

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství

Zrychlují nitrátové ionty tok vody v listech?

**Eliška Humeňanská
Jihomoravský kraj**

Brno 2023

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství

Zrychlují nitrátové ionty tok vody v listech?

Do nitrate ions accelerate water flow in leaves?

Autoři: Eliška Humeňanská

Škola: Gymnázium Brno, Slovanské náměstí, p. o., Brno 612 00

Kraj: Jihomoravský

Konzultant: doc. RNDr. Vít Gloser, Ph. D.

Brno 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne

Eliška Humeňanská

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu panu doc. RNDr. Vítu Gloserovi, Ph. D. za odborné rady a vedení při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat Alžbětě Floriánové, která mi umožnila stát se součástí těchto experimentů a během celé práce mě podporovala.

Anotace

Rostliny se během svého života musí vypořádat s řadou stresových faktorů, jedním z nich je i nedostatek dusíku (N). Při nedostatku N dochází ke zpomalení transpirace, na což navazuje omezený průběh fotosyntézy a případné zastavení růstu. Tato práce se zabývá signálními mechanismy, které dusičnanové ionty (NO_3^-) vyvolávají v listech hospodářských rostlin, jmenovitě hrachu setého (*Pisum sativum*), a jak jejich signální funkce ovlivňuje rychlost transpirace, tedy přítok vody do listů.

Klíčová slova

dusík; dusičnany; transpirace; signální molekuly; hrách setý; *Pisum sativum*

Annotation

During their life, plants must deal with several stress factors, one of which is the deficiency of nitrogen (N). When plants lack N the transpiration slows down, which is followed by a limited ability to photosynthesize and possible suspension of growth. This study deals with the signaling mechanisms of nitrate ions (NO_3^-) in the leaves of agricultural plants, namely field pea (*Pisum sativum*) and how their signaling function affects the rate of transpiration – the inflow of water into the leaves.

Keywords

nitrogen; nitrate; transpiration; signal molecules; field pea; *Pisum sativum*

Obsah

1	Úvod	6
2	Cíle práce	7
	Teoretická část	8
3	Vodní režim rostlin	8
3.1	Příjem vody a transport v kořenech	8
3.2	Transport vody do nadzemní části	9
3.3	Transpirace	9
4	Výživa rostlin	12
4.1	Příjem minerálů kořeny	12
4.2	Dusík	12
4.2.1	Koloběh dusíku v přírodě	13
4.2.2	Význam dusíku pro rostlinu.....	13
4.2.3	Asimilace dusíku.....	13
4.2.4	Příznaky nedostatku dusíku	14
4.2.5	Příznaky nadbytku dusíku.....	14
4.2.6	Krátkodobé změny dostupnosti dusíku.....	14
5	Stres rostlin	16
5.1	Prvotní reakce na deficienci dusíku	16
6	Signalizační funkce dusičnanů	17
6.1	Primární reakce na nitráty	17
6.2	Receptory	17
	Praktická část	18
7	Metody	18
7.1	Rostlinný materiál a jeho kultivace.....	18
7.2	Měření rychlosti transpirace.....	18
7.3	Analýza obsahu dusičnanů v listech	19
8	Výsledky	22
8.1	Experimenty na oddělených listech rostlin hrachu	22
8.1.1	Experiment 1	22
8.1.2	Experiment 2	23
8.1.3	Experiment 3	24
9	Diskuze	25
10	Závěry	27
11	Použitá literatura	28

1 ÚVOD

Během svého života se rostliny, jakožto autotrofní organismy, musí vypořádat s řadou nepříznivých faktorů, od měnící se dostupnosti živin a vody v půdě, růstu nebo poklesu teplot, nedostatečného či naopak příliš vysokého slunečního záření, až po napadení herbivory, parazity a chorobami. I přes tyto nepříznivé faktory se staly největšími producenty biomasy a kyslíku na Zemi. Předpokládá se však, že v blízké budoucnosti se budou podmínky pro pěstování zemědělských plodin značně zhoršovat kvůli úbytku zemědělské půdy, častému znečišťování a zasolování zemědělských půd i klimatickým změnám.

