ACTA FACULTATIS FORESTALIS XLX
ZVOLEN – SLOVAKIA 2008

CITLIVOSŤ REAKCIE BIOMARKÉROV STRESU ZO SUCHA U SMREKA OBYČANÉHO

Daniel K U R J A K – Ľubica D I T M A R O V Á – Jaroslav K M E Ť

Kurjak, D., Ditmarová, Ľ., Kmeť, J.: Citlivosť reakcie biomarkérov stresu zo sucha u smreka obyčaného. Acta Facultatis Forestalis Zvolen, **XLX**, 2008, č. 1, s. 33–45.

V súčasnosti sa z dôvodu predpokladaných zmien klímy a zrážkových pomerov čoraz nástojčivejšie vynára otázka reakcie smrekových porastov na znížené množstvo disponibilnej vody. Evidujeme narastajúce škody spôsobované suchom u smrekových porastov, ktoré sú relatívne náročné na dostatočnú zásobu vody. Problém je o to pálčivejší, že nepôvodné smrekové monokultúry zaberajú významnú výmeru našich lesov a citlivo reagujú na viaceré pôsobiace faktory, ktorých synergické pôsobenie je príčinou odumierania smrekových porastov. Bližšie poznanie úlohy jednotlivých faktorov môže prispieť k pochopeniu mechanizmu rozpadu porastov a k zlepšeniu momentálnej situácie.

Predkladaná práca sumarizuje výsledky meraní na mladých jedincoch smreka, ktoré rástli v semikontrolovaných podmienkach. Štvorročné sadenice smreka boli zalievané v troch režimoch tak, aby kontrolné jedince neboli negatívne ovplyvnené deficitom vody, u ďalších jedincov bol simulovaný mierny a silný stres zo sucha. V týchto podmienkach boli až po odumretie silno stresovaných jedincov pozorované nasledujúce parametre: vodný potenciál, fluorescencia chlorofylu *a*, čistá fotosyntéza, prieduchová vodivosť, koncentrácia pigmentov v asimilačných orgánoch a obsah aminokyseliny prolín. Uvedené parametre sú vo všeobecnosti považované za markéry stresu, aj keď reakcie rastliny na istý stresor sú skôr nešpecifické. Hodnotíme dynamiku reakcie uvedených parametrov a ich vhodnosť pre včasnú diagnostikáciu pôsobenia sucha.

Kľúčové slová: *Picea abies*, sucho, odumieranie lesov, fotosyntéza, pigmenty, fluorescencia chlorofylu *a*, prolín, vodný potenciál

ÚVOD A PROBLEMATIKA

V súčasnosti mnoho odborníkov venuje pozornosť stresovej fyziológii, mechanizmom pôsobenia stresorov na vznik funkčných porúch a adaptačným mechanizmom rastlín. Táto téma sa stáva mimoriadne dôležitou aj v súvislosti s prognózovanými dopadmi klimatických zmien na ekosystémy.

Synergické pôsobenie extrémnych klimatických výkyvov, dlhodobej acidifikácie pôdy a antropogénnych vplyvov, predovšetkým imisnej záťaže, má za následok postupné chradnutie lesných porastov na takmer celom území strednej Európy (Cudlín, Tříska 1997). Chradnutie smrečín je vážnym problémom aj na Slovensku, keďže nepôvodné

smrekové monokultúry zaberajú významnú výmeru našich lesov a sú vo všeobecnosti považované za málo stabilné.

Z prác autorov, ktorí uvádzajú ekologické nároky smreka (napr. MRÁČEK, PAŘEZ 1986, SCHMIDT-VOGT 1987, PAGAN, RANDUŠKA 1987, KULLA 2002) vyplýva, že smrek je drevinou náročnou na vodu a aj na našom území spôsobuje v posledných rokoch sucho významné poškodenie. Voda, na rozdiel napr. od minerálnych živín, má veľmi rýchly kolobeh v ekosystémoch a jej zásoba v pôde stačí iba na pomerne krátku dobu. Navyše dopĺňanie zásob vody zrážkami býva obvykle nepravidelné, náhodné a nie sú teda vylúčené ani dlhšie periódy sucha (PROCHÁZKA 1998). Nedostatok zrážok a extrémne teploty sa prejavujú najmä vo zvýšených stratách na výsadbách, kultúrach, ale aj v dospelých porastoch, kde sa sucho okrem odumretia drevín prejavuje tiež predčasným žltnutím asimilačných orgánov (KONÒPKA *et al*. 2002). Deficit vody objavujúci sa v poslednom období na väčšej časti Slovenska môže mať negatívny vplyv na vlahové zabezpečenie, zdravotný stav a produkciu aj v spoločenstvách vyšších vegetačných stupňov s prevahou smreka (6., 7., 8. lesného vegetačného stupňa). Vodný režim pôd v horskom pásme, špeciálne ich nízka vodná kapacita sa považuje za veľmi dôležitý faktor v čase klimatických extrémov (PRIWITZER *et al*. 2003).

V európskych podmienkach je pre smrek všeobecne akceptovaný kumulatívny zrážkový limit 300 mm za obdobie máj až august (HANISCH, KILZ 1990). Podľa ŠKVARENINU *et al*. (1995) bol v priebehu rokov 1984–1993 v horských polohách Slovenska tento limit dosiahnutý, výnimkou bolo niekoľko lokalít počas extrémne suchého roku 1992. Oproti mesačným normálom však dochádzalo k značným odchýlkam a predovšetkým mesiac júl bol po celé sledované obdobie výrazne podnormálny. Výsledky TUŽINSKÉHO (1999) ukázali, že v zrážkovo podnormálnych obdobiach sa vyskytuje pokles vlhkosti pôdy pod bod zníženej dostupnosti vody aj v smrekových lesných porastoch v oblasti montánneho stupňa na severe Slovenska (Orava, Kysuce).

