 1–10
- /41/ Kägi, J.H.R.: Overview of metallothioneins. *Methods in Enzymology*, 205, 1991: 613–626
- /42/ Hall, J.L.: Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Environmental Botany*, 53, 2002: 1–11
- /43/ Sal, D.E., Smith, R.D., Raskin, I.: Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 1998: 643–668
- /44/ Lewis, S., Handy, R.D., Cordi, B., Billingham, Z., Depledge, M.H.: Stress proteins (HSPs)2 methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology* 8, 1999: 351–368
- /45/ Wollgiehn, R., Neumann, D.: Metal stress response and tolerance of cultured cells from *Silene vulgaris* and *Lycopersicon peruvianum*: role of heat stress proteins. *Journal of Plant Physiology* 154, 1999: 547–553
- /46/ Pang, X., Wang, D., Peng, A.: Effect of lead stress on the activity of antioxidant enzymes in wheat seedlings. *Environmental Science*, 22, 2001:108–112 (In Chinese with English abstract)
- /47/ Huang, Y., Hong, R.: Induced free radical peroxidation injury of plants by cadmium. *Acta Botanica Sinica* 39, 1997: 522–526

## Pod'akovanie

Uvedená práca vznikla za finančnej podpory Grantu VEGA1/0098/14.

## STUDIUM BIOGENNÍHO POŠKOZENÍ LISTNATÝCH DŘEVIN V LESNÍM EKOSYSTÉMU NPR MILEŠOVKA

### *STUDY OF BIOGENIC DAMAGE OF DECIDUOUS TREES IN THE FOREST ECOSYSTEM OF MILEŠOVKA NNR*

Helena Hniličková<sup>1</sup>, František Hnilička<sup>1</sup>, Margita Kuklová<sup>2</sup>, Ján Kukla<sup>2</sup>, Zdeněk Krčka<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Česká zemědělská univerzita v Praze, Katedra botaniky a fyziologie rostlin, Kamýčká 129, 165 21 Praha 6  
– Suchdol, Česká republika, hnilickova@af.czu.cz

<sup>2</sup> Ústav ekológie lesa SAV, L. Štúra 2, 960 53 Zvolen, Slovenská republika, kuklova@savzv.sk

#### *Summary*

This work examines the deciduous trees in Milešovka National Nature Reserve. The area of interest was divided into five sampling locations according to the altitude and exposure of the terrain. Part of the research is sampling of individual tree species in all localities and examining the level of its damage with the image analyzes WinDIAS 3. The dominant species of Milešovka NNR is beech (North West) and durmast oak (South West). Image analysis showed that damage of leaf blades increases with altitude. The highest damage was at the top of Milešovka NNR and the lowest on its base. Among the observed species the highest degree of damage of leaf blades was shown by a horse-chestnut, oak and beech, the lowest by ash.

*Key words: forest ecosystems, Milešovka National Nature Reserve, biotic stress, image analysis*

#### *Souhrn*

V rámci NPR Milešovka se na 5 lokalitách v rámci výškového transektu uskutečnil monitoring výskytu biotického poškození vybraných druhů listnatých dřevin. Míra poškození listové čepele byla stanovena na základě obrazové analýzy WinDIAS3 ve 4 měřeních v rámci vegetace dřevin. Ze získaných výsledků vyplývá, že na SZ svahu Milešovky je dominantním druhem buk lesní a na JZ svahu dub zimní. Na základě obrazové analýzy je možné konstatovat, že míra poškození listové čepele patogenními organismy se zvyšuje s nadmořskou výškou, neboť nejvyšší byla na vrcholu (5,93 %) a nejnižší na úpatí (4,58 %). Ze sledovaných druhů nejvyšší míru poškození listové čepele vykazuje jírovec maďal, dub letní a naopak nejnižší buk lesní a jasan ztepilý.

*Klíčová slova: lesní ekosystémy, Národní přírodní rezervace Milešovka, biotický stres, obrazová analýza*

## ÚVOD

V současnosti pokrývají lesní pozemky v ČR plochu 2 666 376 ha, což je 33,9 % z celkového území státu. Na základě toho je možné konstatovat, že Česká republika patří k zemím s vysokou lesnatostí. Lesní společenstva z pohledu ekofyziologického vytváří složitá dynamická společenstva živých a mrtvých stromů, lesních živočichů, vč. hmyzích škůdců, která jsou ovlivňovaná abiotickými faktory a neustále se mění v čase /13/.

Výzkumnou lokalitou byl nejvyšší vrchol Českého středohoří Milešovka (837 m n.m.). Převážná část kužele Milešovky je zalesněna. Především při úpatí a nižších partiích svahů se v lesních porostech již mnoho století hospodaří. Přesto se na velkých plochách zachovaly přirozené a přírodě blízké porosty. Většina jižních svahů je porostlá dubohabrovými lesy (převažují společenstva blízká asociaci *Melampyro nemorosi-Carpinetum*). Na severních svazích převládaly druhově chudé bučiny (asociace *Luzulo-Fagetum*) s dominantní třtinou rákosovitou

(*Calamagrostis arundinacea*) v podrostu; ty byly nahrazeny kulturními smrčínami, které v první polovině minulého století podlely mniškové kalamitě. Nyní jsou na

velké části severních svahů řídké březové háje. Květnaté bučiny jsou zastoupeny především asociací *Tilio platyphylli-Fagetum* s hojnou lípou velkolistou /9/.

V práci byla pozornost zaměřena na poškození dominantních druhů dřevin biotickými stresory a možnost využití obrazové analýzy WinDIAS 3 pro detekci míry poškození nadzemních orgánů stresovými faktory prostředí.

## MATERIÁL A METODIKA

Vliv biogenního poškození listnatých dřevin byl sledován na zájmovém území Národní přírodní rezervace (NPR) Milešovka (50°33'21.18"N, 13°55'55.32"E), dosahující nadmořské výšky 837 m.

Experimentální práce byla rozdělena do dvou etap, kdy v první etapě byla uskutečněna inventarizace dominantních druhů ve vymezených zájmových lokalitách ve smyslu lesnické typologie dle /14/ a v druhé etapě monitoring biotického poškození dominantních druhů dřevin.

Dané zájmové území bylo rozděleno na pět lokalit. Na severozápadní straně, směrem na vrchol po turistické stezce z obce Bílka, byla vybrána dvě odběrná místa. První z nich se nacházelo v místě nákladní lanovky, v nadmořské výšce cca od 500 do 600 m n. m. (dolní SZ). Druhé odběrné místo se nacházelo mezi druhým a třetím turistickým ukazatelem, v nadmořské výšce cca 600 m n. m. až 780 m n. m. (střední SZ). Třetím odběrným místem byl vrchol Milešovky s nadmořskou výškou 836,6 m (vrchol). Zbývající dvě odběrné lokality se nacházely na jihozápadní straně kopce. Čtvrté odběrné místo se nacházelo na rozcestí turistických cest do Bílky (SZ) a do Milešova (JZ), cca 0,5 km před vrcholem (střední JZ). Toto odběrné místo se nacházelo v nadmořské výšce od 600 do 780 m n. m. Poslední odběrnou lokalitou v nadmořské výšce 500 až 600 m n. m., byl úsek při úpatí JZ strany, cca 0,5 km před obcí Milešov (dolní JZ).

Ve vegetačním období studovaných dřevin se uskutečnily čtyři odběry rostlinného materiálu: 26. 6.; 31. 7.; 4. 9. 30. 9. U odebraného rostlinného materiálu se určoval biotický stresor na základě vizuálních symptomů /11/.

Míra poškození listového aparátu rostlin byla zjišťována na základě obrazové analýzy, pomocí přístroje a softwaru WinDIAS 3, firmy Delta-T Devices Ltd., Velká Británie /2, 10/.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

Mezi dominantní druhy listnatých dřevin na zájmovém území Milešovky patří na severozápadním svahu především buk lesní (*Fagus sylvatica*) a na jihozápadním svahu dub zimní (*Quercus petraea*). Z uvedeného přehledu vyplývá, že SZ svah Milešovky pokrývá les z kategorie bučiny, naproti tomu JZ svah je tvořen doubravou. Podle /1, 3, 4/ převládajícími druhy na sopečných kopcích jsou převážně buk, dub a habr (*Fagion sylvaticae*, *Carpinion betuli* a *Tilio platyphylli-Acerion*), uvedený závěr byl potvrzen.

Převažujícími druhy listnatých dřevin na severozápadním svahu byl buk lesní (*Fagus sylvatica*), bříza bělokorá (*Betula pendula*), jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior*), jeřáb ptačí (*Sorbus aucuparia*) a javor klen (*Acer pseudoplatanus*). Od vyšších partií se ve zvýšené míře vyskytovala líska obecná (*Corylus avellana*). Dále byl potvrzen nižší výskyt javoru mléče (*Acer platanoides*), lípy velkolisté (*Tilia platyphyllos*) a dubu zimního (*Quercus petraea*). Na vrcholu byl objeven 1 exemplář introdukované dřeviny jírovce maďalu (*Aesculus hippocastanum*). Výskyt tohoto druhu patrně souvisí v minulosti vybudovanou restaurací.

Oproti tomu na jihozápadním svahu byl dominantním druhem dub zimní (*Quercus petraea*), dále následovaly tyto druhy dřevin: bříza bělokorá (*Betula pendula*), jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior*), lípa velkolistá (*Tilia platyphyllos*) a javor klen (*Acer pseudoplatanus*). Na jihozápadním svahu ojediněle rostly buk lesní (*Fagus sylvatica*), líska obecná (*Corylus avellana*), javor mléč

(*Acer platanoides*), jeřáb ptačí (*Sorbus aucuparia*) a dub letní (*Quercus robur*). Rozdíly ve vegetaci v rámci expozice ke světovým stranám ve své práci uvádí také např. /6, 7, 8/.

V případě napadení buku lesního je možné konstatovat, že převažuje poškození bejlmorkou bukovou (*Mikiola fagi*) a to především v okrajových partiích porostu a v případě soliterně rostoucích dřevin. Ve vrcholových partiích bylo zaznamenáno poškození roztočem druhu *Aceria stenaspis*. Spodní listy a zastíněné části koruny mladých buků byly poškozeny žírem nosatcovitých brouků rodu *Phyllobius* Schon a larvami klíněnky.

Na celém zájmovém území bylo zaznamenáno poškození javoru klenu svařetlkami rodu *Rhytisma* Fr., vlnovníkem *Aceria macrorrhyncha* a bejlmorkou *Harrisomyia vitria*. Toto poškození bylo zaznamenáno pouze na vrcholu Milešovky.

Tab. 1: Průměrné hodnoty poškození listů (%) sledovaných druhů dřevin v rámci lokality

Druh/Lokalita	Dolní (SZ)	Střední (SZ)	Vrchol	Střední (JZ)	Dolní (JZ)
javor klen	15,50	14,83	8,90	3,32	2,80
bříza bělokorá	8,87	6,29	2,62	4,77	7,78
jasan ztepilý	4,09	2,17	4,19	0,42	1,09
dub zimní	4,60	5,43	12,64	14,29	10,43
buk lesní	0,80	1,68	1,39	1,45	4,50
lípa velkolistá	0	15,15	7,01	6,14	4,49
jírovec maďal	0	0	10,72	0	0
dub letní	0	0	0	12,29	8,43

U břízy bělokoré (*Betula pendula*) bylo zaznamenáno v rámci terénního pozorování poškození listů rzí březovou (*Melampsorium betulinum*). V případě poškození jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia*) bylo zaznamenáno poškození pouze žírem, které způsobovaly mandelinky rodu *Chrysomelidae* a částečně také listohlody rodu *Phyllobius*. U lípy velkolisté bylo zaznamenáno poškození listů skvrnitostí, která byla způsobena houbou *Gloeosporium tiliae*. U obou druhů dubu bylo pozorováno poškození listové čepele žírem housenek bekyně velkohlavé (*Lymantria dispar*), dále tvorbou hálek žlabatky duběnkové (*Andricus kollari*) a padlím dubovým (*Microsphaera alphitoides*). Poškození listové čepele padlí dubovým bylo nalezeno pouze v lokalitě střední (SZ). Dále bylo zaznamenáno poškození jírovce maďalu klíněnkou jírovcovou (*Cameraria ohridella*), což je také v souladu s prací např. /5/.

Na základě obrazové analýzy je možné konstatovat, že se stoupající nadmořskou výškou se zvyšuje procento poškození listové plochy, jak dokazuje tab. 1. Z uvedené tabulky vyplývá, že nejvyšší průměrné poškození listové plochy je na vrcholu (5,93 %) a naopak nejnižší v dolních částech – 4,23 (SZ) a 4,94 (JZ).

Ze sledovaných rostlinných druhů byla nejvyšší míra poškození listů zaznamenána u jírovce maďalu (10,72 %), u dubu letního (10,36 %) a zimního (9,48 %). Na straně druhé nejnižší poškození listové plochy biotickými faktory bylo stanoveno u buku lesního (1,96 %) a u jasanu ztepilého (2,39 %), jak dokumentuje tab. 1. Diagnostika míry poškození listů může být jedním z kritérií působení stresorů na rostliny, jak dokládá práce /12/. Na základě toho lze konstatovat, že obrazová analýza je jednou z metod využitelných pro detekci vliv stresorů na rostliny.

## LITERATURA

- /1/ Cílek, V.: Ekologie sutí Českého středohoří. Eduard Brabec. Kritická recenze a přehled výsledků. In: Cílek V., Kopecký J. (eds.), Pískovcový fenomén: klima, život a reliéf, 1998: 49–59, Zlatý kůň, Praha.
- /2/ Guerfel, M., Baccouru, O., Boujnal, D., Chaibi, W., Zarrouck, M.: Impacts of water stress on gas exchange, water relations, chlorophyll content and leaf structure in the two main Tunisian olive (*Olea europaea* L.) cultivars. Scientia Horticulturae, 119, 3, 2009: 257–263.

- /3/ Chrtek, M.: Vegetation of the Czech Republic: diversity, ecology, history and dynamics. *Preslia*, 84, 2012: 427–504.
- /4/ Kolbek, J.: Die Festucetalia valesiacae-Gesellschaften im Ostteil des Gebirges České středohoří (Böhmisches Mittelgebirge). 2. Synökologie, Sukzession und syntaxonomische Ergänzungen. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica*, 13, 1978: 235–303.
- /5/ Percival, G. C., Barrow, I., Noviss, K., Keary, I., Pennington, P.: The impact of horse chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella* Deschka and Dimic; HCLM) on vitality, growth and reproduction of *Aesculus hippocastanum* L. *Urban forestry & urban greening*, 10, 1, 2011: 11–17.
- /6/ Slavíková, J.: Differentiation of biomass production on the conic hill Oblík in the České středohoří Mountains. *Preslia*, 53, 1981: 33–44.
- /7/ Slavíková, J. (ed.): Ecological and Vegetational Differentiation of a Solitary Conic Hill (Oblík in České středohoří Mts.). *Vegetace ČSSR*, Praha, 1983: 1–224.
- /8/ Sýkora, T. Botanická inventarizace CHÚ a popis anemo-orografického systému Milešovky v Českém středohoří. *Stipa*, 4, 1979 34–79.
- /9/ Štekl, J., Flašar, I., Flašarová, M., Kotyza, O., Kubát, K., Ulrych, J.: Milešovka a milešovský region, Praha, 2005: 176 s.
- /10/ Tourneur, D., Dodson, B., Aubinet, M., Vancutsen, F., Moureaux, C., Falisse, A: *Buletinul USAMV-CN*, 62, 2006: 164-170.
- /11/ Uhlířová, H., Fabiánek, P., Pasuthová, J., Balcar, V., Šrámek, V.: *Poškození lesních dřevin*, Praha, 2004: 279 s.
- /12/ Vollenweider, P., Günthardt-Goerg, M. S.: Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage. *Environmental Pollution*, 137, 3, 2005: 455–465.
- /13/ Woo, S. Y.: Forest dechne of the world: A linkage with air pollution and global warming. *African Journal of biotechnology*, 8, 25, 2009: 7409–7414.
- /14/ Zlatník, A. *Lesnická fytocenologie*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1976: 495 p.

### Poděkování

Tato práce byla podporovaná S grantem MŠMT ČR a vědeckou grantovou agenturou MŠ SR a SAV (projekt č. 2/0027/13).



## TESTOVÁNÍ BIOEFEKTORŮ SE ZAMĚŘENÍM NA RŮST, VÝNOS A PODÍL SUŠINY KUKUŘICE

### **TESTING OF BIOEFFECTORS FOCUSED ON THE GROWTH, YIELD AND DRY MATTER MAIZE**

Zlata Holečková, Martin Kulhánek, Jiří Balík

Department of Agro-Environmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 21 Prague – Suchdol, Czech Republic, holeckovaz@af.czu.cz

#### **Summary**

According to the results obtained so far it can be seen that, particularly in the early stages (first two months), the highest pace of growth was reached in plants, which were fertilized with TSP. The later growth stages resulted in leveling up of the growing maize. Application of bioeffectors had no significant effect on yield of above-ground mass dry matter. The cases where there was a greater root or plants growth, have been attributed to reactions e.g., a higher content of organic matter in soil texture, soil or weather conditions.

*Key words: bioeffector, Zea mays, soil, phosphorus, growth, yield, dry matter.*

#### **Souhrn**

Z prozatím dosažených výsledků vyplývá, že zejména v počátečních fázích (první 2 měsíce) růstu dosahovaly nejvyšších výšek rostliny, které byly hnojeny TSP. V pozdějších růstových fázích došlo k vyrovnání porostu kukuřice. Aplikace bioefektorů neměla průkazný vliv na výnos sušiny nadzemní hmoty. V případech, kdy došlo k většímu růstu kořenů nebo rostlin, byla reakce přisuzovaná např. vyššímu obsahu organické hmoty v půdě, textuře půdy nebo povětrnostním podmínkám

*Klíčová slova: bioeffektor, kukuřice, půda, fosfor, růst, výnos, sušina.*

## **ÚVOD**

Vzhledem k nárůstu světové populace se očekává růst poptávky po krmivech a potravinách, omezená dostupnost produktivní zemědělské půdy, a vzrůstající závislost na minerálních hnojivech. Je tedy potřeba nalézt alternativní strategie pro výživu rostlin /4, 5/. V roce 2012 vznikl projekt, který se týká využití bioefektorů v rostlinné výrobě. Měl by přispět ke snížení vstupů minerálních hnojiv používaných v zemědělství a ke správnému využívání půdy. Tento projekt zahrnuje testování v reálných podmínkách různých zeměpisných poloh /11/. Jedná se o integrovaný projekt s cílem rozvíjet nové přístupy k využívání tzv. bioefektorů založených na základě působení živých mikroorganismů a aktivních přírodních látek /5/. Bioefektory mohou být v závislosti na půdně-klimatických podmínkách nástrojem k překonání omezení dostupnosti živin. Obsahují mikroorganismy (bakterie, houby) a aktivní přírodní sloučeniny, jako jsou výluhy z půdy nebo kompostu, mikrobiální zbytky, rostlinné výtažky či výrobky z biologických procesů. Tyto produkty jsou vyvíjeny pro široké spektrum plodin (např. kukuřice, pšenice, rajčata, řepka, špenát, traviny, okrasné rostliny). Jejich efektivita spočívá v mobilizaci živin z hůře přístupných forem v půdě /11, 5/. Fosfor v půdě patří mezi nezastupitelné makrobiogenní prvky nezbytné pro růst a vývin rostlin. Přes jeho nezbytnost v rostlinném metabolismu je jeho obsah v půdě poměrně nízký /2, 10, 8, 12/. Vyšší obsah fosforu je přitom u většiny půd v povrchových vrstvách, protože se zde vyskytuje zvýšená biologická aktivita způsobující akumulaci organického materiálu. Vliv má často i aplikace organických a minerálních hnojiv. Obsah půdního fosforu se však může měnit

v závislosti na mateční hornině, textuře a jiných faktorech hospodaření (poměr a druh dodaného P a způsob kultivace půdy) /3, 9/. P v půdě můžeme rozdělit na tři základní skupiny: anorganický fosfor, organický fosfor a výměnně sorbovaný fosfor /1/. Množství fosforu vázané v jednotlivých frakcích v daném čase závisí především na době aplikace hnojiva včetně vlivu i dříve provedených zásazích /7/. Stupeň přístupnosti rostlinám závisí na chemických, fyzikálně chemických a fyzikálních vlastnostech daného typu půdy, na sezónní dynamice jejího vodního, vzdušného a teplotního režimu, na biologické aktivitě půdy, na druhu rostliny, atd. /6/. Z uvedených důvodů jsou nutné podrobnější analýzy jednotlivých forem fosforu v půdě po aplikaci minerálních hnojiv spolu s bioefektory.