Dostatek vody a dusíku jsou hlavní faktory, které určují zdravý a bujný růst rostlin. Aby bylo možné produkci hospodářských rostlin zvyšovat, farmáři začali používat hnojiva a zavlažovat svá pole. Minerální hnojiva se ve větším množství používají už od 19. století, od té doby však jejich spotřeba několikanásobně vzrostla. Přitom hnojené rostliny jsou schopné vstřebat maximálně 50 % dodaného dusíku, při cíleném hnojení na listy je rostlina schopná přijmout pouze 10 %, zbytek živin se pak dostává do ovzduší, podzemních vod nebo jsou při prudkých deštích či nesprávném zavlažování odplavovány do vodních toků, kde mají negativní účinky na životní prostředí (Gonzalez-Dugo et al., 2010). Příkladem může být znečištění vod dusičnanovým aniontem (NO_3^-), tato sloučenina přispívá k eutrofizaci vod a nedostatku kyslíku v ní, což s sebou nese dramatické následky pro ekosystém v daném místě. Dalším důsledkem je tvorba oxidu dusného, který přispívá ke skleníkovému efektu, jelikož jeho vliv na tento jev je třistakrát vyšší než oxidu uhličitého (Nacry et al., 2013). Nicméně správné užívání hnojiv by mohlo být velmi výhodné v oblastech, kde farmáře sužují krátkotrvající sucha. Při nedostatku vody jsou průduchy rostlin zavřené a nemůže tudíž probíhat příjem oxidu uhličitého (CO_2) a růst rostliny se zpomaluje. Vysoké koncentrace dusíku v půdě povzbuzují rostliny k otevření průduchů – rostlina tedy při stresu méně tlumí svůj růst (Araus et al., 2020).

Výměna plynů mezi rostlinou a prostředím je velmi důležitým procesem pro správný růst rostliny. Oxid uhličitý je potřebný pro růst a může do rostliny vstupovat pouze otevřenými průduchy. Bez CO_2 by v rostlině nemohla probíhat fotosyntéza, kterou si rostlina vytváří životně důležité asimiláty. Produktem fotosyntézy je též kyslík, který se stal důležitou sloučeninou pro udržení stávající biodiverzity na Zemi. Otevřenými průduchy současně s příjmem CO_2 však uniká do prostředí vodní pára. Tomuto procesu se říká transpirace a je také pro rostliny potřebný. Voda, která se vypařuje z listů, je přijímána kořeny a při svém transportu zpět do listů s sebou nese důležité látky, jako jsou třeba minerální živiny nebo hormony.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce je posoudit, jaký vliv má krátkodobá deficiencie dusíku na fyziologické funkce rostlin hrachu setého (*Pisum sativum*).

Dále byly stanoveny tyto dílčí cíle:

- zjistit, jak rychle rostlina reaguje zpomalením transpirace
- zjistit, zda zpomalení transpirace může být důsledkem nedostatku dusičnanových iontů
- zjistit, jestli je rychlost transpirace závislá na množství nitrátů transportovaných do listů

TEORETICKÁ ČÁST

3 VODNÍ REŽIM ROSTLIN

Voda (H₂O) je velmi důležitou složkou pro všechny živé organismy. Byla také jednou ze základních podmínek, které umožnily vznik života na naší planetě. Pro rostliny, jakožto i pro ostatní živé organismy, je voda obzvláště důležitá. Pokud ji rostlina ztratí více než 50 %, většinou hyne. Voda průměrně tvoří 70–80 % živé váhy rostliny, podílí se na transportu látek, je účastníkem mnoha metabolických procesů včetně fotosyntézy, a díky svým fyzikálním vlastnostem pomáhá rostlině snášet náhlé změny teploty. Voda je též velmi významným polárním rozpouštědlem, v půdě vytváří tzv. půdní roztok, který přináší rostlině potřebné minerální látky ke kořenům (Benešová, 2013).