MINĎÁŠ *et al*. (2000) analyzovali možné dopady prognózovaných klimatických zmien na súčasný a budúci výskyt smreka v oblasti Západných Karpát. Predpokladajú do budúcnosti výrazný pokles potenciálu pre výskyt smreka obyčajného a jeho bezpečné pestovanie na území Slovenska a to najmä v nižších a stredných polohách.

MÄKINEN (2001) pozoroval, že nízke zrážky môžu mať súvis s poškodzovaním a odumieraním smreka na stanovištiach v južnom Fínsku, ktoré sú pre sucho náchylné. Často tiež dochádza k poškodeniu najmä stálezelených rastlín suchom aj napriek veľkej zásobe vody v pôde a to z dôvodu jej fyziologickej nedostupnosti.

Navyše, v súčasnosti sú hospodársky závažnými aj sekundárne škodlivé činitele v dôsledku toho, že pôsobia na fyziologicky oslabené stromy (DITMAROVÁ *et al*. 2005). Napr. HOLUŠA, LIŠKA (2002) predpokladajú, že hlavným predispozičným faktorom v Sliezsku je napadnutie podpňovkou a spúšťacím aj mortalitným faktorom je vodný deficit. Ako uvádza PŘÍHODA (1959), zhubné pôsobenie kombinácie podpňovky a sucha je známe

zo starších smrečín, napr. z východného Slovenska po roku 1947. Podobný prípad je zaznamenaný tiež z roku 1911 vo Vestfálsku. Ďalším aspektom pôsobenia sucha je, že výrazne ovplyvňuje predispozíciu smreka na nálet podkôrneho hmyzu. ESCH, MENGEL (1998 a, b) predpokladajú, že kyslé hmly degradujú epikutikulárne vosky ihlíc a môžu zvyšovať transpiračné straty stromov napriek tomu, že prieduchy sú zatvorené. Taktiež môže byť negatívne ovplyvnená mykorízna symbióza a je zvýšené riziko vzniku požiarov.

Ako uvádzajú BRESTIČ, OLŠOVSKÁ (2001), predpokladá sa, že počas sucha sa stupeň dehydratácie stáva jediným limitujúcim faktorom. Zmeny priemerných zrážok a teplôt spôsobené predpokladanými klimatickými zmenami však nemusia byť v budúcnosti faktormi s rozhodujúcim vplyvom na rast a zdravotný stav drevín. Vplyv pravdepodobných zmien amplitúd a frekvencií opakovania sa extrémnych vplyvov môže byť výrazne väčší (MÄKINEN *et al.* 2001).

Zachovanie kritického vodného potenciálu v liste sa javí ako najdôležitejší znak adaptácie a rezistencie voči suchu (LÜTGE, SCARANO 2003). Sucho môže vplývať na rast mnohými spôsobmi a to buď priamo cez pokles vodného potenciálu v bunkách kambia s následným zamedzením rastu buniek (DREYER 1997), alebo bežnejšie, rastliny redukujú svoju metabolickú aktivitu a stomatálnu vodivosť. To spôsobuje pokles fotosyntézy a znížená fixácia uhlíka môže viesť k zmenšeniu rýchlosti rastu (ESCÓS 2000).

Ako uvádzajú PROCHÁZKA *et al*. (1998), z fyziologického hľadiska sú vo všeobecnosti najcitlivejšie na pokles vodného potenciálu rast a pochody tvorby bunkovej steny a tiež syntéza proteínov. Pri výraznejšom poklese dostupnej vody dochádza u mnohých druhov k zvýšenej tvorbe aminokyseliny prolín. Vo všeobecnosti citlivo (od určitej prahovej hodnoty) reagujú prieduchy (čím je limitovaný príjem CO_2), menej citlivo napr. fotochemické procesy fotosyntézy. Fotosyntetické pigmenty majú taktiež veľký význam pre fotosyntézu a ich koncentrácia v asimilačných orgánoch sa často využíva ako markér stresu. Ako uvádzajú BRESTIČ, OLŠOVSKÁ (2001), je dôležité venovať pozornosť zákonitostiam vzniku a vývinu tých stresových reakcií, ktoré dominujú v prvých fázach ich pôsobenia.

Dynamiku uvedených parametrov sme pozorovali na mladých sadeniciach smreka s cieľom odsledovať priebeh a citlivosť jednotlivých reakcií na simulované sucho a tiež posúdiť ich vhodnosť pri včasnej a spoľahlivej identifikácii pôsobenia vodného stresu.

MATERIÁL A METÓDY

Rastlinný materiál a simulácia sucha

Všetky analýzy boli realizované na mladých jedincoch smreka, ktoré boli zalievané v troch režimoch za účelom dosiahnutia optimálnych vlhkostných podmienok, mierneho stresu a silného stresu zo sucha. Tridsať sadeníc (desať pre každý variant) bolo

využitých na nedeštruktívne merania a 15 jedincov (5 × 3) na odbery nevyhnutné pre niektoré analýzy. Merania aj odbery boli uskutočnené na letorastoch 4-ročných jedincov počas 48 dní pokusu.

Ako základ pre kvantifikáciu zálievky nám poslúžilo stanovenie maximálnej kapilárnej kapacity (MCC), ktorá bola stanovená podľa KLIKU *et al.* (1954). Optimálne množstvo vody v pôde pre smrek sa pohybuje medzi 60–80 % MCC (TUŽINSKÝ 2002, KUTÍLEK 1994).

Kapilárne nasýtená zemina sa zváži a vysuší sa v sušičke na konštantnú hmotnosť. Jednoduchým rozdielom hmotnosti pôdy pred a po vysušení zistíme hmotnosť vody obsiahnutej v plne nasýtenej pôde na objem valčeka. Prepočtom na objem pôdy obsiahnutej v črepníkoch sme stanovili hmotnosť črepníka pre rôzne hladiny kapilárneho nasýtenia (tab. 1). Táto hmotnosť bola v priebehu celého pokusu pravidelne sledovaná a udržiavaná tak, že po priblížení sa spodnej hranici bola doliata voda až k hmotnostnému maximu daného intervalu. V prípade silno stresovaných jedincov nebola spodná hranica dosiahnutá pred ukončením pokusu a tieto neboli po celú dobu pokusu zaliate.