## MATERIÁL A METODA

### Nádobový pokus

V roce 2014 byly realizovány nádobové pokusy s kukuřicí. Pokus byl založen 30.4.2014 ve vegetační hale, kdy bylo do 5 litrových nádob zaseto vždy 5 semen kukuřice (odrůda *Colisee*). Půda byla získána z pokusných stanic VÚRV, v.v.i. (stanoviště Humpolec a Lukavec). Substrát byl sestaven z půdy (kambizem) a křemenného písku v poměru 2:1. Každá varianta byla realizována v pěti opakováních. Po dvou týdnech pěstování byly rostliny kukuřice vyjednoceny na finální počet tří rostlin. V pokusu byly při stejné dávce N a K testovány tři bioefektory (BE) v kombinaci se dvěma hnojivy. Dusík byl dodán ve formě ledku vápenatého (0,50 g N/nádoba) a draslík v podobě K-hnojiva Patentkali (0,85 g K/nádoba). Účinnost bioefektorů byla testována na mletém fosfátu (RP) a trojitém superfosfátu (TSP), kterými byla dodána stejná dávka P. Všechny varianty byly srovnávány s kontrolními, složenými z neaktivního bioefektoru a uvedených P hnojiv, včetně neaktivního bioefektoru s P nehnojenou variantou. Rostliny byly v pravidelných intervalech měřeny a po sklizni byla vážena a hodnocena nadzemní část i kořenová část rostliny. Pokus byl sklizen v polovině srpna po dosažení mléčně voskové zralosti. Nadzemní i podzemní biomasa byla dále sušena a zpracována pro následné analýzy. Bioefektory použité v nádobovém pokusu spolu s účinnou látkou (v závorce):

BE 0: Kontrola (voda)

BE 1: Trianium P (*Trichoderma harzianum*) – 0,1175 g/nádoba

BE 2: Proradix (*Pseudomonas sp.*) – 0,1375 g/nádoba

BE 3: RhizoVital (*Bacillus amyloliquefaciens*) – 0,35 ml/nádoba

V půdách z obou stanovišť byly založeny následující varianty:

1. BE0 + NK
2. BE1 + NK
3. BE2 + NK
4. BE3 + NK
5. BE0 + RP + NK
6. BE1 + RP + NK
7. BE2 + RP + NK
8. BE3 + RP + NK
9. BE0 + TSP + NK
10. BE1 + TSP + NK
11. BE2 + TSP + NK
12. BE3 + TSP + NK

## VÝSLEDKY A DISKUSE

Experiment byl založen na předpokladu, že aplikace bioefektorů zvýší množství přístupného fosforu pro rostliny, a dojde k lepšímu růstu rostlin vedoucím k vyšším výnosům. Tab. I. uvádí výšku rostlin v určitých časových intervalech. Uvedené údaje byly naměřeny

u nádobového pokusu, ve kterém byla použita kambizem pocházející z Humpolce. Z tab. I. je zřejmé, že v počátečních fázích růstu (měření 5.6., 18.6.) ovlivnila výšku rostlin zejména aplikace trojitého superfosfátu. V termínu 18.6. byl zaznamenán rovněž pozitivní průkazný vliv aplikace mletého fosfátu na výšku rostlin. V pozdějších fázích došlo k vyrovnání porostu u všech variant. To bylo pravděpodobně způsobeno vzájemnou konkurencí rostlin v nádobách. Varianta BE0 vykazovala v termínech měření 5.6., 18.6. a 3.7. nejmenší výšku rostlin, ale vliv aplikace bioefektorů nebyl statisticky prokázán.

Tab. I: Výška rostlin kukuřice (v cm) v časových intervalech

	výška 5.6.	výška 18.6.	výška 3.7.	výška 13.8.
BE0	24,2 <sup>a</sup>	47,8 <sup>a</sup>	88,8 <sup>a</sup>	156,8 <sup>a</sup>
BE1	27,2 <sup>a</sup>	56,1 <sup>a</sup>	91,6 <sup>a</sup>	146,7 <sup>a</sup>
BE2	26,9 <sup>a</sup>	57,1 <sup>a</sup>	94,6 <sup>a</sup>	152,3 <sup>a</sup>
BE3	28,1 <sup>a</sup>	56,5 <sup>a</sup>	95,9 <sup>a</sup>	149,0 <sup>a</sup>
BE0 + RP	29,3 <sup>a</sup>	65,3 <sup>b</sup>	102,6 <sup>a</sup>	136,0 <sup>a</sup>
BE1 + RP	31,3 <sup>a</sup>	66,1 <sup>b</sup>	99,5 <sup>a</sup>	139,6 <sup>a</sup>
BE2 + RP	32,3 <sup>a</sup>	70,5 <sup>b</sup>	102,5 <sup>a</sup>	136,5 <sup>a</sup>
BE3 + RP	31,7 <sup>a</sup>	67,4 <sup>b</sup>	98,0 <sup>a</sup>	134,4 <sup>a</sup>
BE0 + TSP	45,7 <sup>b</sup>	82,1 <sup>c</sup>	102,4 <sup>a</sup>	135,1 <sup>a</sup>
BE1 + TSP	43,1 <sup>b</sup>	84,4 <sup>c</sup>	105,0 <sup>a</sup>	125,8 <sup>b</sup>
BE2 + TSP	51,4 <sup>b</sup>	82,4 <sup>c</sup>	101,5 <sup>a</sup>	128,3 <sup>a</sup>
BE3 + TSP	46,4 <sup>b</sup>	78,3 <sup>c</sup>	99,5 <sup>a</sup>	131,5 <sup>a</sup>
F-test	42,5	38,30	3,573	4,712
p≤*	0,01	0,01	n.s.	0,05

\* p – hladina významnosti

Tab. II.: Hmotnost sušiny nadzemní hmoty kukuřice (v g)

	sušina g/nádoba	směrodatná odchylka
BE0	1111,1 <sup>ab</sup>	70,9
BE1	972,6 <sup>ab</sup>	11,8
BE2	924,7 <sup>ab</sup>	93,2
BE3	891,4 <sup>a</sup>	54,7
BE0 + RP	1088 <sup>ab</sup>	57,4
BE1 + RP	1056,2 <sup>ab</sup>	121,7
BE2 + RP	900,2 <sup>a</sup>	77,2
BE3 + RP	1019,8 <sup>ab</sup>	42,0
BE0 + TSP	1066,6 <sup>ab</sup>	90,3
BE1 + TSP	1174,3 <sup>b</sup>	148,1
BE2 + TSP	1056,6 <sup>ab</sup>	42,9
BE3 + TSP	1070,4 <sup>ab</sup>	61,0
F-test	4,913	-
p≤*	0,05	-

\* p – hladina významnosti

Tab. II. uvádí průměr hmotnosti sušiny nadzemní hmoty při a směrodatná odchylka pro každou variantu. Nejvyšší hmotnost sušiny byla zaznamenána u varianty BE1 + TSP. Je možné, že byla způsobena aplikací TSP, avšak vliv aplikace TSP nebyl prokázán. Nejnižší podíl sušiny

vykazovaly varianty nehnojené fosforečnými hnojivy, s výjimkou varianty BE0. Z výše uvedené tabulky II. je tedy zřejmé, že aplikace vybraných bioefektorů neměla významný vliv na výnos sušiny nadzemní hmoty rostlin. Srovnatelných výsledků bylo dosaženo také u variant, kde byla použita půda ze stanoviště v Lukavci. Ani zde se nepotvrdil vliv bioefektorů na výšku rostlin, jejich výnos a hmotnost sušiny. Z prozatímních výsledků nádobového pokusu není statisticky průkazný pozitivní vliv bioefektorů na růst rostlin či hmotnost sušiny. Je pravděpodobné, že vyšší hodnoty byly způsobeny přidavkem TSP. Ani v jiných zemích či v ostatních případech nebyl při nádobových nebo polních pokusech prozatím prokázán vliv bioefektorů na výnos, kvalitu či vitalitu rostlin.

#### LITERATURA

- /1/ Balík, J., Vaněk, V., Pavlíková, D., Kulhánek, M., Jakl, M., 2002: Fosfor v půdě a jeho koloběh v přírodě. Sborník z konference „Racionální použití hnojiv zaměřené na problematiku fosforu v rostlinné výrobě“, Praha, KAVR, 26 – 34, ISBN 80-213-0957-1.
- /2/ Blume, H. P., Brümmer, G. W., Schwertmann, U., Horn, R., Knabner, I. K., Stahr, K., Auerswald, K., Beyer, L., Hartmann, A., Litz, N., Scheinost, A., Stanjek, H., Welp, G., Wilke, B. M., 2002: Scheffer/Schachtschabel: Lehrbuch der Bodenkunde, Spektrum Akademischer Verlag, Stuttgart, 607 p., ISBN: 3-8274-1324-9.
- /3/ Ivanič, J., Havelka, B., Knop, K., 1984: Výživa a hnojení rostlin. Příroda, Bratislava, 486 s.
- /4/ Kamoun, S., 2010: Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms, Senior Scientist and Head, The Sainsbury Laboratory Norwich, United Kingdom, /cit. 2012-11-24/, dostupné z <<http://archive.sciencewatch.com/dr/fbp/2010/10febfbp/10febfbpKamo/>>.
- /5/ Neumann, G., 2012: EU-funded research collaboration on use of bio-effectors in agriculture launched, Press Release, University of Hohenheim, Germany, /cit. 2011-11-4/, dostupné z <<http://biofector.agrobiology.eu/>>.
- /6/ Macháček, V., 2002: Metody stanovení obsahu fosforu v půdách. Sborník z konference „Racionální použití hnojiv zaměřené na problematiku fosforu v rostlinné výrobě“, Praha KAVR, 46-49, ISBN 80-213-0957-1.
- /7/ McGechan, M. B., Lewis, D. R., 2002: Sorption of phosphorus by soil, part 1: principles, equations and models. Biosystems Engineering, 82, pp. 1-24.
- /8/ Mengel, K., 1991: Ernährung und Stoffwechsel die Pflanze. Gustav Fischer Verlag Jena, 466 p., ISBN: 3-334-00310-8.
- /9/ Sharpley, A. N., 1995: Soil phosphorus dynamics: agronomic and environmental impacts. Ecological Engineering, 5, 261 – 279.
- /10/ Schachtschabel, P., Blume, H. P., Brümmer, G. W., Hartge, K. H., Schwertmann, U., 1992: Lehrbuch der Bodenkunde. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 491 s.
- /11/ Smalla, K., et al, 2012.: EU-funded research collaboration on use of bio-effectors in agriculture launched, Julius Kühn-Institut (JKI), Germany, /cit. 2011-10-24/, dostupné z <<http://www.jki.bund.de/en/startseite/presse/english-press/eu-funded-research-collaboration-on-use-of-bio-effectors-in-agriculture-launched.html>>.
- /12/ Tesář, S., Vaněk, V., Balík, J., Kolář, L., Matousch, O., Tlustoš, P., Vostal, J., 1992: Výživa rostlin a hnojení. SPS VŠZ Praha, 151 s., ISBN 80-85467-99-2.

## PRÍZEMNÝ OZÓN VO VIDIECKYCH PODMIENKACH ZÁPADNÝCH KARPÁT

### *SURFACE OZONE IN RURAL LOCATIONS OF THE WESTERN CARPATHIANS*

Daniela Kellerová, Rastislav Janík

Ústav ekologie lesa SAV, Štúrova 2, 960 53 Zvolen, kellerova@savzv.sk

#### *Summary*

The experiment was conducted in the middle of rural locations in the Western Carpathians. The highest concentrations of ozone are on the plot where the last 25 years formed wort and the area of the original beech stand. The lowest concentrations of  $62 \text{ mg m}^{-3}$  were all the time in the open area. The research results show that  $\text{O}_3$  input into the environment may be different according to the surface coverage, but also growth stage, in which the stand is located. For real results it indicates that concentrations of ozone are still relatively high and significantly expressed seasonal and interannual time difference.

*Key words: ground level ozone, rural areas, beech forest, Western Carpathians*

#### *Súhrn*

Experiment sa realizoval v stredných vidieckych polohách v Západných Karpatoch. Najvyššie koncentrácie ozónu boli na ploche, kde sa za posledných 25 rokov tvorila mladina a na ploche pôvodného bukového porastu. Najnižšie koncentrácie  $62 \mu\text{g m}^{-3}$  boli po celú dobu na voľnej nezalesnenej ploche. Výsledky výskumu ukazujú, že vstup  $\text{O}_3$  do prostredia môže byť rozdielny podľa pokryvnosti povrchu, ale aj štádia rastu, v akom sa porast nachádza. Z reálnych výsledkov vyplýva, že hodnoty koncentrácií ozónu sú stále pomerne vysoké a výrazne sa prejavili sezónne aj medziročné časové diferencie.

*Kľúčové slová: prízemný ozón, vidiecke prostredie, bukový les, Západné Karpaty*

## ÚVOD

Proces tvorby a stav zistených koncentrácií ozónu v lokálnom poňatí je ovplyvnený rôznymi udalosťami a procesmi. Pri formovaní úrovne prízemného ozónu zohráva významnú úlohu diaľkový prenos, vertikálna výmena a klimatické zmeny. Vzhľadom na zmeny klímy, je naliehavé zistiť čo najviac poznatkov o problematike interakcií medzi znečisteným ovzduším a vidieckym prostredím /7/. K poškodzovaniu vegetácie ozónom napomáhajú komplexné vzťahy a faktory fyziologické, pôdne, ktoré môžu byť podmienené typom vegetácie ako aj rastovou formou. Dôležitú úlohu zohráva geomorfológia a vegetačná pokryvnosť /5/.

Vznik a formovanie úrovne prízemného ozónu je proces veľmi zložitý. V troposfére je produkovaný v komplexe fotochemických reakcií za prítomnosti prekurzorov oxidov dusíka ( $\text{NO}_x$ ) a prchavých organických látok (VOC), najmä v teplom období (apríl - september). Následne je v prostredí prenášaný vertikálne a horizontálne. Prekurzory pochádzajú z antropogénnych a prirodzených zdrojov.

Za dominantný antropogénny zdroj prekurzorov  $\text{O}_3$  v Európe (39% z celkových emisií) je považovaná cestná doprava, ďalej výroba energie, spaľovanie tuhých palív a použitie rozpúšťadiel ako ďalších kľúčových odvetví /4/. Prirodzenými zdrojmi prekurzorov sú lesy, pričom bučiny prispievajú k tvorbe biogénnych VOC emisií asi 10% /1/. Produkcia a transport ozónu sú ovplyvňované najmä meteorologickými faktormi ako teplota vzduchu, slnečné žiarenie, množstvo zrážok a cirkulácia /3, 2, 12/.

Výskum bol orientovaný na vývoj koncentrácií ozónu v stredných vidieckych polohách. Zámerom bolo získať fakty o plošnom a časovom rozložení prízemného ozónu v troch rozličných výskumných plochách, ktoré boli umiestnené v identických nadmorských výškach, avšak líšili sa typom vegetácie a rastovou formou.

## MATERIÁL A METÓDA

Plochy v Kremnických vrchoch boli umiestnené v nadmorskej výške 480-510 m, vzdialené od seba cca 50-110 m. Svah plôch má západnú expozíciu so sklonom 30 až 36% /11/. Dve experimentálne plochy tvoril bukový porast (*Fagus sylvatica* L.) s rozdielnou rastovou formou (K, H), tretia plocha bola bez lesného porastu (H1). V čase experimentu bol vek bukového porastu 100-110 rokov. V dospelom poraste nebol od založenia výskumu realizovaný ťažbový zásah a zachoval si svoj autentický charakter bez podrastu. Mladina sa vytvárala, prirodzeným a umelým zmladením, po ťažbovom zásahu od roku 1989, kedy boli z porastu odstránené všetky stromy v rubnej zrelosti.

Oblasť je pomerne vzdialená od emisných zdrojov znečisťovania a bola považovaná za „čisté prostredie“

Pre lokálne sledovanie stavu kontaminácie životného prostredia z voľného ovzdušia ozónom sa osvedčili pasívne techniky vzorkovania. Merajú sa koncentrácie ozónu z voľného ovzdušia, ktoré sa deponujú na povrch. Stanovenie umožňuje manuálna sorpčno-kumulatívna Wernerova metóda /13, 14/.

Princíp stanovenia ozónu spočíva v selektívnej reakcii indiga naneseného na filtračnom papieri s ozónom v ovzduší počas 7-10 dňovej expozície v teréne počas letných sezón. Pasívne zberače sú umiestnené na každej ploche dva paralelne vo výške 1,5 m nad povrchom. Exponované papieriky sa extrahujú v laboratóriu etanolom. Stanovenie sa uskutočňuje spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 408 nm. Koncentrácia ozónu sa udáva v štandardných jednotkách ppb na deň resp.  $\mu\text{g m}^{-3}$  prepočítané na deň. Z nameraných údajov sa vypočítali mesačné a ročné charakteristiky a štatisticky sa vyhodnotili.

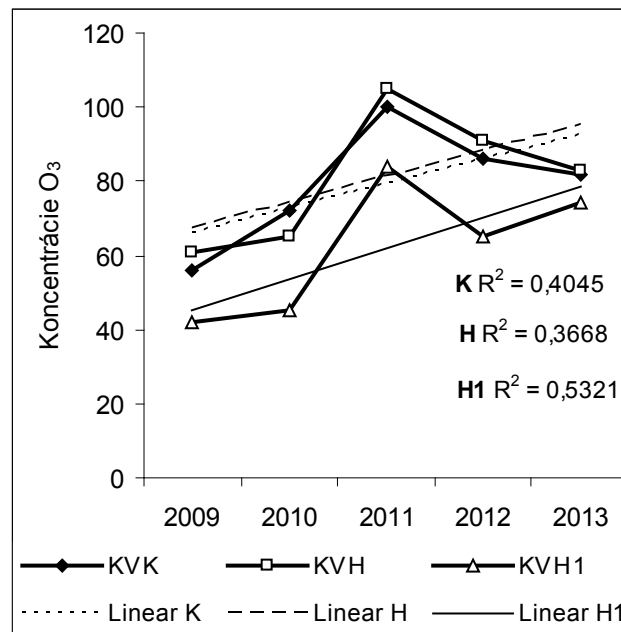
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Merania sa uskutočnili v rokoch 2009 až 2013 v teplom období od apríla do septembra, kedy sú spravidla merané vyššie koncentrácie ako v studených mesiacoch.

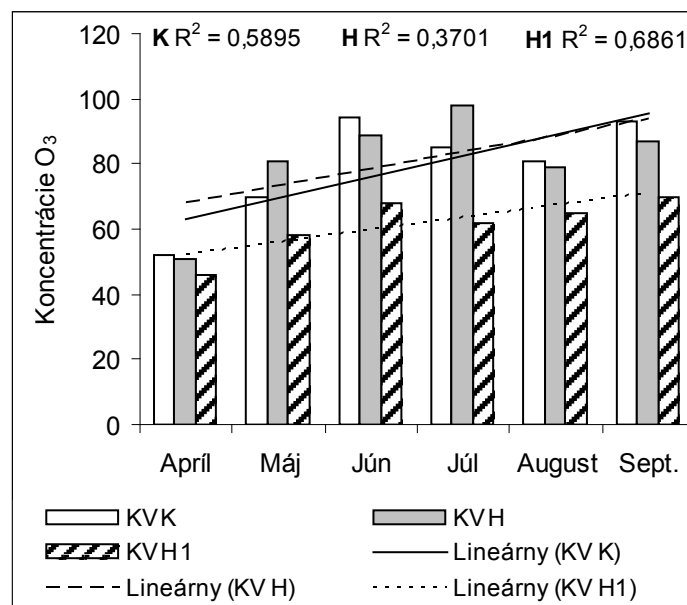
S výnimkou roku 2010 boli najvyššie hodnoty koncentrácií  $\text{O}_3$  namerané na ploche tvorenou mladinou, kde bola súhrnná priemerná hodnota  $81 \mu\text{g m}^{-3}$ . V pôvodnom dospelom poraste a v mladine bol vývoj koncentrácií  $\text{O}_3$  veľmi podobný. Jednoznačne najnižšie koncentrácie  $62 \mu\text{g m}^{-3}$  boli po celú dobu na voľnej nezalesnenej ploche.

Medziročná variabilita sa prejavila na všetkých plochách a to najmä v roku 2011, kedy boli koncentrácie najvyššie. Vysoké ročné koncentrácie  $\text{O}_3$  sa v rokoch 2011 tiež v 2012 vyskytovali na celom území Slovenska  $61$  a  $63 \mu\text{g m}^{-3}$ ; napr. v Nízkych Tatrách na Chopku (2046m n.m.) to bolo až  $96$  a  $93 \mu\text{g m}^{-3}$  /10/. Vegetačné obdobia rokov 2011 a 2012 boli veľmi teplé a suché, podobne ako v extrémne teplom roku 2003. Vysoké hodnoty namerané najmä v roku 2011 sú určujúce pre rastúci trend koncentrácií ozónu na všetkých plochách, čo dokumentuje graf 1.

Medzi plochami tvorenými dospelým porastom a mladinou, nie sú diferencie v koncentráciách prízemného ozónu výrazné, z čoho vyplýva, že stav mladiny postupne nadobúda charakter porastu. Skutočnosť, že najvyššie koncentrácie boli na pôvodnej ploche a ploche s mladinou potvrdzuje teóriu, že les pôsobí ako producent izoprénu, ktorý ako významný prekursor prispieva, v období s vysokými teplotami vzduchu a nízkymi zrážkami, k tvorbe prízemného ozónu.



Graf 1: Priestorová a časová distribúcia a trend koncentrácií ozónu na experimentálnych plochách v Kremnických vrchoch. Legenda: K dospelý bukový porast, H mladina (25 ročná), H1 voľná plocha bez lesného porastu [ $\mu\text{g m}^{-3}$ ]



Graf 2: Sezónne diferencie koncentrácií prízemného ozónu na experimentálnych plochách s rozdielnym typom pokryvnosti pôdy [ $\mu\text{g m}^{-3}$ ]

V sezónnom chode sa vo vyšších nadmorských výškach stredoeurópskeho regiónu spravidla vyskytujú najvyššie koncentrácie ozónu v apríli a auguste /8/. Výsledky výskumu ukázali, že v stredných polohách to nie je také bežné.

V priebehu ročných období (apríl - september) boli koncentrácie opäť najnižšie na ploche bez lesného porastu. Na výskumných plochách kde bol trvalý porast a porast tvorený mladinou boli koncentrácie striedavo vyššie a nižšie bez akéhokoľvek systému. Najvyššie koncentrácie boli počas trvania experimentu v júni, júli a septembri (H a K) a najnižšie v apríli a to na všetkých plochách (Graf 2.).

Z výsledkov výskumu sa ukazuje, že pôvodné jarné maximum koncentrácie O<sub>3</sub>, ktoré je spojené s transportom ozónu z vyšších vrstiev atmosféry, je v dôsledku fotochemickej produkcie ozónu v hraničnej vrstve atmosféry rozšírené na celé letné obdobie /6, 9/.

#### LITERATÚRA

- /1/ Bičárová, S., Fleischer, M.: Modelovanie koncentrácie prízemného ozónu pomocou modelu MetPhoMod v oblasti Vysokých Tatier. [Modeling of ground level ozone concentration in the High Tatras region using model MetPhoMod.]. In Střelcová, K., Škvarenina, J., Blaženec, M. (eds.) Bioclimatology and natural hazards. Pořana 2007: 17 - 20.
- /2/ Bičárová S.: Sezónny priebeh nočných a denných koncentrácií prízemného ozónu na pozadovej stanici v Starej Lesnej. In Rožnovský, J., Litschmann, T. (ed): „Bioklimatologické aspekty hodnocení procesů v krajině“, Mikulov 9. – 11.9.2008: 12.
- /3/ Dueñas, C., Fernández, M.C., Cañete, S., Carretero, J., Liger, E.: Assessment of ozone variations and meteorological effects in an urban area in the Mediterranean Coast. The Science of the Total Environment, 299, 2002: 97–113.
- /4/ EEA 2010: Air quality in Europe – report. EEA, Copenhagen, Denmark, 2010: 84.
- /5/ Hůnová, I.: Pasivní dozimetry Ogawa pro měření koncentrací přízemního ozonu: zkušenosti s aplikací a výsledky měření ve vybraných horských lesích ve vegetačním období 2004–2005. Ochrana ovzduší, 19, 2006: 8–15.
- /6/ Chevalier, A., Gheusi, G., Delmas, R., Ordóñez, C., Sarrat, C., Zbinden, Z., Thouret, V., Athier, G., Cousin, G.M.: Influence of altitude on ozone levels and variability in the lower troposphere: a ground-based study for western Europe over the period 2001–2004. Atmos. Chem. Phys., 7, 2007: 4311–4326.
- /7/ Matussek R, Wieser G, Calfapietra C, de Vries W, Dizengremel P, Ernst D, Jolivet Y, Mikkelsen TN, Mohren GMJ, Le Thiec D, Tuovinen J-P, Weatherall A, Paoletti E.: Forests under climate change and air pollution: Gaps in understanding and future directions for research. Environmental Pollution, 160, 2012: 57-65.
- /8/ SHMÚ: Správa o kvalite životného prostredia SR 2010. Bratislava, 2010: 74.
- /9/ SHMÚ: Správa o kvalite ovzdušia a podiele jednotlivých zdrojov na jeho znečisťovaní v SR 2011. Bratislava, 2012: 86.
- /10/ SHMÚ: Regionálny program na zlepšenie kvality ovzdušia na území SR pre prízemný ozón. MŽP SR, Bratislava, 2013: 43.
- /11/ Schieber, B.: Change of flowering phenologi of six herbal species in a beech forest (central Slovak); a decade analysis. Pol. J. of Ecol., 55, 2007: 233-244.
- /12/ Šec, K., Skácel, F., Malec, L., Tekáč, V.: Study of factors initiating the origin and extinction of tropospheric ozone. Chem. Listy, 101, 2007: 1051-1057.
- /13/ Werner, H.: Methodische Details für das Ozonmonitoring mit Indigopapieren. II Workshop zum Thema Integrale Messmethoden, Salzburg, AGRE ALP, AGRE ALPEN-AGRIA, 1991: 1-110.
- /14/ Werner, H., Kirchner, M., Welzl, G., Hangartner, M.: Ozone measurements along vertical transects in the Alps. Environ. Sci. Pollut. Res., 6, 1999: 83-87.

#### Pod'akovanie

Uvedená práca vznikla za finančnej podpory Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied (Projekty č. 2/0027/13, 2/0089/14).



## VPLYV IMISIÍ NA ÚRODY JAČMEŇA JARNÉHO (*HORDEUM SATIVUM*) V OKOLÍ ELEKTRÁRNÍ NOVÁKY

### *INFLUENCE OF IMISSIONS ON THE YIELD OF SPRING BARLEY (*HORDEUM SATIVUM*) IN THE VICINITY OF THE POWER STATION PLANT NOVÁKY*

Alan Klimaj, Jozefína Pokrývková, Viliam Bárek

Slovenská poľnohospodárska univerzita, FZKI, Katedra krajinného inžinierstva, Hospodárska 7, Nitra 949 74, klimajalan@gmail.com, jozefina.pokryvkova@uniag.sk, viliam.barek@uniag.sk

#### *Summary*

Examining the impact was monitored in the space bounded production potential of soils and immission load achieved by comparing the (current) and potential yields in the longer time period. Results losses of crops from the area of interest were compared with the methodology ÚVTIZ 12/92 /2/ and has been retained trend of reducing yields of individual crops. After evaluation of the selected area of interest was found to continuously decreasing concentrations yet continues to cause crop losses of individual examined agricultural crop. The individual process steps still need to critically examine and possibly some parameters more suitable substitute higher informative value. Evaluation examining the impact of a finding that a concentration below the limit of the area of interest causes losses to monitor crop of spring barley (*Hordeum sativum*). Calculated linear decrease yields by the methodology (ÚVTIZ 12/92) in the present immission conditions in interest area spring barley is as of (*Hordeum sativum*) 3.88%.

*Key words: hop plants, Humulus lupulus L., water stress, photosynthesis rate, transpiration rate*

#### *Súhrn*

Skúmanie vplyvu sa sledovalo v priestore ohraničenom produkčným potenciálom pôd a imisnou záťažou porovnávaním dosahovaných (aktuálnych) a potenciálnych úrod v dlhšom časovom slede. Výsledky strát úrod zo záujmového územia boli porovnávané s metodikou ÚVTIZ 12/92 /2/ a bol zachovaný trend zníženia úrod jednotlivých plodín. Po vyhodnotení vybraného záujmového územia bolo zistené, že neustále znižovanie koncentrácií ešte naďalej spôsobuje straty na úrodách jednotlivých skúmaných poľnohospodárskych plodín. Jednotlivé kroky postupu je potrebné ešte kriticky preskúmať a prípadne niektoré parametre nahradiť vhodnejšími s vyššou výpovednou hodnotou. Vyhodnotením skúmaného vplyvu je zistenie že aj podlimitné koncentrácie v záujmovom území spôsobujú straty na sledovanej plodine jačmeňa jarného (*Hordeum sativum*). Prepočítané lineárne zníženie úrod podľa metodiky (ÚVTIZ 12/92) v súčasných imisných podmienkach na záujmovom území je pre jačmeň jarný (*Hordeum sativum*) 3,88 %.

*Klíčová slova: concentration of immissions, loss of crops, spring barley (Hordeum sativum)*

## ÚVOD

Zatiaľ čo v minulých desaťročiach vysoké koncentrácie znečistenín v ovzduší priamo, alebo po transformácií, izolovane alebo synergicky poškodzovali hydrosféru a pedosféru s ich prejavmi života a devastovali kultúrno – historické pamiatky, v súčasnosti sa ich účinok spája s globálnou klimatickou zmenou. Klimatické scenáre s väčšou alebo menšou naliehavosťou burcujú svetové povedomie za obnovenie vyváženého stavu s možnou samoreguláciou a dosiahnutím udržateľného vývoja /1/.

Popri takýchto viac menej katastrofických víziách, podporovaných enormným zmnožením meteorologických extrémov, do úzadia sa dostáva otázka prvotného pôsobenia imisí na základné zložky životného prostredia – najmä na jeho konzervatívnejšie zložky a na nich závislú vegetáciu a

d'alsie stupne potravového reťazca. Synergizmus klimatického efektu a priameho pôsobenia imisií pri tom nesporne získava na vážnosti a nemožno opomenúť ani detekciu doteraz „neznámych“, resp. neznámy účinok novoobjavených škodlivín v prostredí. Tento trend si teda naďalej vyžaduje pozornosť pre uvedomenie si dôležitosti problému a identifikáciu jeho účinkov. Ďalsie, v minulosti používané opatrenie – zvýšenie rozptylu – už v súčasných úvahách nefiguruje z logických dôvodov, do obehu vypustená imisia zostáva v prostredí a jej účinok sa, síce s menšou okamžitou intenzitou a časovým posunom, tak či tak prejaví.

## MATERIÁLY A METÓDY

### *Charakteristika sledovanej lokality*

Riešená oblasť sa týka katastrálnych území nachádzajúcich sa na častiach okresu Prievidza a okresu Partizánske, ktoré spadajú do Trenčianskeho kraja. Vybrané katastrálne územia okresu Prievidza sú Bojnice, Brezany, Bystričany, Čereňany, Dubnica, Horná Ves, Kanianka, Kocurany, Koš, Lazany, Nedožery, Nováky, Oslany, Opatovce nad Nitrou, Pravenec, Radobica, Zemianske Kostol'any. V okrese Partizánske sa jedná o katastrálne územia Kolačno, Malé Kršteňany, Malé Uherce, Pažiť, Veľké Kršteňany, Veľké Uherce.

### *Charakteristika zdroja znečistenia*

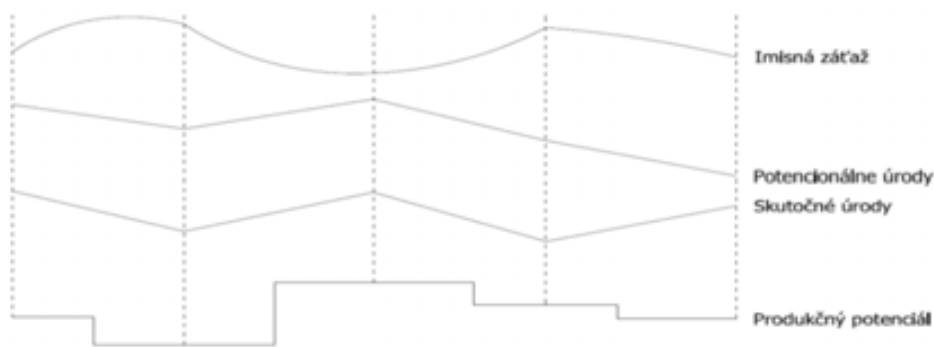
Závod Elektrárne Nováky so sídlom v Zemianskych Kostol'anoch sa nachádza v blízkosti Nováckych uhoľných baní a Nováckych chemických závodov v okrese Prievidza. Okrem výroby a dodávky elektrickej energie zabezpečujú Elektrárne Nováky dodávku horúcej vody na vykurovanie miest Prievidza, Nováky, Zemianske Kostol'any ako aj pre priemyselné a iné organizácie a pary pre dodávku tepla okolitým priemyselným podnikom.

Metodika je podriadená cieľom práce a má potvrdiť alebo vyvrátiť hypotézu o preukaznosti vplyvu podlimitných koncentrácií imisií na výšku dosahovaných úrod. Skúmanie vplyvu sa sleduje v priestore ohraničenom produkčným potenciálom pôd a imisnou záťažou porovnávaním dosahovaných a potenciálnych úrod v dlhšom časovom slede (viď graf 1).

### *Imisná záťaž*

Imisná záťaž záujmovej oblasti je vyjadrená izolíniami koncentrácie SO<sub>2</sub> (oxidu siričitého) v  $\mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ . Pre tento účel je použitý matematický model rozptylu znečisťujúcich látok v ovzduší Win Modim ver. 4.11 vypracovaný firmou ENVltech, s.r.o. Trenčín na báze metodiky ISC2 EPA USA.

Model počíta koncentrácie imisií pre určenú oblasť v uzlových bodoch siete so zvoleným krokom v zadaných referenčných bodoch ľubovoľne umiestnených v mape záujmovej oblasti. Pomocou interpolácie hodnôt vypočítanej mriežky koncentrácií model dokáže zobrazíť hranice – izočiary ľubovoľných koncentrácií – v našom prípade bodových hodnôt v SV – JZ transekte záujmovej oblasti s centrom v mieste zdroja. Doplnkovým výstupom je numerický výpočet hodnôt koncentrácií v určenej oblasti.



Graf. 1 Schéma skúmania vzťahu potenciálnych a skutočných úrod [3/

Win Modim počíta model rozptylu znečisťujúcich látok na základe vstupných údajov o zdroji znečisťujúcich látok a o rozptylových podmienkach, smere a rýchlosti vetra (veterná ružica), stability ovzdušia a ďalších údajoch.

### Skutočné úrody

Skutočné úrody sú úrody pestovaných plodín v záujmovej oblasti dosiahnuté korektným zberom a evidované na štatistických tlačivách (Poľ 16 – 01). Tieto úrody sú však porovnateľné s potenciálnymi úrodami len po vyrovnaní pôdneho produkčného potenciálu, nakoľko pôdne podmienky sú značne nevyrovnané. Produkčný potenciál pôd je vyjadrený podľa stupňa, resp. bodovej hodnoty produkčného potenciálu pôd, finančného vyjadrenia (HRRE) a energetického potenciálu (GJ) úrod ako hlavného a vedľajšieho produktu.

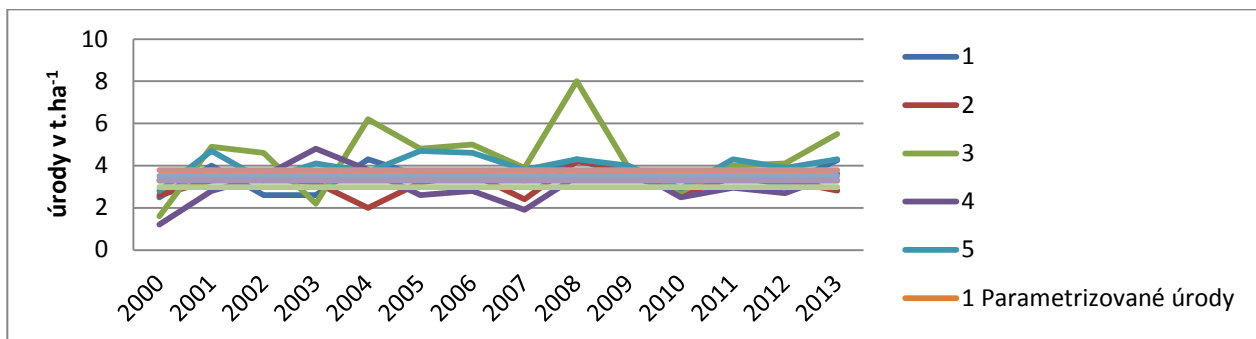
### Potenciálne úrody

Tento parameter možno posudzovať v dvoch smeroch – ako parametrizované úrody viazané na HPJ (hlavnú pôdnu jednotku), resp. BPEJ (bonitovanú pôdnoekologickú jednotu), alebo ako priemerné úrody za danú výrobnú oblasť.