Tab. 1 Intervaly maximálnej kapilárnej kapacity (MCC) a hmotnosti črepníka pre dosiahnutie rôznych úrovní stresu zo sucha: kontrola (c), mierny stres (ms) a silný stres (ss)
Tab. 1 Ratio of maximum capilar capacity (MCC) and pot weight maintained during treatment for three variants: control (c), mild drought stress (ms), severe stress (ss)

Variant	MCC	hmotnosť črepníka[1] (g)
kontrolné sadenice (c)	60 %–80 %	5845–6500
vystavené miernemu stresu (ms)	40 %–59 %	5189–5844
silno stresované jedince (ss)	20 %–39 %	4533–5188

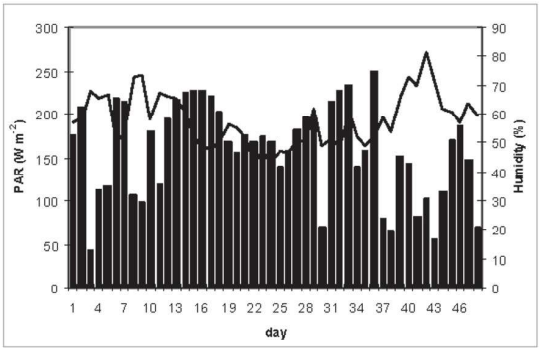
Sledovanie podmienok prostredia

Pozorované jedince boli pred začiatkom pokusu prihnojené. Rástli v semikontrolovaných podmienkach pri difúznom svetle, čím sa zamedzilo fotoinhibícii a čiastočne prehrievaniu asimilačného aparátu. Počas pokusu boli kontinuálne (v 10-minútových intervaloch) zaznamenávané nasledujúce meteorologické parametre (obr. 1): teplota vzduchu [°C], relatívna vlhkosť vzduchu [%] a globálna radiácia [W m^{-2}]. Získané údaje boli spracovávané pomocou softvéru Mini32 (EMS Brno).

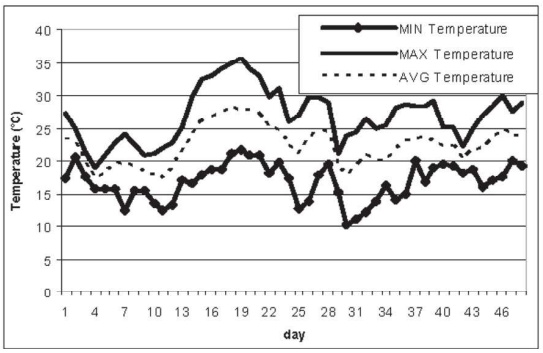
Sledovanie fluorescencie chlorofylu *a*

Na meranie fluorescencie chlorofylu *a* bol použitý fluorimeter PEA (*Plant Efficience Analyser*, Hansatech Ltd., Kings Lynn, UK). Vzorka bola ožiarená saturačným

impulzom po polhodinovej adaptácii na tmu. Táto doba postačuje na zastavenie transportu elektrónov v tylakoidných membránach, transtylakoidný pH-gradient je po adaptácii na tmu minimálny (ROHÁČEK, BARTÁK 1999). Meranie bolo realizované vždy v dvoch opakovaniach pre každého jedinca, pričom boli stanovené parametre: F_0 (počiatočná fluorescencia, všetky reakčné centrá sú otvorené), F_m (maximálna fluorescencia, všetky reakčné centrá sú zatvorené), $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$, maximálny kvantový výťažok fotochemických reakcií (KRAUSE, WEIS 1991).



a



b

Obr. 1 (a, b): Denná suma fotosynteticky aktívneho žiarenia a priemerná vlhkosť vzduchu počas dňa (a); minimálna, maximálna a priemerná denná teplota (b)
Fig. 1 (a, b): Daily sum of phototosynthetic active radiation and air humidity during the days (a), minimum, average and maximum daily temperature (b)

Meranie výmeny plynov (P_N) a stomatálnej konduktancie (g_s)

Efektivita výmeny plynov u mladých jedincov smreka bola meraná pomocou otvoreného gazometrického systému CIRAS 1 (PPSystem VB). Koncentrácia CO_2 bola počas merania udržiavaná na hladine 250 ppm, intenzita fotosynteticky aktívneho žiarenia bola 250 µmol m^{-2} s^{-1}, teplota 20 °C. Prístrojom bola taktiež zaznamenávaná stomatálna konduktancia. Meraný bol vždy jeden tohoročný výhon a to medzi 7 až 11 hodinou.

Koncentrácia asimilačných pigmentov

Pre stanovenie koncentrácie asimilačných pigmentov bol používaný 80 %-ný vodný roztok acetónu po degradácii vzoriek ihličia homogenizáciou pri 35 000 n/min. Tento bol spracovaný na spektrofotometri Cintra 6.5, GBS, Austrália. Pri vyhodnotení sme použili matematické vzťahy podľa LICHTENTHALERA (1987).

Vodný potenciál

Na meranie vodného potenciálu (Ψ_w) sa používa psychrometrická metóda. Pri tejto metóde sa zatvorí asimilačný orgán do psychrometrickej komory. Voda sa zo vzorky vyparuje, až kým nedosiahne tlak pár v komore vodný potenciál rovný vodnému potenciálu pletiva. Vodný potenciál sa určí zmeraním tlaku vodných pár a následným odčítaním z kalibračnej krivky. Na meranie bol použitý prístroj PSY – PRO, WESCOR.

Stanovenie koncentrácie prolínu

Obsah voľného prolínu bol stanovovaný spektrofotometricky ninhidrínovou metódou: Kyslý ninhidrín sa pripravuje zahrievaním 4,25 g ninhidrínu v 30 ml ľadovej kyseliny octovej a 20 ml 6M kyseliny fosforečnej za stáleho miešania až do rozpustenia. Približne 0,5 g rastlinného materiálu sa homogenizuje v 10 ml 3 %-nej vodnej kyseliny sulfosalicylovej a homogenát sa filtruje cez filtračný papier. 2 ml filtrátu reaguje s 2 ml ľadovej kyseliny octovej v skúmavke počas 1 hodiny pri 100 °C vo vodnom kúpeli. Reakcia sa zastavuje ľadovým kúpeľom. Reakčná zmes sa extrahuje 4 ml toluénu, silne sa premiešava po dobu 15–20 minút na trepačke. Z vodnej fázy sa odsáva chromofór, zahrieva sa na izbovú teplotu a meria sa absorbancia pri vlnovej dĺžke 520 nm s použitím toluénu ako refrakčnej vzorky. Koncentrácia prolínu sa určuje z kalibračnej krivky a vypočíta sa na základe čerstvej hmotnosti (BATES *et al.* 1973).

Výsledky a diskusia

Reťazec elektrónového transportu a súvisiacich procesov je relatívne odolný voči dehydratácii. Pri našom pokuse boli hodnoty parametra F_v/F_m stabilné až po 27. deň, potom nastal skokový zlom. Štatisticky významne nižšie hodnoty sme u silne stresovaných jedincov namerali počas 37. dňa pokusu, 48. deň bol pokles hodnôt silno stresovaných jedincov oproti začiatku pokusu 36% (Tab. 2). Slabo stresované jedince znížením maximálnej efektivity PS2 nereagovali. Priemerná hodnota F_v/F_m nameraná počas 42. dňa na variante ss (silný stres) bola <0,72 a 48. deň <0,6. Tieto kritické hodnoty považujú BOLHAR-NORDENKAMPF a GÖTZL (1992) za dôkaz silných, resp. ireverzibilných fyziologických porúch.

Niektorí autori uvádzajú zistenie štatisticky nevýznamných rozdielov v reakcii parametra F_v/F_m na sucho (napr. LU, ZHANG 1998, SUBRAHMANYAN *et al.* 2006). Uvedený parameter sledovali na smreku obyčajnom aj PUKACKI, KAMINSKA-ROZEK (2005). Preukazné zmeny pozorovali už 18. deň pokusu a na 42. deň bol pokles hodnôt až 44%. BIGRAS (2005) sledoval u smreka počiatočný pokles F_v/F_m pri hodnotách vodného potenciálu medzi –1 až –2 MPa. Fluorescencia chlorofylu *a* sa ukazuje ako relatívne spoľahlivý ukazovateľ stresu

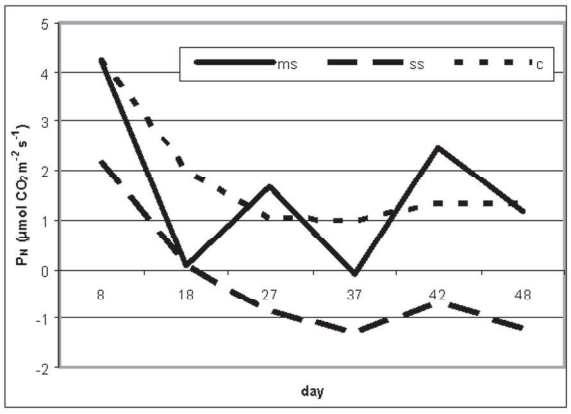
zo sucha pre smrek obyčajný, výhodou je aj rýchle a bezproblémové meranie. Nevýhodou je však relatívne neskorá reakcia parametra F_v/F_m. Parameter F_v/F_m vykazuje zmeny až v čase, keď je silno obmedzený príjem CO_2 listami (CORNIC 1996).

Prakticky po celú dobu merania boli hodnoty P_N aj g_s najnižšie u jedincov silno stresovaných suchom (obr. 2). Zaujímavý je tiež relatívne prudký pokles fotosyntetickej aktivity (resp. zvýšenie fotorespirácie) kontrolných jedincov v porovnaní s hodnotami nameranými na počiatku pokusu. Tieto sadenice síce mali dostatok vlahy, fotosyntéza však zrejme bola inhibovaná dlhotrvajúcimi extrémnymi teplotami. Počas 16. až 30. dňa dosahovala maximálna denná teplota v priemere 31,5 °C v tieni (s maximom takmer 36 °C). Mierne stresované jedince dosahujú po zaliatí dokonca vyššie hodnoty P_N v porovnaní s kontrolnými jedincami (27. a 42. deň).

Tab. 2 Priemerné hodnoty parametra F_v/F_m (n = 20) a podobnosť variánt c (kontrola), ms (mierny stres) a ss (silný stres) počas 48 dní trvajúceho pokusu. Odlišné písmená označujú významnosť rozdielov, ANOVA, Duncanove párové testy, P < 0,05

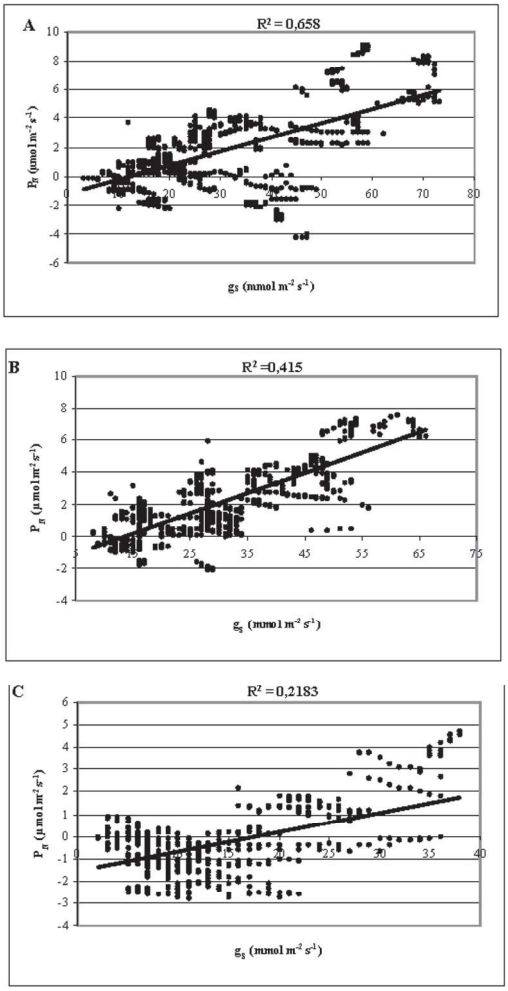
Tab. 2 Average value of F_v/F_m parameter (n = 20) and similarity among variants c (control), ms (mild drought stress) and ss (severe stress) during 48 days long treatment. Different letter denote significant difference tested by ANOVA, Duncan's test, P < 0,05