Obe kategórie majú svoju výpovednú hodnotu, pričom pre naše použitie je smerodajná priemerná úroda príslušnej výrobnjej oblasti, ktorá zohľadňuje extrémny ročník. Charakteristické spôsoby hospodárenia vo výrobnjej oblasti spolu s kvalitou poľnohospodárskeho pôdneho fondu reprezentuje doplnkový údaj – parametrizované úrody na základe HPJ (BPEJ).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Parametrizované úrody sme vyhodnotili podľa jednotlivých zón záujmových územia, keďže na každej zo záujmových plôch máme rôzne kódy BPEJ. Predtým, ako sme začali porovnávať parametrizované úrody s reálnymi, vykonali sme aktualizáciu parametrizovaných úrod (zjednotili sme údaje podľa vlastných nákladov a výsledkov hospodárenia poľnohospodárskych podnikov v SR za roky 1992 až 2013 v triedení podľa výrobných oblastí - VÚEPP).

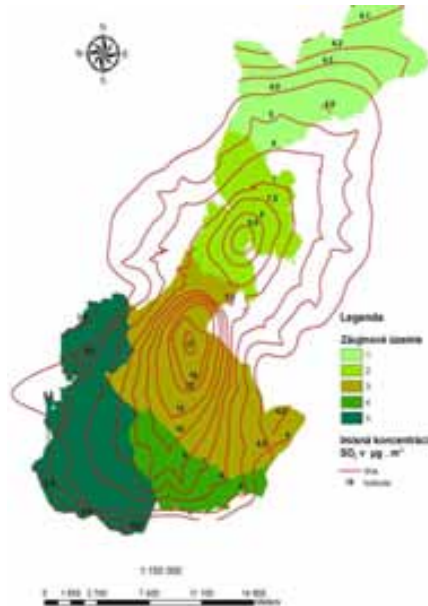


Graf 2: Porovnanie aktuálnych úrod Jačmeňa jarného (*Hordeum sativum*) v t . ha<sup>-1</sup> s parametrizovanými úrodami za roky 2000 -2013 pre jednotlivé časti územia

Tab.1: Úrody Jačmeň jarný (*Hordeum sativum*) v t . ha<sup>-1</sup> za roky 2000 -2013 pre jednotlivé časti územia /4, 5/

Jačmeň jarný ( <i>Hordeum sativum</i> ) úrody v t . ha <sup>-1</sup>														
záujmové územie	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
1	2,5	4	2,6	2,6	4,3	3,5	3,62	3,3	4,3	3,5	2,8	3,5	3,1	4,25
2	2,6	3,3	3,4	3,2	2	3,2	3,6	2,4	4,2	3,9	2,6	3,46	3,3	2,82
3	1,6	4,9	4,6	2,2	6,2	4,8	5	3,9	8	3,9	2,75	4	4,1	5,5
4	1,2	2,8	3,5	4,8	3,8	2,6	2,8	1,9	3,5	3,9	2,5	2,95	2,7	3,6
5	2,8	4,7	3,3	4,1	3,7	4,7	4,6	3,8	4,3	4	2,9	4,3	3,9	4,3

Na grafe 2 je znázornené porovnanie parametrizovaných úrod s reálnymi úrodami pre jačmeň jarný (*Hordeum sativum*) v t . ha<sup>-1</sup> za roky 2000 až 2013 pre záujmové územie ktoré bolo rozdelené do piatich zón a hodnoty sa nachádzajú v tabuľke 1. Graf č. 3 znázorňuje imisnú situáciu na záujmovom území pre rok 2013 vo forme izočiari.



Graf 3: Mapa imisnej koncentrácie SO<sub>2</sub> v µg . m<sup>-3</sup> za rok 2013

#### LITERATÚRA

- /1/ LACKOŔOVÁ Lenka., HALÁSZOVÁ Klaudia., KLIMENT Marcel., URBAN Tomáš. Wind erosion intensity determination using soil particle catcher devices [elektronický zdroj] = Určovanie intenzity veternej erózie pomocou deflametrov] / -- ilustr. -- Popis urobený 14.1. 2014. -- Dostupné na internete. In: Journal of Central European Agriculture. -- ISSN 1332-9049. -- Vol. 14, no. 4 (2013), p. 1364-1372, online.
- /2/ NĚMEC, J. et al., 1992. Oceňování náhrad škod způsobených imisemi na zemědělské výrobě, metodika ÚVTIZ č. 12, 1992, 48 s..
- /3/ Pokrývková, J., 2011. Vplyv imisií na poľnohospodársku výrobu v súčasných podmienkach, dizertačná práca, SPU v Nitre, 2011.
- /4/ VÚEPP 1993, 1994, 1995. Vlastné náklady a výnosy hospodárenia PD a ŠM v SR za rok 1992, 1993, 1994 v triedení podľa výrobných oblastí, vydavateľstvo VÚEPP v Bratislave, 1993, 1994, 1995.
- /5/ VÚEPP 1996 - 2014. Vlastné náklady a výnosy hospodárenia poľnohospodárskych podnikov SR za rok 1995 - 2013 v triedení podľa výrobných oblastí, vydavateľstvo VÚEPP v Bratislave, 1996 – 2014.

#### Pod'akovanie

Práca vznikla s podporou grantového projektu VEGA č. VEGA 1/0456/14 "Management of the Soil Moisture Regime as a Tool for Climate Change Adaptation".

## KVALITA PÍCE JETELOVINOTRAVNÍCH SMĚSÍ NA ORNÉ PŮDĚ VE SRÁŽKOVĚ ROZDÍLNÝCH LETECH

### *THE QUALITY OF LEGUME-GRASS MIXTURES GROWN ON ARABLE LAND IN YEARS WITH DIFFERENT PRECIPITATION*

Jaroslav Lang

Zemědělský výzkum, spol. s r.o., Troubsko, Zahradní 1, 664 41 Troubsko, lang@vupt.cz

#### *Summary*

Experiments with clover-grass mixtures were established in the locality Troubsko (South Moravia, Czech Republic). Experimental mixtures consisted of the following species: alfalfa, red clover, orchard grass, and the interspecific hybrid Felina. In two harvest years that were very different as far as temperatures and the precipitation were concerned, not only yields but also qualitative parameters of harvested forage were monitored with a special regard to the cattle feeding. It was found out that the forage quality may be influenced in two different ways. A direct effect was indicated by a higher content of fibre in some clover-grass mixtures, while an indirect one was indicated by a different botanical composition of mixtures that resulted from changes in the water

*Key words: alfalfa, red clover, orchard grass, Felina, yield, dry*

#### *Souhrn*

Na lokalitě Troubsko byly založeny pokusy s jetelovino travními směsmi. Ve směsích byly použity vojtěška setá, jetel luční, srha laločnatá a mezirodový hybrid Felina. Ve dvou sklizňových letech, které byly teplotně a vláhově velmi rozdílné, byly kromě výnosů sledovány také kvalitativní parametry sklizené píce, která je určena zejména k výkrmu skotu. Bylo zjištěno, že vlivem počasí může dojít k ovlivnění kvality píce dvěma způsoby. Přímý vliv byl prokázán v suchém roce zvýšenou koncentrací vlákniny u některých jetelotrav. Nepřímé ovlivnění spočívá v botanicky rozdílném složení směsí v důsledku změny přísunu vody v daném roce pěstování.

*Klíčová slova: vojtěška, jetel luční, srha laločnatá, Felina, výnos, sucho*

## ÚVOD

Víceleté pícniny bývají pěstovány kromě luk a pastvin také na orné půdě. Slouží jako vhodné přerušovače osevních postupů mezi ostatními plodinami. V minulých deseti letech navzdory zhoršující se kvalitě půdy způsobené především jednostrannými osevními postupy, docházelo bohužel k poklesu nebo ke stagnaci pěstování víceletých pícnin na orné půdě /1/. Víceleté pícniny mají příznivý vliv na fyzikální i chemické vlastnosti půdy, zlepšují její strukturu, působí vododržně např. /6/, protierozně, zanechávají velké množství organické hmoty v půdě, jeteloviny vlivem přítomnosti nitrifikačních bakterií na kořenech obohacují půdu o minerální dusík. Na vláhu nenáročná a hlubokokořenící vojtěška je schopna svými kořeny rozrušovat utužený půdní profil a dokáže přijímat vodu a živiny z hlubších vrstev půdy. Z hlediska kvality píce slouží jeteloviny převážně jako zdroj dusíkatých látek (NL), trávy jsou zástupci zdroje vodorozpustných cukrů (WSC) a stravitelné vlákniny. S výhodou bývají jeteloviny a trávy pěstovány ve směsích. Zejména v suchých oblastech je vojtěška komponentem, který zaručuje výnos. Na vodu náročný travní komponent dokáže využít rosy, která se v porostu vojtěšky drží déle a dává větší výnosy než samostatně pěstovaná /např. 3,5/. Tráva také zrychluje potřebné zavádění píce při sklizni určené k silážování /7/ a zlepšuje kvasné procesy. Základním pravidlem

při sestavování směsí je dodržení poměru osiva tak, aby v první sklizni nepřesáhl podíl travního komponentu 20 % /8/. Pro pěstování směsí v suchých oblastech je potřeba zvýšit podíl osiva až na 50 % obsahu ve směsi /4/. Do pokusu byla zařazena pozdní odrůda srhy laločnaté, která je perspektivní píce pro suché oblasti. V minulosti se do směsí nevyžívala kvůli její ranosti a nevyhovující rytmicitou růstu s jetelovinami. V současné době je na trhu několik pozdních odrůd, které se do směsí mohou použít /4/.

## MATERIÁL A METODY

V roce 2011 byl na lokalitě Troubsko založen maloparcelový pokus s jetelovinotravními směsmi. K vojtěšce seté (vojtěškotrávy, var. č. 1, 2, 5, 6), anebo jeteli lučnímu (jetelotrávy, var. č. 3, 4, 7, 8) byla přidána nová pozdní odrůda srhy laločnaté (pod pracovním názvem VV 115-132/10) nebo běžně používaný mezirodový hybrid (MRH) Felina jako kontrola (tab. 1).

Tab. 1: Složení směsí a jejich výsevek

číslo	Směs	zastoupení [%]		výsevek [kg.ha <sup>-1</sup> ]	
		jetelovina	tráva	jetelovina	tráva
1	vojtěška setá + srha laločnatá	80	20	14,4	4
2	vojtěška setá + srha laločnatá	50	50	9	10
3	jetel luční + srha laločnatá	80	20	14,4	4
4	jetel luční + srha laločnatá	50	50	9	10
5	vojtěška setá + MRH Felina	80	20	14,4	6
6	vojtěška setá + MRH Felina	50	50	9	15
7	jetel luční + MRH Felina	80	20	14,4	6
8	jetel luční + MRH Felina	50	50	9	15

Tab. 2: Klimatologické hodnocení vegetačních měsíců v roce 2012 a 2013

měsíc	rok 2012				rok 2013			
	teplota [°C]		srážky [mm]		teplota [°C]		srážky [mm]	
	průměr	hodnocení	celkem	hodnocení	průměr	hodnocení	celkem	hodnocení
leden	0,7	1	27,5	0	-1,3	0	21,3	0
únor	-3,8	-1	5,6	-2	0,4	0	47,5	1
březen	6,1	1	1,8	-3	1,0	-1	42,1	1
duben	9,5	0	12,1	-2	9,5	0	18,0	-1
květen	16,0	1	25,4	-2	13,8	0	105,6	1
červen	18,2	1	60,6	0	16,9	0	116,2	1
červenec	20,4	2	60,0	0	20,8	2	4,8	-3
srpen	19,7	2	72,4	0	19,3	1	68,8	0
září	14,5	0	32,1	0	12,5	-1	48,4	0
říjen	10,2	1	35,1	0	9,5	0	33,3	0
listopad	5,7	2	20,1	-1	5,1	2	21,5	-1
prosinec	-1,8	0	29,9	0	1,7	1	4,1	-3

Hodnocení teplot: -1 = studený, 0 = normální, 1 = teplý, 2 = silně teplý

Hodnocení srážek: -3 = mimořádně suchý, -2 = silně suchý -1 = suchý, 0 = normální, 1 = vlhký

Před založením, ani během kultivace, nebyla použita žádná hnojiva. V roce 2011 probíhaly odplevelovací seče, rok 2012 byl první sklizňový, rok 2013 druhý sklizňový. V obou letech byly provedeny čtyři sklizně v optimální zralosti píce. Statistické hodnocení výnosů suché hmoty bylo provedeno metodou analýzy variance (ANOVA  $P > 0.05$ ) s následným hodnocením Tukeyovým testem. Lokalita Troubsko patří do řepařské výrobní oblasti, s nadmořskou výškou 270 m, průměrnou roční teplotou 8,6 °C, ve vegetaci (duben – září) 14,8 °C. Roční suma srážek činí 547 mm, ve vegetaci 346 mm. Průměrné měsíční teploty a srážky ve sklizňových letech uvádí tabulka č. 2, ve které je uvedeno klimatologické hodnocení měsíců. Hodnocení bylo provedeno podle doporučení WMO pro popis klimatologických podmínek /2/. Lze konstatovat, že vegetační období 2012 na lokalitě Troubsko bylo charakterizováno silně podnormálními srážkami a naopak nadnormálními teplotami, zatím co rok 2013 byl teplotně i srážkově značně kolísavý.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

V obsahu NL bylo zjištěno vyšší zastoupení u vojtěškotrav (var. č. 1, 2, 5, 6). U variant se stejným složením, ale rozdílným poměrem osiva nebyl zjištěn vliv poměru osiva (tab. č. 3). Vliv rozdílného travního komponentu na obsah NL nebyl zjištěn. Rozdíly v obsahu NL u variant mezi sklizňovými roky byly zjištěny u varianty č. 3, která v roce 2012 vykazovala 173,35 g.kg<sup>-1</sup> a v roce 2013 145 g.kg<sup>-1</sup>, dále u varianty č. 7, která v roce 2012 vykazovala 168,44 g.kg<sup>-1</sup> a v roce 2013 150,92 g.kg<sup>-1</sup> a u varianty č. 8, která v roce 2012 vykazovala 164,75 g.kg<sup>-1</sup> a v roce 2013 145,99 g.kg<sup>-1</sup>. Pokles obsahu dusíkatých látek je způsoben nárůstem travního komponentu ve vlhčím roce 2013 /4/ a zároveň úbytkem jetele z porostu ve druhém sklizňovém roce. Za úbytkem jetele lučního z porostu stojí nevhodné klimatické podmínky /4/.

V obsahu vlákniny bylo zjištěno, že var. č. 8 obsahuje více vlákniny než vojtěškotravy (var. č. 1,2,5,6) a varianta č. 4. Vyšší zastoupení vlákniny v jetelotrávách je způsobeno spolupůsobením dvou faktorů: dřívějším stárnutím jetele lučního v suchých podmínkách a přítomností MRH Felina ve směsi, který, jako košťavovitý hybrid, přirozeně obsahuje více vlákniny. Ve vojtěškotrávách k nárůstu obsahu vlákniny nedošlo. Rozdíly mezi sklizňovými roky byly zjištěny pouze u jetelotrav a to u varianty č. 3, která v roce 2012 vykazovala 256,59 g.kg<sup>-1</sup> a v roce 2013 277,85 g.kg<sup>-1</sup>, dále u varianty č. 7, která v roce 2012 vykazovala 259,43 g.kg<sup>-1</sup> a v roce 2013 279,31 g.kg<sup>-1</sup> a u varianty č. 8, která v roce 2012 vykazovala 267,25 g.kg<sup>-1</sup> a v roce 2013 287,16 g.kg<sup>-1</sup>. U vojtěškotrav nebyl zjištěn meziroční nárůst obsahu vlákniny.

Vyšší obsah WSC byl zjištěn u jetelotrav (var. 3, 4, 7, 8) (tab. 3), což potvrzuje skutečnost, že jetel luční obsahuje více WSC než vojtěška setá. U všech sledovaných variant došlo v roce 2013 k průkaznému nárůstu obsahu WSC. To je způsobeno vyšším zastoupením travního komponentu vlivem dostatku vody /4/. Vliv poměru osiva, ani vliv travního komponentu u nebyl zjištěn.

NEL hodnoty jsou vyšší u vojtěškotrav (var. č. 1, 2, 5, 6) a nebyl zde prokázán vliv travního komponentu. U jetelotrav obsahující sruhu laločnatou jsou hodnoty NEL vyšší než u směsí, které obsahují MRH Felina (tab. č. 3). Ve sklizňových letech byly zjištěny rozdíly u variant č. 1,3,5,6,7,8. U těchto variant došlo v roce 2013 ke snížení NEL.

Nejvyšší SOH 71,8 % byla zaznamenána u var. č. 6, která se lišila od variant 2, 3, 4 a 8. Nebyly zjištěny rozdíly SOH mezi sklizňovými roky, nebyl potvrzen vliv poměru osiva ani vliv travního komponentu.

Při hodnocení kvality píce je potřeba hodnotit i její výnos. Na základě našich dřívějších studií zabývající se výnosem daných směsí /5/ platí, že v suchých oblastech jsou nejvýnosnější vojtěškotravy bez ohledu na jejich poměrové složení nebo na výběr travního komponenta. Jetelotrávy se do těchto podmínek nehodí, protože přináší velmi malé výnosy.

Tab. 3: Statistické hodnocení kvality píce

var.č.	NL [g.kg <sup>-1</sup> ]	vláknina [g.kg <sup>-1</sup> ]	WSC [g.kg <sup>-1</sup> ]	NEL [MJ.kg <sup>-1</sup> ]	OMD [%]
1	194,60 <sup>a</sup>	262,42 <sup>ab</sup>	37,36 <sup>ac</sup>	6,43 <sup>ab</sup>	70,15 <sup>abc</sup>
2	201,78 <sup>a</sup>	259,62 <sup>abc</sup>	38,88 <sup>ac</sup>	6,44 <sup>ab</sup>	69,20 <sup>ab</sup>
3	159,65 <sup>b</sup>	267,22 <sup>abd</sup>	47,01 <sup>b</sup>	6,06 <sup>c</sup>	69,68 <sup>ab</sup>
4	159,97 <sup>b</sup>	264,15 <sup>ab</sup>	48,64 <sup>b</sup>	6,12 <sup>c</sup>	69,65 <sup>ab</sup>
5	194,60 <sup>a</sup>	259,62 <sup>abc</sup>	40,11 <sup>ac</sup>	6,45 <sup>a</sup>	70,99 <sup>bc</sup>
6	201,78 <sup>a</sup>	259,10 <sup>ac</sup>	41,47 <sup>a</sup>	6,45 <sup>ab</sup>	71,80 <sup>c</sup>
7	159,68 <sup>b</sup>	269,37 <sup>bd</sup>	48,78 <sup>b</sup>	5,89 <sup>de</sup>	70,15 <sup>abc</sup>
8	155,37 <sup>b</sup>	277,20 <sup>de</sup>	49,53 <sup>b</sup>	5,78 <sup>de</sup>	69,56 <sup>ab</sup>

Písmena v horním indexu zařazují varianty do skupin podle výsledků ANOVY na hladině významnosti P>0.05.

Vliv rozdílných klimatických podmínek na kvalitu píce jetelovinotravních směsí se může projevit přímým i nepřímým způsobem. Přímou může být ovlivněn obsah vlákniny ve směsích jetele lučního u jetele lučního a u MRH Felina. Rostliny při nedostatku vody v kombinaci

s vyššími teplotami rychleji stárnou a v době optimální sklizně může být v rostlinách vytvořeno vyšší množství vlákniny. Nepřímým způsobem může být kvalita píče ovlivněna změnou botanického zastoupení porostu. Při zvyšujícím se zastoupení travního komponentu dochází ke snižování obsahu dusíkatých látek a k nárůstu obsahu vodorozpustných cukrů. Vliv teplotně a srážkově rozdílných vegetací se neprojevil na NEL a SOH. Pozdní odrůda srhy laločnaté VV 115-132/10 je do jetelovino-travních směsí vhodnou alternativou k MRH Felina. Je výkonnou trávou v suchých podmínkách a má sladěnou periodicitu růstu s jetelovinami. V jetelotrávách zpomaluje proces stárnutí píče a zpomaluje pokles energetické hodnoty krmiva. To ale prakticky ztrácí na významu v podmínkách sucha, protože jetelotrávy mají nízké výnosy a není vhodné je v takových podmínkách pěstovat

#### **LITERATURA**

Použité zdroje jsou k dispozici u autora článku.

#### **Poděkování**

Výsledek byl získán za částečné institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace



## VLIV AZOBARVIV A PRODUKTŮ JEJICH BIODEGRADACE NA RŮST OKŘEHKU (*LEMNA MINOR* L.)

### *THE EFFECT OF AZO DYES AND THEIR BIODEGRADATION PRODUCTS ON DUCKWEED (*LEMNA MINOR* L.) GROWTH*

Klára A. Mocová, Lucie Gyömbérová

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, FTOP, Ústav chemie ochrany prostředí, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice, Klara.Mocova@vscht.cz

#### *Summary*

Azo dye Reactive Orange 16 (50 mg.l<sup>-1</sup>) was biodegraded by ligninolytic fungus *Irpex lacteus* Fr. in Kirk medium and sterile tap water. Effect on leaf area growth rate and chlorophyll content of aquatic plant duckweed (*Lemna minor* L.), was examined in original and biodegraded dye. The toxicity of samples with azo dye or its biodegradation products was dependent both on concentration and growth medium used for biodegradation process. In comparison with original dye, degradation products had more toxic effect in Kirk medium, while similar (neutral) effect in tap water. In terms of phytotoxicity, biodegradation of the dye in tap water seems as the more suitable way.

*Key words:* *Lemna minor* L., azo dyes, Reactive orange 16, biodegradation, phytotoxicity

#### *Souhrn*

Azobarvivo Reactive Orange 16 (50 mg.l<sup>-1</sup>) bylo podrobno biodegradaci ligninolytickou houbou *Irpex lacteus* Fr. v Kirkově médiu a sterilní kohoutkové vodě. U původního i biodegradovaného barviva byl sledován účinek na rychlost růstu listové plochy i obsah chlorofylu u vodní rostliny okřešku (*Lemna minor* L.) Toxicitu vzorků s azobarvivem či jeho produktů biodegradace ovlivňoval kromě koncentrace také druh kultivačního média použitého během biodegradčního procesu. Ve srovnání s původním barvivem působily degradační produkty v Kirkově médiu toxicitěji, zatímco v kohoutkové vodě podobně (neutrálně). Z hlediska fytoxicity se zdá být vhodnější biodegradace barviva v kohoutkové vodě.

*Klíčová slova:* *Lemna minor* L., azobarviva, Reactive orange 16, biodegradace, fytoxicita

## ÚVOD

Díky průmyslu se do vodního prostředí dostává velké množství nežádoucích látek, především organického charakteru, které negativně ovlivňují biologické pochody a život ve vodě /1/. Tyto látky je pak třeba obtížně separovat metodami, které nejsou šetrné k životnímu prostředí a zároveň jsou i finančně náročné. Alternativním řešením je využít biodegradční potenciál ligninolytických (dřevokazných) hub, jakou je např. houba bílé hniloby bránovitka mléčná (*Irpex lacteus* Fr.). U těchto hub byla zjištěna schopnost degradovat organické látky /2/, včetně azobarviv, jakým je např. Reactive Orange 16 (RO16), používané převážně v textilním průmyslu. Jako produkty biodegradace pomocí hub však mohou vznikat i látky toxicitější než výchozí barvivo, a proto je nutné v průběhu odbarvování sledovat i degradační produkty a jejich působení na vodní organismy včetně rostlin /3/.

Cílem této práce bylo zjistit, jaké účinky má přítomnost azobarviva RO16 a jeho biodegradčních produktů v roztocích na okřehek (*Lemna minor* L.).

## MATERIÁL A METODA

Barvivo RO16 ( $50 \text{ mg.l}^{-1}$ ) bylo rozpuštěno v Kirkově médiu /4/ nebo sterilní kohoutkové vodě. Oba vzorky byly podrobeny kontinuální biodegradaci v rotačním biologickém reaktoru po dobu 7 dní, kde byla na polyurethanových discích nanesena houba *Irpex lacteus* Fr. (kmen Fr. 238317/93). Testy fytotoxicity původního i biodegradovaného barviva byly provedeny s okřehkem (*Lemna minor* L., kultura Steinberg). Celkem bylo otestováno 6 vzorků:

- i) RO16 ve sterilním Steinbergově médiu ( $50 \text{ mg.l}^{-1}$ , pH ~ 5,5)
- ii) RO16 ve sterilním Kirkově médiu ( $50 \text{ mg.l}^{-1}$ , pH ~ 3,5)
- iii) RO16 v Kirkově médiu po biodegradaci: (RO16 ~  $9 \text{ mg.l}^{-1}$ ; neznámé produkty biodegradace, *Irpex lacteus*, pH ~ 4,5)
- iv) sterilní Kirkovo médium (pH ~ 4,5)
- v) RO16 ve sterilní kohoutkové vodě ( $50 \text{ mg.l}^{-1}$ , pH ~ 6,0)
- vi) RO16 v kohoutkové vodě po biodegradaci: (RO16 ~  $12 \text{ mg.l}^{-1}$ , neznámé produkty biodegradace, *Irpex lacteus*, pH ~ 4,6)

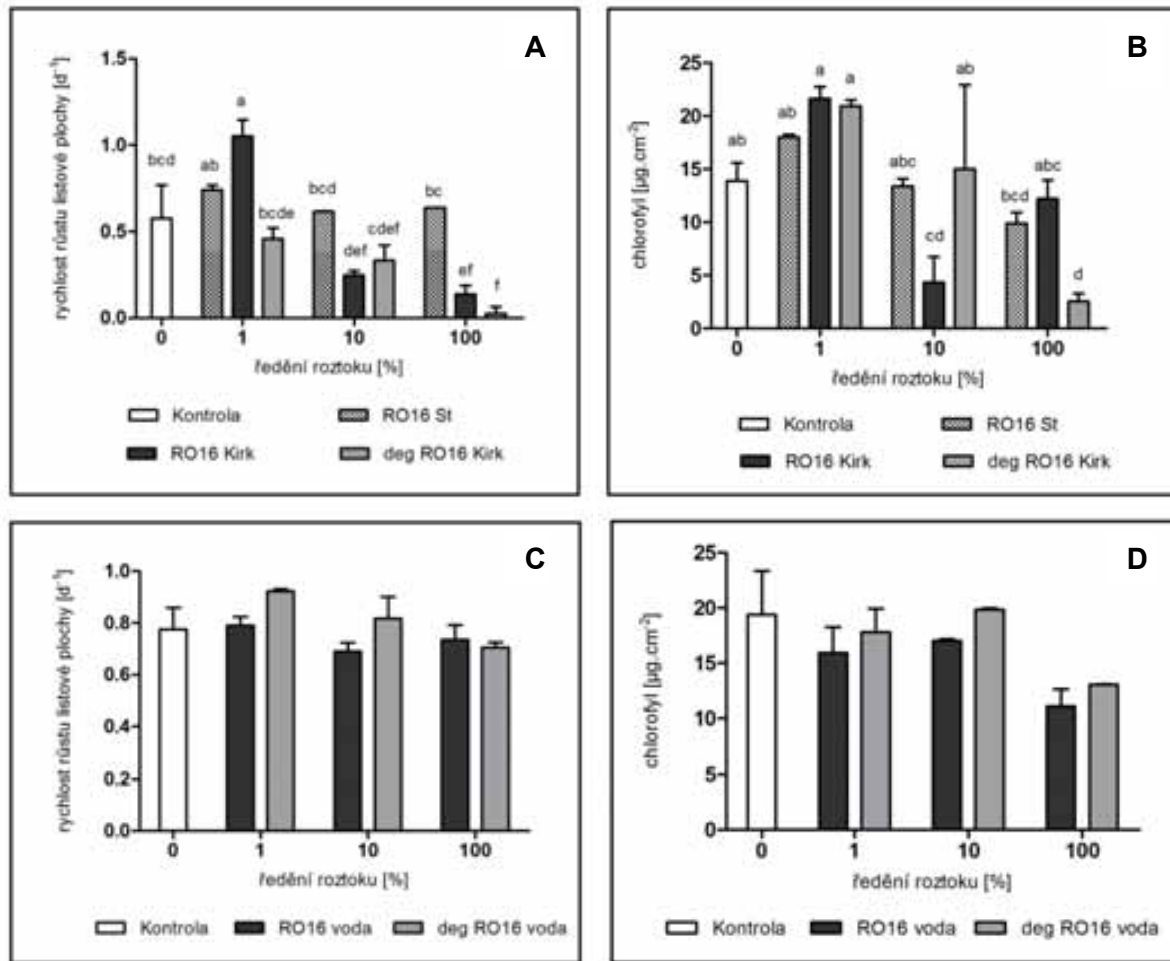
U vzorků (ii – vi) bylo upraveno pH na hodnotu 5,5. Výchozí koncentrace vzorků i - vi (100 %) byly naředěny (10 %, 1 %) sterilním Steinbergovým médiem /5/, které zároveň sloužilo jako kontrola (0 %). Vzorky podrobené biodegradaci (iii, vi) byly ponechány s obsahem *Irpex lacteus*, neboť autoklávováním roztoků po ukončení degradace by došlo ke změně jejich chemického složení.

Rostliny byly pěstovány ve 150ml kádinkách s objemem vzorku nebo kontrolního média 100 ml po dobu 7 dní při teplotě  $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  a osvětlením přibližně 5000 lux a světelným cyklem 16 h/ 8 h (světlo / tma). V každé kádince bylo umístěno na začátku 12 stélek (lístků) okřehku. Na začátku, po 3 dnech a na konci expozice byla pomocí digitální analýzy obrazu (Nis Elements /6/) stanovena celková listová plocha rostlin. Po ukončení expozice byl stanoven obsah chlorofylu a + b na jednotku listové plochy (extrakce v methanolu, spektrofotometr BioTek PowerWave XS, USA, výpočet dle /7/).

Hodnoty velikosti listové plochy byly vyjádřeny v podobě růstové rychlosti, obsah chlorofylu pouze jako výstupní hodnota na konci testu. Výsledky byly hodnoceny pomocí analýzy rozptylu jednoduchého třídění (ANOVA) a Tukeyho testů mnohonásobného srovnávání v programu GraphPad Prism /8/.

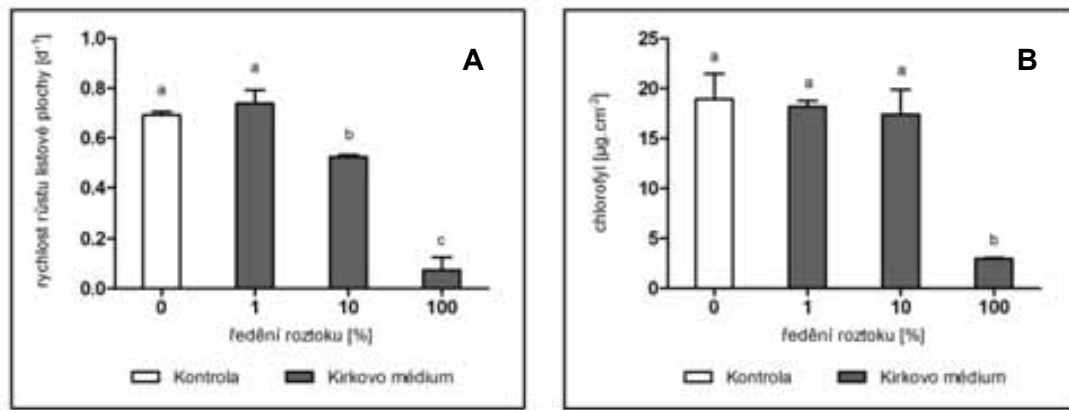
## VÝSLEDKY A DISKUSE

RO16 rozpuštěné ve Steinbergově médiu používaném standardně pro kultivaci okřehku /5/ nemělo žádný vliv na růst listové plochy (graf 1, A); mírný pokles obsahu chlorofylu u 100% vzorku nebyl průkazný (graf 1, B). Stejně koncentrace barviva v Kirkově médiu, které je vhodné pro kultivaci ligninolytických hub a činnost jejich enzymů /4/, naopak působily na okřehk inhibičně, s výjimkou 1% roztoku a v případě obsahu chlorofylu také 100% roztoku (graf 1, A, B). Ve vzorcích degradovaného RO16 v Kirkově médiu byl s výjimkou 10% roztoků růst rostlin oproti původnímu barvivu nižší a v případě 100% vzorku byla zjištěna výrazná, průkazná inhibice ve srovnání s kontrolou (graf 1, A, B). Barvivo v kohoutkové vodě nepůsobilo na rostliny toxicky před ani po biodegradaci v žádném ředění. Po biodegradaci došlo téměř vždy k mírnému zvýšení růstu listové plochy i obsahu chlorofylu, ale rozdíly nebyly významné (graf 1, C, D).



Graf 1: Vliv původního a biodegradovaného azobarviva RO16 na rychlost růstu listové plochy (A, C) a obsah chlorofylu (B, D) u okřehku, v závislosti na použití různých kultivačních médií. Legenda: Kontrola (0 %) = Steinbergovo médium; RO16 St = RO16 ve Steinbergově médiu (100 % ~ 50 mg.l<sup>-1</sup>); RO16 Kirk = RO16 v Kirkově médiu (100 % ~ 50 mg.l<sup>-1</sup>); deg RO16 Kirk = RO16 v Kirkově médiu po degradaci (100 % ~ 9 mg.l<sup>-1</sup>); RO16 voda = RO16 v kohoutkové vodě (100 % ~ 50 mg.l<sup>-1</sup>); deg RO16 voda = RO16 v kohoutkové vodě po degradaci (100 % ~ 12 mg.l<sup>-1</sup>); všechny vzorky 1 % a 10 % jsou ředěny Steinbergovým médiem; sloupce označené stejnými písmeny se mezi sebou statisticky významně neliší (Tukeyho test mnohonásobného srovnávání,  $\alpha = 0,05$ ).

Výsledky naznačují, že toxicitu barviva a jeho biodegradčních produktů způsobuje především Kirkovo médium, jak bylo ověřeno v dalším experimentu (graf 2). Důvodem toxicity tohoto média pro rostliny by mohlo být jak nízké pH (resp. vznik sraženin po jeho úpravě), tak přítomnost vyššího množství kyseliny nitrilotrioctové, u které byla zjištěna toxicita vůči vodním organismům /9/. Dále by bylo vhodné ověřit, jakou měrou se na toxicitě roztoků může podílet také přítomnost houby *Irpex lacteus*, případně jejich extracelulárních enzymů. Biodegradční produkty barviva RO16 v kohoutkové vodě měly z hlediska fytoxicity velmi příznivé výsledky, avšak samotná biodegradace byla ve srovnání s degradací v Kirkově médiu méně účinná (76 % v kohoutkové vodě vs. 82 % v Kirkově médiu). V budoucnu by proto bylo dobré pokusit se nějakým způsobem zvýšit účinnost biodegradace v kohoutkové vodě a následně otestovat vliv degradčních produktů na růst rostlin.



Graf 2: Rychlost růstu listové plochy (A) a obsah chlorofylu (B) u okřehku pěstovaného v Kirkově médiu. Legenda: Kontrola (0 %) = Steinbergovo médium, vzorky 1 % a 10 % byly ředěny Steinbergovým médiem, sloupce označené stejnými písmeny se mezi sebou statisticky významně neliší (Tukeyho test mnohonásobného srovnávání,  $\alpha = 0,05$ ).

## LITERATURA

- /1/ Tigini, V., Giansanti, P., Mangiavillano, A., Pannocchia, A., Varese, G.C.: Evaluation of toxicity, genotoxicity and environmental risk of simulated textile and tannery wastewaters with a battery of biotests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 2011: 866-873.
- /2/ Zachař, P., Novotný, Č.: Biodegradace některých organopolutantů pomocí ligninolytických hub. *Chemické listy*, 8, 2006: 709-722.
- /3/ Novotný, Č., Svobodová, K., Erbanová, P., Cajthaml, T., Kasinath, A., Lang, E., Šašek, V.: Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology & Biochemistry*, 36, 2004: 1545-1551.
- /4/ Tien, M., Kirk, T.K.: Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology*, 161, 1988: 238-249.
- /5/ ISO 20079: Water quality - Determination of toxic effect of water constituents and waste to duckweed (*Lemna minor*) - Duckweed growth inhibition test. 2005.
- /6/ NIS-Elements [CD-ROM]. ver. 4.2 Praha: Laboratory Imaging, 2014.
- /7/ Wellburn, A.R.: The spectral determination of chlorophyll a and chlorophyll b as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144, 1994: 307-313.
- /8/ GraphPad Prism [CR-ROM]. Ver. 5.01. La Jolla: GraphPad Software, Inc., 2009.
- /9/ Schmidt, C.K., Brauch, H.J.: Impact of aminopolycarboxylates on aquatic organisms and eutrophication: Overview of available data. *Environmental Toxicology*, 19, 2004: 620 – 637.

## Poděkování

Autorky děkují Ing. J. Šimovi (VŠCHT, Ústav chemického inženýrství) za poskytnutí barviva a jeho biodegradačních produktů.