Day treatment	8	18	27	37	42	48
C	0,833 a	0,817 a	0,817 a	0,827 b	0,823 b	0,795 b
Ms	0,841 b	0,826 b	0,816 a	0,832 b	0,827 b	0,809 b
Ss	0,842 b	0,824 a,b	0,818 a	0,793 a	0,712 a	0,538 a
R^2 [%]	14,8	9,7	0,3	30,2	50,1	63,1
P	0,0103	0,0538	0,9129	0,0000	0,0000	0,0000
F	4,9605	3,0778	0,0912	12,3412	28,6462	48,6416



Obr. 2: Hodnoty čistej fotosyntézy pre varianty: kontrola (c), mierny stres (ms), silný stres (ss)

Fig. 2: Net photosynthesis PN for control individuals (c), seedlings growing in mild and in severe drought condition



Obr. 3: Závislosť medzi prieduchovou vodivosťou (gS) a čistou fotosyntézou (P_N) pre rôzne hladiny stresu zo sucha: a – control, b – ms, c – ss

Fig. 3: Relationships between stomatal conductance and net photosynthesis for variants: c (control), ms (mild drought stress) and ss (severe stress)

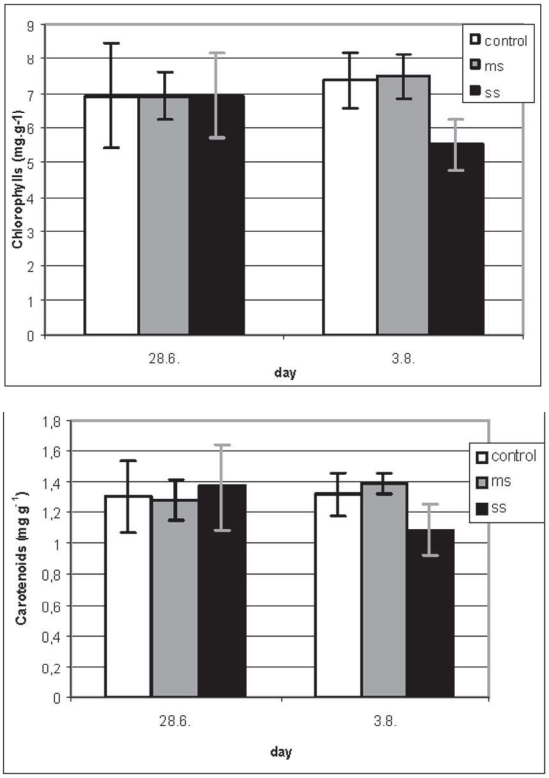
Pri hodnotení závislosti medzi P_N a g_s (obr. 3a, b, c) sme pozorovali najtesnejšiu lineárnu koreláciu u kontrolného variantu (R = 0,81), slabšiu u variantu ms (R = 0,64) a najnižšiu (R = 0,47) u silno stresovaných sadeníc. U silno stresovaných jedincov bola teda závislosť P_N a g_s slabšia oproti zvyšným dvom variantom. To poukazuje na fakt, že pri variante ms, ale najmä pri variante ss je rýchlosť asimilácie limitovaná aj nestomaticky. Ako uvádzajú TIAN, LEI (2006), stres zo sucha vedie k peroxidácii lipidov v dôsledku akumulácie peroxidu vodíka. Pri miernom strese zo sucha zaznamenali reakciu rastliny v smere zvýšenia odolnosti voči oxidatívnemu poškodeniu. Pri silnom strese aktivita antioxidatívnych enzýmov výrazne klesla, čím sa tiež znížila obranyschopnosť organizmu. Pokles P_N tiež tesne koreluje s redukciou RuBPC aktivity, pozorovanou pri vodnom deficite (BERTAMINI *et al.* 2006). Fakt, že ms jedince dosahovali po zaliatí vyššie hodnoty P_N v porovnaní s kontrolnými jedincami (27. a 37. deň) môže súvisieť so zvýšenou odolnosťou suchom stresovaných jedincov voči tepelnému stresu, kedy sa zvyšuje odolnosť kyslík vyvíjajúceho komplexu a reakčných centier (LU, ZHANG 1999).

Ako uvádzajú FLEXAS *et al.* (2001), g_s nie je kontrolovaná len dostupnosťou vody v pôde a často reaguje na sucho ešte pred zaznamenaním zmien relatívneho obsahu vody a vodného potenciálu listov. Považujú preto stomatálnu vodivosť za parameter vhodne a komplexne odrážajúci vodný stres rastlín. Druhy s vysokou g_s v optimálnych podmienkach vykazujú vyššiu citlivosť tohto parametra voči zmenám prostredia (EWERS

et al. 2001). Autori porovnávajú hodnoty g_s pre dreviny *Picea abies* a *Pinus tadea*, keď namerali približne polovičné hodnoty pre smrek a teda aj nižšiu citivosť reakcie prieduchov.

Parametre P_N a g_s naozaj reagovali relatívne výrazne na stres zo sucha. Spoľahlivú identifikáciu vodného deficitu v poľných podmienkach však čiastočne komplikuje výrazné kolísanie v dôsledku pôsobenia ďalších faktorov, ako aj prirodzená denná dynamika. Trend priebehu parametrov P_N a g_s pre rôzne varianty nie je tak jednoznačne ovplyvnený výlučne režimom zavlažovania ako u ostatných sledovaných markérov stresu.

Koncentrácia pigmentov v asimilačných orgánoch bola zisťovaná len dvakrát. Dôvodom bola relatívne vysoká náročnosť týchto analýz na odber materiálu. Na základe meraní možno konštatovať pomerne výrazný pokles chlorofylov (a + b) aj karotenoidov (xantofylov a karoténov) u silno stresovaných jedincov (obr. 4). Pomer chlorofylov ku karotenoidom, ako aj pomer chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* výrazné rozdiely nepreukázal. Kronfuss *et al.* (1998) zaznamenali počas 38 dní obmedzeného zalievania smreka obyčajného významný pokles obsahu α- aj β-caroténu, nezmenili sa však koncentrácie chlorofylov. Beck *et al.* (1942) uvádza, že iba extrémne sucho výrazne ovplyvňuje produkciu pigmentov a významnejšími faktormi ovplyvňujúcimi ich obsah v asimilačných orgánoch sú extrémne vysoké teploty a nadmerné žiarenie.

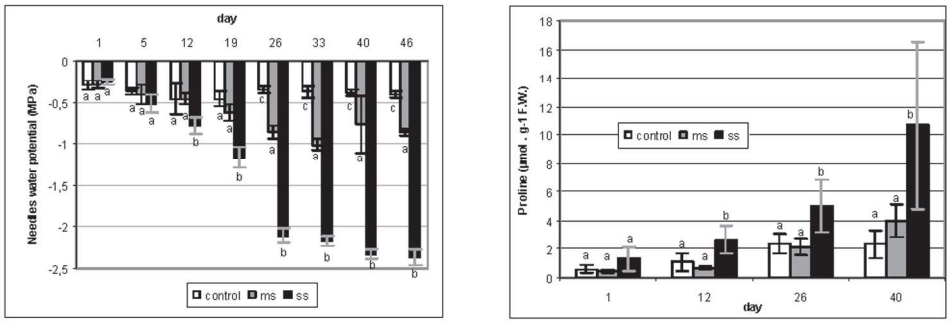


Obr. 4: Koncentrácia chlorofylov a karotenoidov na začiatku meraní a 36. deň pokusu pre kontrolné jedince (c), sadenice rastúce v podmienkach mierneho (ms) a silného stresu (ss)

Fig. 4: Chlorophylls and carotenoids concentration on begginig of treatment and during 36-th day for control (c), mild stress (ms) and severe stress (ss)

Namerané hodnoty vodného potenciálu (obr. 5) veľmi skoro a výrazne vyjadrujú rozdiely rôznej miery vodného deficitu. Už 12 deň bez závlahy sme pozorovali štatisticky významné rozdiely u variantu ss, 26. deň sme namerali signifikantné rozdiely medzi všetkými skupinami.

Taktiež pri pozorovaní koncentrácie aminokyseliny prolínu (obr 5.) pozorujeme štatisticky signifikantný nárast jeho koncentrácie u variantu ss už po 12. dňoch vystavenia suchu. Štatistický rozdiel medzi variantom ms a variantom c sa po dobu pokusu nepotvrdil. Stúpanie koncentrácie prolínu aj u kontrolného variantu poukazuje na nešpecifickosť tejto reakcie, keď rastliny reagujú zvyšovaním koncentrácie prolínu na viaceré stresujúce faktory (v tomto prípade s najväčšou pravdepodobnosťou na vysokú teplotu). V bioenergetike rastlín môže prolín podporiť syntézu ATP, kde je donorom vodíkov pre respiračné reťazce (STASZKOVÁ, TÁBORSKÝ 2006). Je tiež schopný eliminovať reaktívne formy O_2 (SARADHI *et al*. 1995). Aminokyselina prolín však plní najmä významnú osmoprotekčnú funkciu (YANG *et al.* 2007). TESCHE (1980) uvádza, že smrek reaguje jeho zvýšenou tvorbou i na podnety ako zvýšená koncentrácia CO_2 a mráz.



Obr. 5: Vodný potenciál a koncentrácia prolínu pre kontrolu (c), mierne (ms) a silno stresované (ss) jedince; FW – čerstvá hmotnosť

Fig. 5: Water potential and proline concentration for control individuals (c), seedlings growing in mild and severe drought condition (ms, ss); FW – fresh weight

Zaznamenal zhruba trojnásobné koncentrácie pri komplexnom pôsobení škodlivých faktorov oproti pôsobeniu jednotlivému. Zvýšenú tvorbu prolínu indukovanú pôsobením výfukových plynov sledovali u smreka VISKARI *et al*. (2000), pôsobenie UV-B žiarenia pozorovali REN *et al.* (2007).

ZÁVER

Môžeme konštatovať, že využitie jediného stresového markéra pre identifikáciu väčšiny stresorov (vrátane sucha) nie je z dôvodu prevažnej nešpecifickosti ich reakcie vhodným prístupom. S ohľadom na včasnú reakciu, nižšiu variabilitu hodnôt v priebehu dňa, ako aj relatívne bezproblémové stanovenie sa z použitých markérov ako účelné javia pozorovania vodného potenciálu a koncentrácie prolínu v asimilačných orgánoch. Ďalšie markéry však taktiež v značnej miere dopĺňajú informáciu o celkovom fyziologickom stave rastliny.

Poďakovanie

Výskum prebieha za finančnej projektov APVV-022-07, VEGA 2/0032/08, a VEGA 1/3524/06.

Literatúra

BATES, L. S., WALDREN R. P., TEARE, I. D. 1973: Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* **39**: 205–207.

BECK, W., A. 1942: Efect of drought on the production of plant pigments. Plant Physiolgy **17**(3): 487–491.

BERTAMINI, M., ZULINI, L., MUTCHUCHELIAN, CH., NEDUNCHEZHIAN, N. 2006: Effect of water deficit on photosynthetic and other physiological responses in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Riesling) plants. Photosynthetica, **44**(1): 151–154.