## VPLYV KADMIA A ARZÉNU NA MAXIMÁLNY KVANTOVÝ VÝŤAŽOK FOTOSYSTÉMU II V LISTOCH SÓJE FAZUĽOVEJ

### *EFFECT OF CADMIUM AND ARSENIC ON MAXIMUM QUANTUM YIELD OF PHOTOSYSTEM II IN LEAVES OF SOYBEAN*

Beáta Piršelová, Terézia Gálusová

Univerzita Konštantína filozofa v Nitre, Fakulta prírodných vied, Katedra botaniky a genetiky, Nábřežie mládeže 91, 949 11, Nitra, bpirselova@ukf.sk

#### *Summary*

Effect of cadmium (50 mg.kg<sup>-1</sup> of soil) and arsenic (5 mg.kg<sup>-1</sup> of soil) on maximum quantum yield of fluorescence (Fv/Fm) was tested on two varieties of soybean (*Glycine max* cvs. Bólyi 44 and Cordoba). In case of variety Bólyi 44, stimulatory effect of arsenic on Fv/Fm ratio was observed on the lowest leaves – SL (by 2,5 %) and first fully developed trifoliate leaves VL1 (by 4,06 %). On the contrary, Fv/Fm decreased by 8,6 % in case of the youngest leaves VL2. In case of variety Cordoba, the highest rate of inhibition of fluorescence due to effect of arsenic was observed in the lowest leaves (by 5,62 %). A similar difference in tendency of Fv/Fm changes was observed also as effect of cadmium. At variety Bólyi 44, the most sensitive reaction showed leaves VL2 (decrease by 10,75 %), while, at variety Cordoba, leaves VL2 showed the highest tolerance (decrease by 1,2 %).

*Key words: chlorophyll fluorescence, cadmium, arsenic, soybean, tolerance*

#### *Súhrn*

Vplyv kadmia (50 mg.kg<sup>-1</sup> pôdy) a arzénu (5 mg.kg<sup>-1</sup> pôdy) na maximálny kvantový výťažok fluorescencie (Fv/Fm) bol sledovaný na dvoch odrodách sóje fazuľovej (*Glycine max* cvs. Bólyi 44 a Cordoba). Stimulačný vplyv arzénu na Fv/Fm v prípade odrody Bólyi 44 sa prejavil na spodných listoch - SL (o 2,5 %) a prvých plne vyvinutých trojpočetných listoch VL1 (o 4,06 %). V najmladších listoch VL2 došlo naopak ku poklesu Fv/Fm o 8,6 %. V prípade odrody Cordoba sme vplyvom arzénu naopak zaznamenali najvyššiu mieru inhibície fluorescencie v spodných listoch (o 5,62 %). Podobný rozdiel v tendencii zmien Fv/Fm sme zaznamenali aj vplyvom kadmia. V prípade odrody Bólyi 44 reagovali najcitlivejšie listy VL2 (pokles o 10,75 %), v prípade odrody Cordoba prejavili listy VL2 najvyššiu toleranciu (pokles o 1,2 %).

*Kľúčové slová: fluorescencia chlorofylu, kadmium, arzén, sója, tolerancia*

## ÚVOD

Problematika znečistenia životného prostredia je stále aktuálna, pričom medzi najsledovanejšie znečisťovatele patria ťažké kovy a metaloidy (arzén). Kadmium a arzén sú pomerne rýchlo prijímané koreňmi rastlín a transportované xylémom do listov. Ich toxický účinok sa prejaví v znížení produkcie biomasy, inhibícii fotosyntézy a transpirácie a mnohých ďalších metabolických procesov /1/. Redukcia obsahu chlorofylov môže byť výsledkom enzymatickej degradácie daných pigmentov alebo inhibíciou ich biosyntézy /2/, v dôsledku kovmi (kadmium) indukovanej deficiencie železa a zinku /3/, zníženia obsahu horčíka /4/ alebo väzby kovov s tiolovými skupinami viacerých enzýmov /5/. Hoci zníženie obsahu chlorofylov sa považuje za indikátor poškodenia rastlín kovmi /6/, vo všeobecnosti nemožno považovať zmeny v obsahu chlorofylov za špecifické biomarkery pre monitoring stresu ťažkými kovmi v rastlinách /3/.

Meranie fluorescence chlorofylu patrí medzi citlivé a neinvazívne metódy hodnotenia citlivosti rastlín na rôzne stresové faktory /7, 8/. Význam danej metódy spočíva najmä v tom, že dokáže odhaliť zmeny na úrovni fotosystému II skôr, než sa tieto zmeny prejavia na raste rastliny.

Cieľom našich analýz bolo charakterizovať dve odrody sóje fazuľovej z hľadiska tolerance voči iónom kadmia a arzenu na základe zmien v rastových parametroch a parametroch fluorescence chlorofylu (Fv/Fm) asimilačných listov. Zároveň sme hodnotili vplyv genotypu a vývinového štádia listu na sledované parametre.

## MATERIÁL A METÓDY

### Založenie nádobového pokusu

Semená sóje fazuľovej (*Glycine max* cv. Bólyi 44 a cv. Cordoba) boli zasiate do zmesi rašelinovej zeminy BORA (pH 7,5) a perlitu v pomere 4:1. Nádobový pokus bol uskutočnený v klimaboxe, kde boli zabezpečené konštantné podmienky pokusu (teplota 20 °C, vlhkosť vzduchu 60 – 70 %, svetelná perióda 12 hod. svetlo/12 hod. tma, intenzita žiarenia maximálne 800  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Rastliny boli pestované do štádia vytvorenia prvých asimilačných listov. Následne boli zaliate roztokmi: ( $\text{Cd}^{2+}$  - 50  $\text{mg.kg}^{-1}$  a  $\text{As}^{3+}$  - 5  $\text{mg.kg}^{-1}$  pôdneho substrátu). Ťažké kovy boli aplikované vo forme roztokov  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{As}_2\text{O}_3$ . Kontrolné varianty boli zaliate destilovanou vodou.

### Meranie fluorescence chlorofylu

Po 10 dňoch rastu v kontaminovanej pôde boli listy troch vývinových štádií (SL – spodný list, VL1 – prvý plne vyvinutý trojpočetný list, VL2 – najmladší (nie úplne vyvinutý) trojpočetný list) použité na meranie fluorescence chlorofylu. Fluorescenciu chlorofylu sme merali pomocou kinetickej fluorescenčnej kamery GFPCam (Photon Systems Instruments, Brno, Česká republika). Po svetelnej adaptácii rastlinného materiálu počas 5 minút boli merané parametre fluorescence chlorofylu (Fv – variabilná fluorescencia, Fm – maximálna fluorescencia). Maximálny kvantový výťažok fotosystému II bol vypočítaný podľa vzťahu:  $\text{Fv/Fm} = (\text{Fm} - \text{Fo}) / \text{Fm}$ . Merania fluorescence chlorofylu boli opakované 10 krát vo všetkých variantoch experimentu.

### Štatistické spracovanie údajov

Údaje boli spracované pomocou štatistického softvéru XLSTAT 2013. Priemery súborov boli porovnávané pomocou Duncan testu pri hladine pravdepodobnosti 5%. Dvojfaktorová analýza variability (ANOVA) bola použitá na zhodnotenie vplyvu genotypu, typu listu a interakcie genotypu a typu listu na sledovaný parameter (Fv/Fm).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

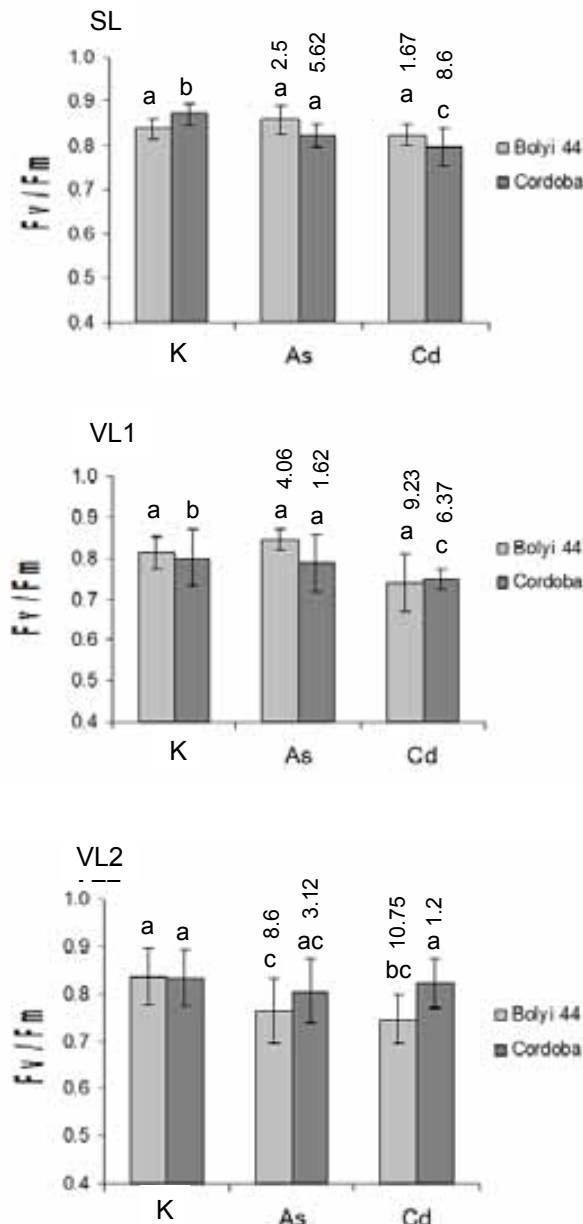
Vplyvom aplikovaných dávok arzenu a kadmia sme na rastlinách nezaznamenali žiadne vizuálne symptómy toxicity.

Zmeny na úrovni fluorescence chlorofylu sme hodnotili na troch vývinových štádiách listov. Namerané hodnoty maximálneho kvantového výťažku fluorescence chlorofylu kontrolných a stresovaných rastlín sóje znázorňuje Obrázok 1. Stimulačný vplyv arzenu na Fv/Fm ratio sme zaznamenali v prípade odrody Bólyi 44 na spodných listoch SL (nárast o 2,5 %) a VL1 (nárast o 4,06 %). Dané zmeny neboli štatisticky významné. V najmladších listoch (VL2) danej odrody došlo vplyvom arzenu naopak ku štatisticky významnému poklesu Fv/Fm o 8,6 % (Fig. 1). V prípade odrody Cordoba sme naopak zaznamenali najvyššiu mieru inhibície fluorescence v spodných listoch (pokles o 5,62 %) (Obrázok 1).

Rastliny všeobecne vykazujú pomerne veľké rozdiely v citlivosti PSII voči arzenu. Žiadne zmeny vo fluorescencii (Fv/Fm) nezaznamenali /9/ v rastlinách požltu (*Carthamus tinctorius*) rastúcich v pôde kontaminovanej arzénom (90  $\text{mg.kg}^{-1}$  pôdy). /10/ zaznamenali štatisticky významný pokles Fv/Fm v listoch ovsa až pri dávke 160  $\text{mg.kg}^{-1}$  pôdy.

Podobný rozdiel v tendencii zmien Fv/Fm v závislosti od vývinového štádia listov sme zaznamenali aj vplyvom aplikovanej dávky kadmia. Kým v prípade odrody Bólyi 44 reagovali na

ióny kadmia najcitlivejšie najmladšie listy (SL pokles o 1,67 %, VL1 o 9,23 % a VL2 o 10,75 %), v prípade odrody Cordoba prejavili listy VL2 najvyššiu toleranciu (SL pokles o 8,6 %, VL1 o 6,37 % a VL2 o 1,2 %) (Obrázok 1). Mnohé štúdie poukázali na narušenie fotosystému II vplyvom kadmia. Poškodenie reakčného centra a anténového systému PSII sa prejaví znížením hladiny plastochinónu, feredoxínu a znížením aktivity ATP-ázy. Zároveň sa narúša aj systém fixácie CO<sub>2</sub> inhibíciou viacerých enzýmov /11, 12/.



Obrázok 1 Vplyv arzénu (As) a kadmia (Cd) na maximálny kvantový výťažok fluorescencie chlorofylu (Fv/Fm) troch vývinových štádií listov: SL – spodný list, VL1 – prvý plne vyvinutý trojpočetný list, VL2 – najmladší (nie úplne vyvinutý) list. Hodnoty predstavujú aritmetický priemer ± štandardná odchýlka (n=10). Rôzne písmená nad stĺpcami grafu vyjadrujú štatisticky významný rozdiel pri hladine P<0,05. Údaje nad stĺpcami vyjadrujú zmeny oproti kontrole (%).

Výsledky dvojfaktorovej analýzy (ANOVA) naznačujú, že zmeny v hodnotách Fv/Fm sú v prípade aplikácie kadmia aj arzénu ovplyvnené typom listu (P<0,05) a tiež interakciou genotypu

a typu listu ( $P < 0,05$ ).

#### LITERATÚRA

- /1/ Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.: Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 2005: 21–34.
- /2/ Azevedo, H., Glória Pinto, C., Santos, C.: Cadmium effects in sunflower: membrane permeability and changes in catalase and peroxidase activity in leaves and calluses. *Journal of Plant Nutrition*, 28, 2005: 2233-2241.
- /3/ Masarovičová, E., Cicák, A., Štefančík, I.: Plant responses to air pollution and heavy metal stresses. In: Pessarakli, M. (ed.): *Handbook of Plant and Crop Stress*. New York, Basel: Marcel Dekker, 1999: 569-598.
- /4/ Hashiri, F.: Cadmium uptake by plants. *Journal of Environmental Quality*, 2, 1973: 93-95.
- /5/ Stobart, A.K., Griffith, W.T., Bukhari, I.A., Sherwood, R.P.: The effect of Cd on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiologia Plantarum*, 63, 1985: 293-298.
- /6/ Kolotov, B.A., Demidov, V.V., Volkov, S.N.: Chlorophyll content as a primary indicator of the environment degradation due to contamination with heavy metals. *Doklady biological sciences*, 393, 2003: p. 550.
- /7/ Lichtenthaler, H.K., Miehe, J.A.: Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in Plant Science*, 2, 1997: 316-320.
- /8/ Baker, N.R., Rosenqvist, E.: Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of experimental botany*, 55, 2004: 1607-1621.
- /9/ Heidari, M., Mohamadi, S.: Effect of arsenic and nitrogen application on grain yield and some physiological parameters of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Journal of Advanced Agricultural Technologies*, 1, 2014: 48-51.
- /10/ Stoeva, N., Bineva, T.: Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in as-contaminated soil. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 29, 2003: 87-95.
- /11/ Sigfridsson, K.G., Bernat, G., Mamedov, F., Styring, S.: Molecular interference of  $Cd^{2+}$  with Photosystem II. *Biochim Biophys Acta*, 1659, 2004: 19–31.
- /12/ Mallick, N., Mohn, F.H.: Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55, 2003: 64–69.

#### Pod'akovanie

Práca bola podporená výskumnými zámermi VEGA 1/0061/15 a výskumným zámerom Európskeho spoločenstva v rámci projektu: Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“, projekt číslo 26220220180.



## PŘEDBĚŽNÉ VÝSLEDKY OŠETŘENÍ CHLADNÝM PLAZMATEM U BRUKVE ŘEPKY OLEJKY

### *PRELIMINARY RESULTS OF COLD PLASMA TREATMENT IN RAPE*

Božena Šerá<sup>1</sup>, Renata Ryplová<sup>1</sup>, Eugen Hnatiuc<sup>2</sup>, Laura Bicanová<sup>1</sup>, Tereza Landová<sup>1</sup>, Kamila Petrášková<sup>1</sup>, Tamara Rákosníková<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra biologie, Pedagogická fakulta, Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, Jeronýmova 10, CZ 371 15 České Budějovice, Czech Republic, e-mail: sera@nh.cas.cz

<sup>2</sup> Technical University of Iași, Faculty of Electrical Engineering, Iași, Romania; Apollonia University of Iași, 11 Pacurari Street, Iași 6600, Romania

#### *Summary*

Oilseed rape seeds were treated with cold plasma (exposure time: 0 min, 3 min, 5 min, and 10 min). Characteristics of seed germination were observed. Seeds in two sets, in which the significant difference between the time of treatment and the time of germination test, were researched. This part of the research was conducted in the laboratory. The second part of the research was focused on the chlorophyll fluorescence characteristics of the first leaf of the plants (growing in pots in a conditioned box). The data obtained has got informative level. Preliminary results show considerable variability and bring many questions for the further research.

*Key words: germination energy, cold plasma, seed germination, speed of germination, stimulation.*

#### *Souhrn*

Semena brukve řepky olejky byla ošetřena chladným plazmatem (doba expozice: 0 min, 3 min, 5 min, 10 min). Sledovány byly charakteristiky klíčení semen a to u dvou setů semen, u kterých byl výrazný časový rozdíl mezi ošetřením a založením testů klíčivosti. Tato část výzkumu probíhala v laboratoři. Druhý směr výzkumu byl směřován na fluorescenční charakteristiky prvního listu rostlin rostoucích v květináčích v klimaboxu. Získaná data mají informační charakter. Předběžné výsledky vykazují značnou variabilitu a přinášejí mnohé otázky pro další výzkum.

*Klíčová slova: energie klíčení, chladné plasma, klíčivost semen, rychlost klíčení, stimulace.*

## ÚVOD

Ošetření semen chladným plazmatem patří mezi netradiční možnosti stimulace a ozdravení semen před jejich výsevem /1/. Tento nekonvenční způsob ošetření semen zemědělských plodin je v současné době zkoumán mnohými vědeckými týmy v různých částech světa /2-5/.

Tento příspěvek se zabývá testováním účinku chladného plazmatu na klíčivost semen řepky olejky /6/ a na fluorescenční charakteristiky jejího fotosyntetického aparátu. Brukev řepka olejka patří mezi strategické plodiny s širokým uplatněním. Proto je důležité hledat možnosti a postupy vedoucí ke zvyšování produkce a kvality u této komodity.

Z hlediska vzcházivosti a počátečního růstu je nejdůležitější volba správného načasování výsevu. Mezi ošetřením osiva a jeho vlastním výsevem může být různě dlouhá doba. Je tedy dobré zjistit, jakou roli hraje prodleva mezi ošetřením plazmatem a klíčením. S tím je spojena kvalita a funkčnost autotrofních složek rostlinného těla. Náš výzkum byl proto směřován, jak do charakteristik klíčivosti, tak do charakteristik funkčního stavu fotosyntetického aparátu.

## MATERIÁL A METODY

### Ošetření plazmatem

Semena brukve řepky olejky (*Brassica napus* L. subsp. *napus*), byla ošetřena plazmatem při různých časových expozičních (0 min, 3 min, 5 min, 10 min) v počtu 150 kusů na jednu variantu /6/. K modifikaci semen bylo použito chladné atmosférické plazma (vzduch) generované mezi hliníkovými elektrodami /7/.

### Test klíčivosti

Použita byla plastová Petriho miska o průměru 9 cm, 4 filtrační papíry KA0/80, 6 ml destilované vody a 30 semen brukve řepky olejky. Na jedno ošetření (expoziční plazmování) bylo tímto způsobem založeno 5 Petriho misek. Misky byly uloženy do tmy při teplotě cca 20°C. Z počtu vyklíčených semen zjištěných během testu klíčení byly spočteny tyto charakteristiky: klíčivost semen (%), rychlost klíčení (% pro pět dnů) a energie klíčení (%)/8/.

Takto byly založeny dva experimenty klíčení. Jeden probíhal na jaře (semena oplazmovaná půl roku před pokusem) a druhý na podzim (semena oplazmovaná jeden měsíc před pokusem). Během pokusů byl sledován počet klíčících semen.