BIGRAS, F. J. 2005: Photosynthetic response of white spruce families to drought stress. New Forest **29**:135–148.

BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R., GÖTZL, M. 1992: Chlorophyllfluoreszenz als Indikator der mit der Seehöhe zunehmenden Stressbelastung von Fichtennadlen. *FBVA-Berichte* **67**: 119–131.

BRESTIČ, M., OLŠOVSKÁ, K. 2001: Vodný stres rastlín: príčiny, dôsledky, perspektívy. VES SPU Nitra. 149 pp.

CORNIC, G., MASSACI, A. 1996: Leaf Photosysthesis Under Drought Stress. *In*: Photosynthesis and the Environment. BARKER, R. (*ed.*). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 347–366.

CUDLÍN, P., TŘÍSKA, J. 1997: Hodnocení ekologických rizik v lesních ekosystémech. *In*: Hodnocení rizik pro životní prostředí: „Od molekulární a buněčné úrovně po ekosystém“, Brno. 108–116.

DITMAROVÁ, Ľ., KMEŤ, J., STŘELCOVÁ, K. 2005: Analýza možných vplyvov prostredia na sadenice smreka (*Picea abies* L. Karst) v podmienkach nádobového pokusu. *In*: Bioklimatologie současnosti a budoucnosti. ROŽNOVSKÝ, J., LITSCHMANN, T. (*eds.*). CD-ROM, Brno – Křtiny. 6 pp.

DREYER, E., 1997. Photosynthesis and drought in forest trees. In: Trees – Contributions to Modern Tree Physiology, Rennenberg, H., Eeschrich, W., Ziegler, H. (*eds.*). Backhuys, Leiden, pp. 215–238.

ESCÓS, J., ALADOS, C. L., PUGNAIRE, F. I., PUIGDEFÁBREGAS, J., ELMEN, J. 2000: Stress resistance strategy in an arid land shrub: interaction between developmental instability and fractal dimension. Journal of *Arid Environments* **45**: 325–336.

ESCH, A., MENGEL, K. 1998: Combined effects of acid mist and frost drought on the water status of young spruce trees (*Picea abies*). *Environmental and Experimental Botany* **39**: 57–65.

ESCH, A., MENGEL, K. 1998: Combined effects of acid mist and frost drought on the water status of young spruce trees (*Picea abies*). *Chemosphere* **36**(4–5): 645–650.

EWERS, B. E., OREN, R., PHILIPS, N., STRÖMGREN, M., LINDER, S. 2001: Mean canopy stomatal conductance responses to water and nutriet availabilities in *Picea abies* and *Pinus taeda*. *Tree Physiology* **21**:841–850.

HANISCH, B., KILZ, E, 1990: Waldschäden erkennen. Fichte und Kiefer. Eugen Ulmer a Co., Stuttgart. 334 pp.

HOLUŠA, J., LIŠKA, J. 2002: Hypotéza chřadnutí a odumírání smrkových porostů ve Slezsku (Česká republika). *Zprávy lesnického výskumu* **47**(1): 9–15.

KLIKA, J., NOVÁK, V., GREGOR, A. 1954: Praktikum fytocenologie, ekologie, klimatologie a půdoznalectví. Nakladatelství Československé akademie věd, Praha.

KONÔPKA, J., *et al.* 2002: Správa o lesnom hospodárstve v Slovenskej republike 2002 (Zelená správa). MP SR, Bratislava. 126 pp.

KRAUSE, G. H., WEIS, E. 1991: Chlorofyll fluorescence and and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Bilology* **42**: 313–349.

KRONFUSS G., POLLE A., TAUSZ M., HAVRANEK W.M., WIESER G. 1998: Effects of ozone and mild drought stress on gas exchange, antioxidants and chloroplast pigments in current-year needles of young Norway spruce [Picea abies (L.) Karst.]. Trees, **12**: 482–489.

KULLA, L. 2002: Stresové pôsobenie vybraných meteorologických a ekofyziologických faktorov na smrek obyčajný (*Picea abies* [L.] Karst.) v horských polohách. *Lesnícky časopis – Forestry Journal*, **48**(1): 71–80.

KUTÍLEK, V., NIELSEN, D. R. 1994: Soil Hydrology. Catena Verlag, Crenlingen-Destedt, 370 s.

LICHTENTHALER, H. K. 1987: Chlorophylls and carotenoids: Pigments of Photosyntetic Biomembranes. *Methods in enzymology* **148**: 350–382.

LU, C., ZHANG, J. 1998: Effect of water stress on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition i nwheat plants. Aust. *J. Plant Physiology* **25**: 883–892.

LU, C., ZHANG, J. 1999: Effect of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *Journal of Experimental Botany* **50**(336): 1199–1206.

LÜTGE, U., SCARANO, R. 2004: Ekophysiology. *Revista Brasileira de Botanica* **27**(1): 1–10.

MÄKINEN, H, NÕJD, P., KAHLE, H. P., NEUMANN, U., TVEITE, B, NIELIKÄINEN, K, RÖHLE, H., SPIECKER, H. 2001: Radial growth variation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) across latitudinal and altitudinal gradients in central and northern Europe. *Forest Ecology and Management* **171**: 243–259.

MINĎÁŠ, J., ŠKVARENINA, J., STŘELCOVÁ, K., PRIWITZER, T. 2000: Influence of climatic changes on Norway spruce occurrence in the West Carpathians. *Journal of forest science* **46**(6): 249–259.

MRÁČEK, Z., PAŘEZ J. 1986: Pěstovámí smrku. Státní zemědelské nakladatelství, Praha. 202 pp.

PAGAN, J, RANDUŠKA, D. 1987: Atlas drevín 1 (Pôvodné dreviny). Obzor, Bratislava. 360 pp.

PRIWITZER, T., STŘELCOVÁ, K., KMEŤ, J. 2003: Ekofyziologické procesy lesných drevín. *In*: Lesy Slovenska a globálne klimatické zmeny. MINĎÁŠ, J., ŠKVARENINA, J. (*eds.*). TU vo Zvolene. pp. 44–49.