### Test fluorescence chlorofylu

Pro zjištění funkčního stavu fotosyntetického aparátu byla použita metoda měření fluorescence chlorofylu. U kultivovaných rostlin byl zjišťován fluorescenční parametr Fv/Fm, všeobecně uznávaný jako ukazatel maximální kvantové fotochemické účinnosti fotosystému II. /9/. K měření byl použit přenosný kapesní fluorometr Fluorpen 101 (PSI, Brno, ČR). Koeficient Fv/Fm byl zjišťován u zkoumaných rostlin po 20 minutovém zatmění.

Pro zjišťování fluorescenčních charakteristik byly rostliny pěstovány ze semen po ošetření studeným plazmatem v plně kontrolovaném kultivačním boxu. Byl nastaven kultivační režim 2 h rozednívání /10 h den/2 h stmívání /10h noc s těmito parametry:

teplota 17 – 24 °C / 24 °C / 24 – 17 °C / 17 °C,

relativní vlhkost vzduchu 80 – 65 % / 65 % / 65 – 80 % / 80 %,

ozáření 0 – 286  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  / 286  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  / 286 – 0  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  / 0  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Vzhledem k omezení prostorovými možnostmi kultivačního boxu byly vybrány pouze varianty s dobou plazmování 3 min, 10 min a varianta kontrolní (0 min). Semena byla vyseta do plastových květináčů o rozměrech 11 x 11 x 12 cm, do komerčně připravované zeminy (Garden Forestina, Střelské Hoštice), pH 4,5 až pH 6,5. Do každého květináče bylo vyseto 5 semen v pravidelných vzdálenostech od sebe. Květináče byly po jednotlivých variantách umístěny na plata. Takto bylo připraveno vždy 10 květináčů (2 plata) od každé pokusné varianty. Rostliny byly pravidelně zavlažovány do plat odstátou vodou z vodovodu, 0,5 l na každé plato denně, v posledním týdnu kultivace bylo zavlažováno 1 l vody denně.

### Statistické vyhodnocení

Získaná data byla vyhodnocena po logaritmické transformaci pomocí standardních statistických testů určujících odlišnost variant: dvoucestná ANOVA (pro klíčivost, faktory: čas výsevu, expoziční ošetření) a Tukey test pro mnohonásobná porovnání (pro klíčivost a pro fluorescenci chlorofylu). Všechny testy při  $\alpha < 0,05$ .

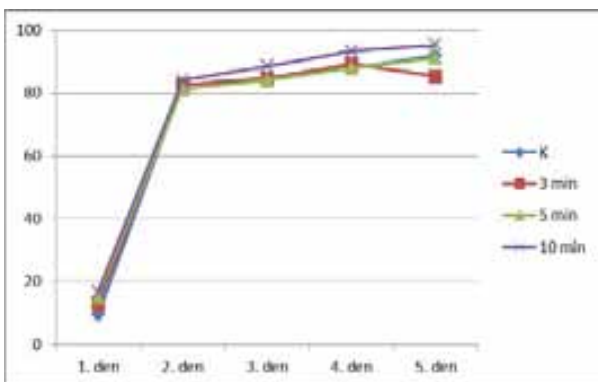
## VÝSLEDKY A DISKUSE

U charakteristik klíčivosti testovaných semen brukve řepky olejky byl zjištěn signifikantní vliv obou faktorů (čas výsevu:  $P < 0,01$ , expoziční ošetření:  $P < 0,03$ ) a také vliv jejich kombinace ( $P < 0,04$ ). Tyto, sice pozitivní výsledky, jsou pravděpodobně zkresleny faktem, že jeden set semen byl vyset na jaře a druhý na podzim. Rozdíly v klíčivosti nebyly způsobeny rozdílnou teplotou ani osvětlením /6/. Podle kontrolních vzorků klíčících semen (0 min) je zjevné, že příští pokusy musí být testovány zároveň. Mezi jednotlivými podskupinami ale nebyl nalezen žádný rozdíl, který by podložil domněnku o důležitosti doby mezi oplazmováním a výsevem. Všechny

zjištěné charakteristiky vykazují značnou variabilitu. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 1 a na Obrázcích 1a a 1b.

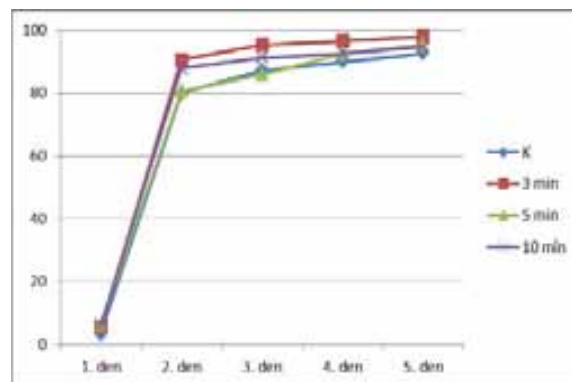
Tab 1: Hodnoty naměřených parametrů klíčivosti u brukve řepky olejky. Různá písmena ve sloupci HSD uvádí signifikantní rozdíly zjištěné v testu Tukey ( $P < 0,05$ ) při porovnávání každý s každým.

Varianta		Klíčivost (%)			Rychlost klíčení (%)		
		Průměr	SD	HSD	Průměr	SD	HSD
Květen	0 min	92,00	3,80	ab	10,35	9,07	ab
	3 min	85,33	8,37	a	16,25	8,02	a
	5 min	91,33	3,80	ab	17,26	6,11	a
	10 min	95,33	2,98	b	17,54	5,81	a
Září	0 min	92,66	2,79	ab	3,57	2,44	b
	3 min	98,00	1,83	b	5,51	5,23	ab
	5 min	95,33	5,05	b	6,47	5,51	ab
	10 min	94,66	2,98	b	6,41	3,18	ab



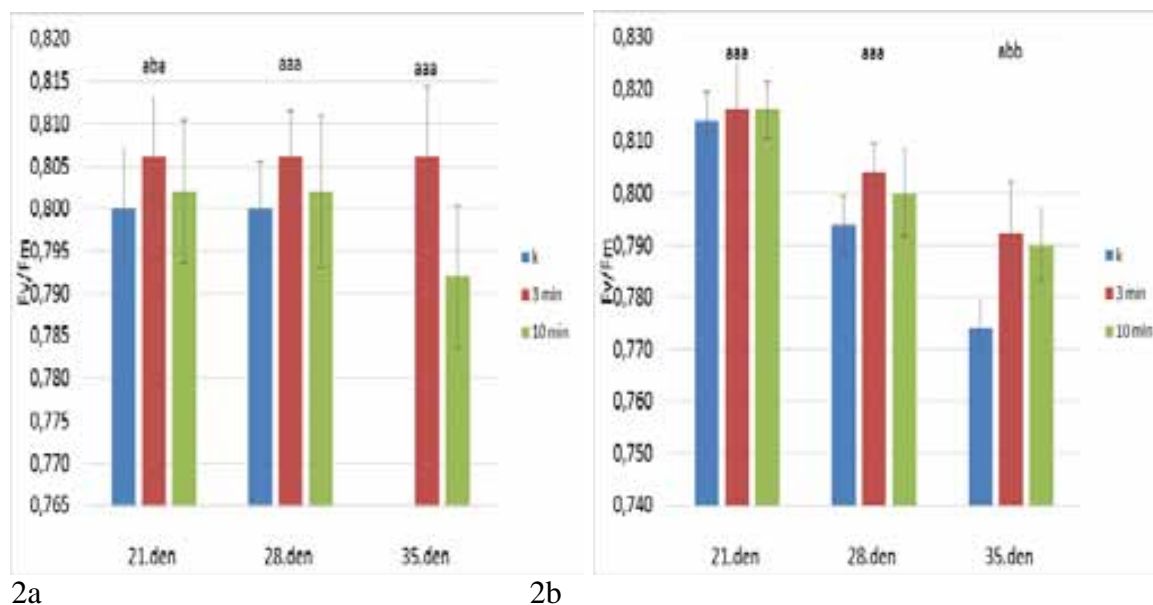
1a.

1b.



Obr 1a, b: Energie klíčení (%) semen brukve řepky olejky během pěti dnů počátečního růstu po ošetření chladným plazmatem. Půlroční prodleva mezi ošetřením a testem klíčivosti (1a, jarní set) a měsíční prodleva mezi ošetřením a testem klíčivosti (1b, podzimní set).

Výsledky měření fluorescence chlorofylu naznačují, že ošetření semen chladným plazmatem může mít vliv na maximální kvantovou fotochemickou účinnost fotosystému II (Fv/Fm) u prvního listu brukve řepky olejky. Tento vliv se však mění v závislosti na době uplynulé mezi oplazmováním a vysetím semen. U rostlin vysetých půl roku po oplazmování semen byl zaznamenán pozitivní vliv na stav fotosystému II pouze do třetího týdne po výsevu a to pouze u varianty 3 min (Obr. 2a). Naopak u rostlin vysetých měsíc po oplazmování semen bylo možné pozorovat pozitivní vliv na stav fotosystému II u prvního listu u obou ovlivněných variant, a to až v pátém týdnu po výsevu (Obr. 2b).



Obr 2a, b: Fluorescenční charakteristiky - hodnoty ukazatele maximální kvantové fotochemické účinnosti fotosystému II ( $F_v/F_m$ ) u prvního listu brukve řepky olejky u rostlin vyšetřých půl roku po oplazmování semen (1a) a měsíc po oplazmování semen (1b). Různá písmena uvádí signifikantní rozdíly zjištěné v testu Tukey ( $P < 0,05$ ) při porovnávání každý s každým.

## LITERATURA

- /1/ Sera, B., Gajdova, I., Cernak, M., Gavril, B., Hnatiuc, E., Kovacik, D., Kriha, V., Slama, J., Sery, M., Spatenka, P.: How various plasma sources may affect seed germination and growth. Proceedings of the International Conference on Optimisation of Electrical and Electronic Equipment, OPTIM, 2012, art.no. 6231880, 1365-1370.
- /2/ Henselova, M., Slovakova, L., Martinka, M., Zahoranova, A.: Growth, anatomy and enzyme activity changes in maize roots induced by treatment of seeds with low-temperature plasma. *Biologia*, 20125, 67(3): 490-497.
- /3/ Jiang, J., He, X., Li, L., Li J, Shao, H., Xu, Q., Ye, R., Dong, Y.: Effect of Cold Plasma Treatment on Seed Germination and Growth of Wheat. *Plasma Science and Technology*, 2014, 16(1): 54-58.
- /4/ Kuchtova, P., Sera, B., Gavril, B., Sery, M., Hnatiuc, E.: Gliding arc plasma modified number of capsules in poppy seed. In: European Biotechnology Congress, Comenius Univ, Bratislava, Slovakia, May 16-18, 2013, Current Opinion in Biotechnology, 2013, 24(1): S133-S133.
- /5/ Mraz, I., Beran, P., Sera, B., Gavril, B., Hnatiuc, E.: Effect of low-temperature plasma treatment on the growth and reproduction rate of some plant pathogenic bacteria. *Journal of Plant Pathology*, 2014, 96(1): 63-67.
- /6/ Landová, T.: Růstové faktory řepky olejky (*Brassica napus* L.) a kukuřice seté (*Zea mays* L.) po ošetření obilek netermálním plazmatem.- MS Bakalářská práce PF JU Č. Budějovice, 2015, 55 p.
- /7/ Gavril, B., Hnatiuc, E., Sera, B., Hruskova, I., Padureanu, S., Hăisan, C.: Possibilities of performing treatments on seeds using cold plasma discharges. In: XVIIth Symposium on Physics of Switching Arc, Brno, University of Technology, 2011, 189-192.
- /8/ Šerá, B.: Klíčivost semen jako běžný test v botanickém pozorování, šlechtění a experimentech. – In. Bláha, L., Šerá, B. (eds), Příspěvky v problematice zemědělského pokusnictví, VÚRV a PF JU, Praha, 2015, 9-17.
- /9/ Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R.: The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochem. Biophys. Acta*, 1989, 990: 87-92.

## Poděkování

Prezentovaná práce vznikla za institucionální podpory Katedry biologie na PF JU v Českých Budějovicích.

**JAK SUCHO OVLIVŇUJE METABOLISMUS ŘEPKY OLEJKY*****THE INFLUENCE OF DROUGHT TO OILSEED RAPE METABOLISM***

Milan Oldřich Urban<sup>1</sup>, Pavel Vítámvás<sup>1</sup>, Jakub Vašek<sup>2</sup>, Miroslav Klíma<sup>1</sup>, Jana Krtková<sup>3</sup>, Ilja Tom. Prášil<sup>1</sup>

<sup>1</sup> VÚRV, vvi, Praha, ČR; dehydrins@gmail.com; olinek.vcelar@vurv.cz

<sup>2</sup> ČZU, Praha, ČR

<sup>3</sup> University of Washington, Seattle, USA

**Summary**

A response to drought treatment (28 days) has been studied in leaves of winter oilseed rapes (cultivar Californium). The photosynthetic, biochemical and proteomic parameters were measured. Out of the all differentially abundant protein spots just 362 spots were assessed by 2D-DIGE as quantitatively changed at last  $\pm 2$ -fold. The identified protein spots (100) with an increased relative abundance upon drought include proteins involved in amino acid, nitrogen and sulphide metabolism/protein metabolism; ATP interconversion; carbohydrate/energy metabolism; photosynthesis; redox homeostasis, ROS and signalling; stress and defence related; transcription, translation, RNA processing.

*Key words: 2D-DIGE analysis, progressive drought stress, canola, acclimation, development response*

**Souhrn**

V této studii jsou popsány fotosyntetické, biochemické a proteomické odpovědi na progresivní stres suchem (28 dnů) plastické odrůdy ozimé řepky olejký (Californium). Z diferenčně (alespoň 2x více oproti kontrole) akumulovaných 362 proteinových spotů pomocí 2D-DIGE, bylo identifikováno 100 proteinových spotů, které patří do následujících funkčních kategorií: metabolismus aminokyselin, dusíku a síry, přeměny ATP, karbohydrátový/energetický metabolismus, fotosyntéza, ROS/redox metabolismus, stres a obrana, změny na úrovni DNA/RNA (translace/transkripce).

*Klíčová slova: 2D-DIGE, progresivní sucho, řepka olejký, aklimace, vývojová odpověď*

*Zkratky: 2D-DIGE, dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza; F, odrůda Californium; Ci/Ca, poměr koncentrace CO<sub>2</sub> uvnitř/mimo list; dw GWC, obsah vody vzhledem k sušině substrátu; FTSW, frakce transpirabilní vody; GS, stomatální vodivost; E, transpirace; ET, evapotranspirační změny vody; OP, osmotický potenciál; PCA, principal component analysis; Pn, asimilace CO<sub>2</sub>; PRO, prolin; RWC, relativní obsah vody.*

**ÚVOD**

Světová produkce plodin by se měla do roku 2050 zdvojnásobit, aby pomohla uspokojit poptávku rostoucí světové populace. Tohoto cíle snad bude možné dosáhnout růstem meziročních výnosů o 2,4 % (aktuálně 1,3 %) /1-3/. Logickým předpokladem zvýšení fitness a výnosů je kombinace různých přístupů – hlubší a částečně mechanistické porozumění fyziologii rostlin, “-omiky”, mapování QTL, konstruktivní fenotypování odrůd založené na znalosti a predikci prostředí a porozumění podstaty plasticity (rychlosti a hloubky adaptace) těch tolerantních /4/. Adaptaci můžeme sledovat např. na fotosyntetické úrovni, lepší ovšem je, pokud daná data vsadíme do kontextu biochemických parametrů a akumulace proteinů (2D-DIGE), protože odpovědi na stres jsou tzv. “dose-responsive”, čili jsou součástí citlivých reakcí a sledu vyvážených odpovědí např. díky retrográdní (směr organela→jádro) signalizaci /5-7/ skrze

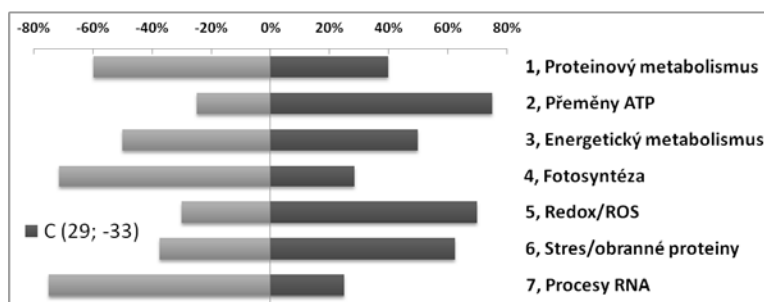
produkcí ROS, modulace excitačního signálu reakčních center, metabolismu cukrů a specifických transkripčních faktorů apod. Tyto komplexní reakce mohou totiž řídit morfologické a vývojové změny rostliny vystavené stresu /5/. Regulace těchto interakcí rostliny s okolím (např. sink-source vztahy) *in planta* se zdají být konzervované i mezidruhově (např. mezi plevelem *Arabidopsis* a řepkou olejkou) /8/, což by mohlo být využito k přenosu poznatků z modelové rostliny na rostlinu užitkovou (řepku). Největší rozšíření mají v současnosti odrůdy řepky, které nejsou „super“ výnosné, ale plastické, vhodné do všech oblastí pěstování /15/. Cílem této studie bylo zmapovat reakci plastické francouzské odrůdy Californium (F; Monsanto SAS) na fyziologické, biochemické a proteomické úrovni při graduálním nárůstu nedostatku vody omezením závlivky.