PROCHÁZKA, S., MACÁČKOVÁ, I., KREKULE, J., ŠEBÁNEK, J., *et al.* 1998: Fyziologie rostlin. Academia, Praha. 484 pp.

PŘÍHODA, A. 1959: Lesnická fytopatologie. Státní zemědelské nakladatelství, Praha. 347 pp.

PUKACKI, P. M., KAMIŃSKA-ROZEK, E. 2005: Effect of drought stress on chlorophyll a fluorescence and electrical admittance of shoots in Norway spruce seedlings. *Trees* **19**: 539–544.

REN, J., DAI, W., XUAN, Z., YAO, Y., KORPELAINEN, H., LI, CH. 2007: The effect of drought and enhanced UV-B radiation on the growth and physiological traits of two contrasting poplar species. *Forest Ecology and Management* **239**: 112–119.

ROHÁČEK, K., BARTÁK, M. 1999: Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica* **37**: 339–363.

SARADHI, P., ALIA, P., ARORA, S., PRASAD, K. 1995: Proline accumulates in plants exposed to UV-rediation and protects them against UV-induced peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **209**(1): 1–5.

SCHMIDT-VOGT, H. 1987: Die Fichte I. Taxonomie, Verdbreitung, Morphologie, Ökologie, Waldgesellschafen. Paul Parey, Hamburg und Berlin. 647 pp.

ŠKVARENINA, J., STŘELCOVÁ, K., KAMENSKÝ, L. 1995: Zrážková zabezpečenosť smreka obyčajného na vybraných lokalitách Stredného Slovenska. *In*: Lesné ekosystémy a globálne klimatické zmeny. ŠKVARENINA, J., MINĎÁŠ, J., ČABOUN, V. (*eds.*). LVÚ Zvolen. pp. 89–96.

STASZKOVÁ, L.,TÁBORSKÝ, J. 2006: Změny v metabolismu rostlin při stresu kadmiem. *In*: Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2006 (Sborník příspěvků). HNILIČKA, F. (*ed.*). ČZU, Praha. pp. 180–183.

SUBRAHMANYAM, D., SUBASH, N., HARIS, A., SIKKA, A. K. 2006: Influence of water stress on leaf photosynthetic characteristicsin wheat cultivars differing in their susceptibility to drought. *Photosynthetica* **44**(1): 125–129.

TESCHE, M. 1980: Prolin – ein unspezifischer Stressindikator bei Gehöelzen. *Wissenschaftliche Beiträge* **9**: 58–66.

TIAN, X., LEI, Y. 2006: Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. *Biologia Plantarum* **50**:775–778.

TUŽINSKÝ, L. 1999: Periódy sucha v lesných pôdach pod lesnými ekosystémami s rozdielnym drevinovým zložením. *In*: Atmosféra 21. storočia, organizmy a ekosystémy, zborník referátov z medzinárodnej vedeckej konferencie Bioklimatologické pracovné dni 1999. TUŽINSKÝ, L., ŠKVARENINA, J., MINĎÁŠ, J. (*eds.*). TU vo Zvolene. pp. 23–27.

TUŽINSKÝ, L. 2002: Soil moisture in mountain spruce stand. Journal of Forest Science, **48**(1): 27–37.

VISCARY, E. L., KÖSSI, S., HOLOPAINEN, J. K. 2000: Norway spruce and spruce shoot aphid as indicators of traffic pollution. *Environmental Pollution* **107**: 305–314.

YANG, Y., LIU, Q., HAN, C., QIAO, Y. Z., YAO, X. Q., YIN, H. J. 2007: Influence of water stress and low irradiance on morphological and physiological characteristics of *Picea asperata* seedlings. Photosynthetica, **45**(4): 613–619.

Adresa autorov:
Ing. Daniel Kurjak
Doc. Ing. Jaroslav Kmeť, PhD.
Katedra fytológie
Lesnícka fakulta
TU vo Zvolene
T. G. Masaryka 24
960 53 Zvolen, SR

e-mail: kurjak@vsld.tuzvo.sk

RNDr. Ľubica Ditmarová, PhD.
Ústav ekológie lesa SAV
Štúrova 2
960 53 Zvolen
Slovenská republika

Sensitivity of drought stress biomarkers tested on norway spruce

Summary

Spruce forests are in danger by drought on the present. It is caused by changes in climate and water distribution during the year and relative high requirement of spruce to soil moisture.

This paper presents results from measurements set of parameters on 4-year-old Norway spruce seedlings growing in semicontrolled condition. The moisture content of the soil for severe water stress (ss) was limited to 20%–39% of the maximum capilar capacity (MCC), mild stress (ms) to 40%–59% MCC and control individuals (c) were well watered (60%–80% MCC).

Durin 48-days long treatment were measured this parameters: chlorophyll *a* fluorescence (F_v/F_m parameter), net photosynthesis (P_N), stomatal conductivity (g_s), pigments content, concentration of free proline and water potential.

We observed drought stress iduced changes in chlorophyll *a* fluorescence only for severe stressed (ss) seedling during 37-th day of treatment. It confirms assumption that proceses of primary photosynthesis are relatively low sensitive towards drought stress. Response of P_N and g_s was markedly effected by high temperature not only water defficit. Variant ms achieved even higher values of P_N after watering in compare with c variant. Relationships between stomatal conductance and net photosynthesis was relatively tight for c variant (R=0,81), correlation coefficient for ss individuals was ony 0,47. Is suggests that P_N for ms but especially for ss variant was not reduced only by stomata activity. Long term water deficit decreased chlorophylls (chl *a*+chl *b*) and carotenoids (xantophylls and carotens) content for ss seedlings. There was no marked changes in chl/car and chl *a*/chl *b* ratios neither between variant ms and c. Significant difference in amino acid proline was determined during 12-th day for ss individuals, but changes between ms and s were not finded during treatment. Water potential values describe very shortly differences between various volume in water deficit.