## MATERIÁL A METODY

Odrůda řepky olejky Californium byla v kontrolovaných podmínkách (21/18 °C den/noc, 12 h fotoperioda intenzity  $\sim 300 \mu\text{mol.m}^{-2}$ , BBCH 30) po jarovizaci vystavena stresu suchem omezením závlivky po dobu 28 dnů. Fotosyntetická data byla měřena na nejmladším plně vyvinutém listu pomocí TPS-1 (PPSystems). Dále byly v hluboce zmražených listech stanoveny (bližší informace u autorů): prolin, fotosyntetické pigmenty a, b; karotenoidy, OP a RWC. Evapotranspirační změny (ET) vychází z denních změn váhy celého systému (květník, voda, substrát, rostlina) a vyjadřují tak transpirovanou i vypařenou vodu. FTSW byl stanoven jako podíl aktuálního množství vody k obsahu vody na konci experimentu, kdy E byla téměř nulová /9/. FTSW-E je oproti FTSW množství vody v substrátu, kdy E = 10 % kontroly. NTR je normalizovaná transpirace ke kontrolám pro dané datum (poměr růstové transpirace a průměrné v začátku experimentu) /10, 11/. Extrakce proteinů proběhla dle /12/. Proteiny rozdělené SDS-PAGE byly barveny fluorescenčními barvami CyDye/<sup>13</sup>. Identifikace proteinů byla provedena pomocí MALDI-TOF/TOF využitím MASCOT (v2.2) proti databázi NCBI (Viridiplantae). Charakterizace proteinů a rozdělení do funkčních skupin byly provedeny pomocí AgBase GORetriever /14/, GOModeler apod. Výsledky byly statisticky zpracovány pomocí Statistica v 10 (metody PCA, ANOVA apod.) Na gelech bylo nalezeno cca 1200 proteinových spotů, z nich 362 vyhodnotil program PDQuest jako kvantitativně zajímavé. Po manuálním vyhodnocení všech těchto spotů, 134 bylo určeno pro identifikaci, z nichž 100 bylo úspěšně identifikováno.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

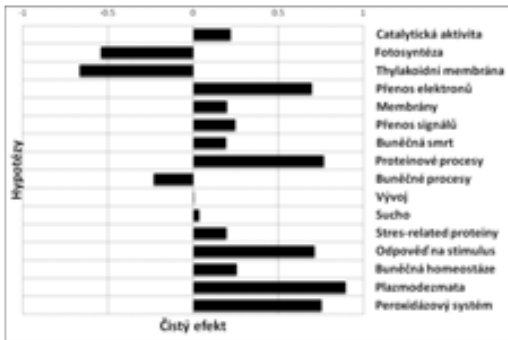
Odrůda Californium (F) je zařazována mezi plastické odrůdy /15/, jde o polo-pozdní odrůdu, běžně v Evropě rozšířenou, střední velikosti, rychlého podzimního vývoje a střední tolerance k poléhání, se silným kořenovým systémem a vysokou mrazuvzdorností. Všechny měřené parametry byly signifikantně ovlivněny (nezobrazeno) po 28 dnech. Oproti kontrolám byly ve stresované variantě signifikantně zvýšeny: Ci/Ca, OP a PRO; naopak všechny fotosyntetické parametry, dw GWC, ET, obsahy chlorofylů, karotenoidů apod. byly podle očekávání sníženy. Odrůda F v kontrolních podmínkách narůstá velmi rychle, má velkou listovou plochu, vysoké GS,



Obr. 1: Rozložení akumulace (+ zvýšené; - snižené ve stresu) proteinů niium

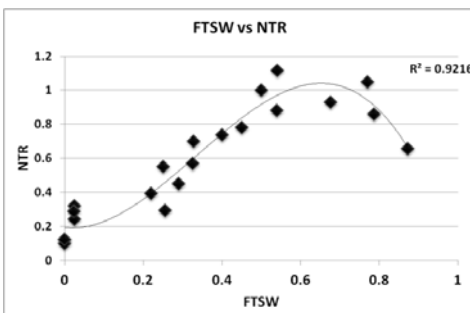
Urban osobní sdělení) a odrůdu F tak můžeme řadit mezi tzv. „water-savers“, čili odrůdy, které vodou šetří pouze, pokud jí mají nedostatek. Pokles GS a E u této odrůdy nastupuje velmi rychle a

E i Pn a tedy efektivně využívá zásoby půdní vody. Obrázky 3 a 4 (vytvořené rozdílnými přístupy, vztahují se pouze pro stresované rostliny) naopak ukazují, že ve stresu odrůda F transpiruje málo. Je to způsobeno obecně nižší GS a E ve vzrůstajícím nedostatku vody (při porovnání s ostatními odrůdami,



Obr. 2: GOModeler - čistý efekt proteinové akumulace odrůdy Californium po působení stresu sucha

množství vody. Čili zdali transpirují málo i při dostatku nebo naopak nešetří vodou ani při nedostatku vody v půdě. Odrůda F tedy šetří vodou, když je „rozumně“ šetřit, a „plýtvá“, když je vody dostatek. Tento fakt u řepky olejky není možné jednoduše zjistit extrapolací dat z kontrolních podmínek, jak je tomu např. u rostlin typu C4 (čirok, proso), nebo podzemnice olejné /10,11/. V klimatických podmínkách České republiky se sucho projevuje nižší hladinou spodní vody po zimních obdobích bez sněhových srážek a prodloužením bezsrážkových období. Podle

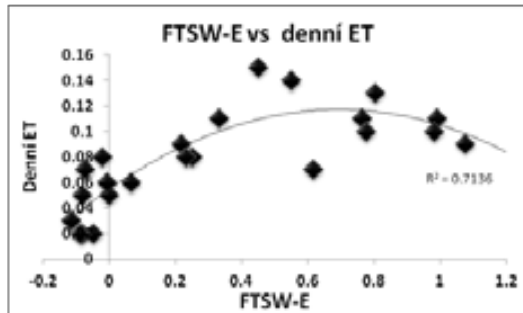


Obr. 3: Množství vody v substrátu vs transpirace

zkušeností s periodami a hloubkou sucha v ČR můžeme říci, že „water-wasters“ odrůdy (např. Viking - plýtvá i při nedostatku vody; Urban, osobní sdělení) obecně mohou být pro naše agronomické podmínky vhodnější, protože dlouhodobé sucho je stále spíše výjimkou. U těchto odrůd předpokládáme nižší výnosovou depresi i díky rychlejšímu vývoji rostlin (kořenů) v podmínkách sucha. Na obr. 1 vidíme akumulaci proteinů (zvýšená akumulace ve stresu vpravo, snížená ve stresu vlevo – záporná čísla; celkově zvýšených bylo u F 29 proteinů a sníženo 33). Proteiny jsou rozděleny do funkčních kategorií. Z obr. 1 je patrné, že poměrově více byly u F ve stresu akumulovány proteinové spoty z 2., 3., 5. a 6. kategorie. Funkční kategorie (viz. obr. 1) identifikovaných proteinů u řepky olejky zahrnovaly: 1, Metabolismus proteinů; 2, Přeměny ATP; 3, Energetický metabolismus; 4, Fotosyntéza; 5, ROS a redox homeostáze; 6, Stresové proteiny; 7, RNA/DNA (transkripce, translace apod.). Tyto funkční skupiny můžeme tudíž považovat za nejvíce ovlivněné dlouhodobým suchem u řepky olejky. Z obrázku tzv. „čistých efektů“ (obr. 2; generováno v GO Modeler) můžeme vyčíst, jak se proteiny v F podílí na různých hypotézách (vypsány vpravo). Ze skupiny proteinů program pomocí GO anotací vybírá jen ty, u kterých byl prokázán vztah k dané (autory vybrané) hypotéze. Vynásobí potom kvalitativní (-1;0;1) a kvantitativní hodnotu daného proteinu (akumulace). Je ovšem nutno říci, že většina proteinů participuje ve více GO (proto jsou výsledky z obr. 1 a 2 jiné). Záporná čísla (na obr. vlevo) se objevují v případě, že konečný výsledek (čistý efekt) akumulace proteinů pro danou hypotézu je snížen vůči kontrole (a naopak pro kladná čísla). V obrázku vidíme, že akumulace proteinů ovlivňujících fotosyntézu, procesy na thylakoidní membráně a proteiny obecně spojené s buněčnými procesy jsou ve stresu snižované a naopak proteiny podílející se např. na stresové odpovědi, buněčné homeostázi, peroxidázového systému jsou ve stresu zvýšené. V GO anotacích je obecně málo proteinů, které mají prokázanou souvislost k suchu, proto je tato hodnota velmi nízká. Proteiny vztahující se k hypotéze „vývoj“ jsou také málo ovlivněny pravděpodobně proto, že vývojové (development) změny v suchu nebyly odlišné od kontrolních rostlin. Z obr. 2 je patrné, že většina proteinů měla ve stresu silnější (kladný) vliv na vybrané hypotézy. Obr. 3 vyjadřuje vztah normalizované transpirace (NTR, normalizace ke

F je tedy odrůdou senzitivní k nastupujícímu suchu, protože na množství vody v substrátu reaguje citlivě. Tento mechanismus tolerance (tzv. avoidance) je zvláště vhodný pro oblasti s každoročním a déletrvajícím či hlubším suchem (např. jih Francie, lehké půdy jižní Moravy), neboť rostliny sice rostou pomalu, ale oproti jiným růst nepřestávají (fotosyntetizují, akumulují sušinu apod.). Odrůdy typu „water-wasters“ (plýtvající) sice mohou v podmínkách počínajícího stresu suchem narůst rychleji, odpařená půdní voda jim ale bude chybět v pozdních fázích vývoje. Schéma adaptace na sucho (tzv. „wasters“ vs „savers“) ovšem obsahuje i další rozměr, a to, jestli se odrůdy takto chovají bez ohledu na aktuální

zkušeností s periodami a hloubkou sucha v ČR můžeme říci, že „water-wasters“ odrůdy (např. Viking - plýtvá i při nedostatku vody; Urban, osobní sdělení) obecně mohou být pro naše agronomické podmínky vhodnější, protože dlouhodobé sucho je stále spíše výjimkou. U těchto odrůd předpokládáme nižší výnosovou depresi i díky rychlejšímu vývoji rostlin (kořenů) v podmínkách sucha. Na obr. 1 vidíme akumulaci proteinů (zvýšená akumulace ve stresu vpravo, snížená ve stresu vlevo – záporná čísla; celkově zvýšených bylo u F 29 proteinů a sníženo 33). Proteiny jsou rozděleny do funkčních kategorií. Z obr. 1 je patrné, že poměrově více byly u F ve stresu akumulovány proteinové spoty z 2., 3., 5. a 6. kategorie. Funkční kategorie (viz. obr. 1) identifikovaných proteinů u řepky olejky zahrnovaly: 1, Metabolismus proteinů; 2, Přeměny ATP; 3, Energetický metabolismus; 4, Fotosyntéza; 5, ROS a redox homeostáze; 6, Stresové proteiny; 7, RNA/DNA (transkripce, translace apod.). Tyto funkční skupiny můžeme tudíž považovat za nejvíce ovlivněné dlouhodobým suchem u řepky olejky. Z obrázku tzv. „čistých efektů“ (obr. 2; generováno v GO Modeler) můžeme vyčíst, jak se proteiny v F podílí na různých hypotézách (vypsány vpravo). Ze skupiny proteinů program pomocí GO anotací vybírá jen ty, u kterých byl prokázán vztah k dané (autory vybrané) hypotéze. Vynásobí potom kvalitativní (-1;0;1) a kvantitativní hodnotu daného proteinu (akumulace). Je ovšem nutno říci, že většina proteinů participuje ve více GO (proto jsou výsledky z obr. 1 a 2 jiné). Záporná čísla (na obr. vlevo) se objevují v případě, že konečný výsledek (čistý efekt) akumulace proteinů pro danou hypotézu je snížen vůči kontrole (a naopak pro kladná čísla). V obrázku vidíme, že akumulace proteinů ovlivňujících fotosyntézu, procesy na thylakoidní membráně a proteiny obecně spojené s buněčnými procesy jsou ve stresu snižované a naopak proteiny podílející se např. na stresové odpovědi, buněčné homeostázi, peroxidázového systému jsou ve stresu zvýšené. V GO anotacích je obecně málo proteinů, které mají prokázanou souvislost k suchu, proto je tato hodnota velmi nízká. Proteiny vztahující se k hypotéze „vývoj“ jsou také málo ovlivněny pravděpodobně proto, že vývojové (development) změny v suchu nebyly odlišné od kontrolních rostlin. Z obr. 2 je patrné, že většina proteinů měla ve stresu silnější (kladný) vliv na vybrané hypotézy. Obr. 3 vyjadřuje vztah normalizované transpirace (NTR, normalizace ke



Obr. 3: Denní váhové změny vs množství vody v substrátu

kontrolním rostlinám a k vývojovým změnám v listové ploše) k frakci dostupné vody (FTSW). Průběh křivky (polynom) je charakteristickým ukazatelem vztahu těchto dvou proměnných <sup>9,10</sup>, a ukazuje pokles transpirace k aktuálnímu množství vody v substrátu. Odrůda F snižuje rapidně E při obsahu vody cca 50% oproti kontrole. Obr. 4 je vyjádřením podobného vztahu: denní evapotranspirace (změny váhy systému) k frakci dostupné vody, kdy E = 10% kontrolních rostlin. Křivka je (patrně hlavně při porovnávání křivek s jinými odrůdami; nezobrazeno; ústní sdělení Urban)

plochá a naznačuje, že F je odrůda šetřící vodou a plasticky (komplexně a vratně) se připravující na období sucha. Obr. 3 a 4 jsou vykresleny pouze pro stresované rostliny. Všechny měřené parametry byly signifikantně ovlivněny po 28 dnech sucha. Oproti kontrolám byly ve stresované variantě signifikantně zvýšeny: Ci/Ca, OP a PRO. Proteinové spoty byly rozděleny do 7 funkčních skupin, a je můžeme považovat za nejvíce ovlivněné dlouhodobým suchem. Podle zjištěných reakcí na fotosyntetické, biochemické a proteomické úrovni odhadujeme, že F se více hodí do oblastí, kde se dlouhodobější sucho nestřídá s vysokou teplotou („water-wasters“ při dostatku vody, „savers“ při nedostatku), protože tato odrůda efektivněji hospodář s půdní zásobou vody, ale nízká transpirace může vést k přehřívání rostlin. Výhledově je nutné ověřit, zdali se tyto odrůdy řídí stejnými schématy i v době kvetení či při tvorbě a dozrávání semen.

## LITERATURA

- /1/ Tilman, D.; Balzer, C.; Hill, J.; Befort, B. L., Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, 108, (50), 20260-20264.
- /2/ Ray, D. K.; Ramankutty, N.; Mueller, N. D.; West, P. C.; Foley, J. A., Recent patterns of crop yield growth and stagnation. *Nature Communications* **2012**, 3.
- /3/ Ray, D. K.; Mueller, N. D.; West, P. C.; Foley, J. A., Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *Plos One* **2013**, 8, (6).
- /4/ Mittler, R.; Blumwald, E., Genetic Engineering for Modern Agriculture: Challenges and Perspectives. *Annual Review of Plant Biology*, Vol 61 **2010**, 61, 443-462.
- /5/ Huener, N. P. A.; Bode, R.; Dahal, K.; Hollis, L.; Rosso, D.; Krol, M.; Ivanov, A. G., Chloroplast redox imbalance governs phenotypic plasticity: the "grand design of photosynthesis" revisited. *Frontiers in Plant Science* **2012**, 3.
- /6/ Biswal, B.; Joshi, P. N.; Raval, M. K.; Biswal, U. C., Photosynthesis, a global sensor of environmental stress in green plants: stress signalling and adaptation. *Current Science* **2011**, 101, (1), 47-56.
- /7/ Fernandez, A. P.; Strand, A., Retrograde signaling and plant stress: plastid signals initiate cellular stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **2008**, 11, (5), 509-513.
- /8/ Orsel, M.; Moison, M.; Clouet, V.; Thomas, J.; Leprince, F.; Canoy, A.-S.; Just, J.; Chalhou, B.; Masclaux-Daubresse, C., Sixteen cytosolic glutamine synthetase genes identified in the *Brassica napus* L. genome are differentially regulated depending on nitrogen regimes and leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **2014**, 65, (14), 3927-3947.
- /9/ Sun, Y.; Liu, F.; Bendevis, M.; Shabala, S.; Jacobsen, S. E., Sensitivity of Two Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Varieties to Progressive Drought Stress. *Journal of Agronomy and Crop Science* **2014**, 200, (1), 12-23.
- /10/ Kholová, J.; Hash, C. T.; Kakera, A.; Kocova, M.; Vadez, V., Constitutive water-conserving mechanisms are correlated with the terminal drought tolerance of pearl millet *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. *Journal of Experimental Botany* **2010**, 61, (2), 369-377.
- /11/ Kholová, J.; Hash, C. T.; Kumar, P. L.; Yadav, R. S.; Kocova, M.; Vadez, V., Terminal drought-tolerant pearl millet *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. have high leaf ABA and limit transpiration at high vapour pressure deficit. *Journal of Experimental Botany* **2010**, 61, (5), 1431-1440.
- /12/ Wang, W.; Scali, M.; Vignani, R.; Spadafora, A.; Sensi, E.; Mazzuca, S.; Cresti, M., Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis* **2003**, 24, (14), 2369-2375.



- /13/ Vítámvás, P.; Prasil, I. T.; Kosova, K.; Planchon, S.; Renaut, J., Analysis of proteome and frost tolerance in chromosome 5A and 5B reciprocal substitution lines between two winter wheats during long-term cold acclimation. *Proteomics* **2012**, 12, (1), 68-85.
- /14/ McCarthy, F. M.; Wang, N.; Magee, G. B.; Nanduri, B.; Lawrence, M. L.; Camon, E. B.; Barrell, D. G.; Hill, D. P.; Dolan, M. E.; Williams, W. P.; Luthe, D. S.; Bridges, S. M.; Burgess, S. C., AgBase: a functional genomics resource for agriculture. *Bmc Genomics* **2006**, 7.
- /15/ Bečka, D.; Šimka, J.; Cihlář, P.; et al. Performance Comparison of Winter Rapeseed Varieties - Small Plot Trials in Cerveny Ujezd 2011/12, Conference on Prosperous Oil Crops Location: Czech Univ Life Sci Prague, Větrný Jeníkov, PROSPEROUS OIL CROPS **2012**, 25-37 .

### **Poděkování**

Práce byla podpořena projekty MZe QH82285, QI111A075 a QJ1510172.

## Sponzoři



Dodavatel přístrojů pro pedologii, hydrogeologii,  
meteorologii, výzkum rostlin a diagnostiku  
životního prostředí



**Dodáváme přístroje a certifikovaný spotřební materiál  
od světově uznávaných výrobců pro:**

- odběr porušených i neporušených vzorků půd
- odběr povrchových i podzemních vod
- odběr půdní vlhkosti a půdního vzduchu
- odběr sedimentů
- odběr odpadů a zvrstvených tekutin v nádržích a sudech
- odběr stavebních materiálů
- odběr tekutých, pastovitých a pevných odpadů
- měření vlhkosti půdy a sacího tlaku
- měření infiltrace a hydraulické vodivosti půdy
- měření teplot vzduchu, půdy a vody
- stanovení retenčních čar (pF křivek)
- stanovení čar zrnitosti
- stanovení vzdušné propustnosti půdy
- měření objemu (např. zm)
- instalaci monitorovacích vrtů
- výstroj monitorovacích vrtů (filtry, závitové pažnice PE, bentonit, hadice)
- měření hladin vody a průtoků
- měření pH, EC, T, rozpuštěného kyslíku a redox potenciálu
- sledování meteorologických jevů (meteostanice, čidla, datalogery)
- dálkový přenos dat
- výzkum rostlin (CO<sub>2</sub>, fotosyntéza, listová plocha atd.)

**dále dodáváme:**

- půdní penetrometry
- čerpadla pro odběr vzorků vody

**Ekotechnika spol. s r.o.**

Mokropeská 1832, 252 28 Černošice u Prahy, tel.: +420 251 640 511, fax: +420 251 640 512  
E-mail: info@ekotechnika.cz, www.ekotechnika.cz

Zástoupení pro SR

Ing. Viliam Bárek, CSc, tel.: +421 904 547 290, e-mail: vbarek@ekotechnika.cz

Název: Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2015

Editor: František Hnilička

Vydavatel: Česká zemědělská univerzita v Praze

Ústav ekológie lesa Slovenskej akadémie vied

Odborní recenzenti: doc. RNDr. Jan Novák, DrSc.

Mgr. Jana Šlégrová

Tisk: Power Print

Náklad: 120 ks

Počet stran: 293

Vydání: první

Rok vydání: 2015

ISBN: 978-80-813-2567-8 (Česká zemědělská univerzita v Praze)

ISBN: 978-80-89408-23-8 (Ústav ekológie lesa Slovenskej akadémie vied)

Texty příspěvků neprošly jazykovou úpravou