3.1 Příjem vody a transport v kořenech

Všechny nižší a vyšší rostliny žijící v jezerech a jiných vodních plochách přijímají většinu potřebné vody celým povrchem těla ze svého okolí, naopak ostatní vyšší rostliny ji získávají pomocí kořenového systému z půdního roztoku. Důležitou veličinou popisující stav vody v rostlině nebo v půdě je vodní potenciál. Vodní potenciál je chemický potenciál vody v pletivech rostliny ku chemickému potenciálu destilované vody za atmosférického tlaku a totožné teploty (Gloser, 1998). Pro udržení ideální vodní bilance, tj. poměrem mezi výdejem a příjmem vody, je důležité, aby rostlina měla vodní potenciál nižší (negativnější) než půda, a byl tak stimulován příjem půdního roztoku kořeny (Campbell et al., 2006).

Transpirace značně napomáhá tomuto samovolnému příjmu vody a jejímu transportu po rostlině. K transpiraci dochází v nadzemních částech rostlin. Když se zde voda odpaří, v cévách rostliny se utvoří podtlak, který stimuluje příjem vody kořeny (Benešová, 2013). Nejvíce vody a živin je přijímáno přímo špičkami kořenů, které tvoří tzv. absorpční zónu kořene. Epidermální buňky (*rhizodermis*) jsou zde nejlépe propustné pro půdní roztok a zároveň je zde největší koncentrace kořenových vlásků, které zvětšují absorpční povrch kořene. Zrychlený průchod molekul vody přes *rhizodermis* umožňují specializované membránové proteiny nazývané akvaporiny, které usnadňují pohyb vody po směru spádu osmotického gradientu (Campbell et al., 2006).

Kromě apoplastického způsobu příjmu vody kořeny, který spočívá v samovolném prostupování roztoku buněčnými stěnami a mezibuněčnými prostory, rozeznáváme ještě symplastický příjem vody. Molekuly vody při něm prochází nejprve přes cytoplazmatickou membránu do cytoplazmy a pak z buňky do buňky mezibuněčnými kanály – plazmodesmaty. Na rozdíl od apoplastické cesty je pomalejší. Jedná se tedy o způsob, jakým rostlina může přijmout velké množství relativně čisté vody do transpiračního proudu (Steudle, 2000).

Mezi nejčastější faktory, které příjem vody ovlivňují, patří: teplota, koncentrace půdního roztoku, rychlost transpirace a respirace rostlin. S klesající teplotou klesá i aktivita metabolismu rostlin, rostlina přestává fotosyntetizovat a transpirovat, což inhibuje příjem vody z půdy.

Podobně působí i vysoká koncentrace minerálních látek v substrátu, která snižuje rozdíl mezi vodním potenciálem půdy a kořenů, a tím zmenšuje hnací sílu transportu. Pokud je půda dobře okysličená, kořenové buňky fungují normálně, což umožňuje udržovat rychlý příjem vody (Benešová, 2013).

3.2 Transport vody do nadzemní části

Dálkový transport u vyšších rostlin se uskutečňuje pomocí vodivých pletiv – dřeva (xylému) a lýka (floému). Tato dvě pletiva se většinou vyvíjí v rostlině vedle sebe a tvoří dohromady funkční celek – cévní svazek. Xylém je tvořený odumřelými buňkami – jeho prostor je tedy součástí apoplastu (oblast vně plazmatických membrán) a tvoří nejčastěji vnější část cévního svazku. Floém je naopak tvořený menšími živými buňkami a je součástí symplastu (cytoplazmatické kontinuum) (Luštinec et Žárský, 2003).

Dřevní částí prochází voda s rozpuštěnými minerálními látkami ve směru z kořenů do nadzemních částí rostlin, toto proudění nazýváme transpirační proud. Je umožněn transpirací, která v cévách vyvolává podtlak, nebo kořenovým vztlakem, což je vytlačování vody s minerály do nadzemních částí způsobené osmózou xylému v kořenech. Transport vody cévami dřeva je umožněný i samotnými fyzikálními vlastnostmi vody jako je koheze (soudržnost vodního sloupce), adheze (přilnavost) a kapilarita (vzlínání vody). Transpirační proud zajišťuje transport anorganických a organických látek z kořenů do nadzemních částí rostliny a distribuci vody do všech rostlinných buněk (Benešová, 2013).

V lýkové části probíhá transport produktů fotosyntézy (převážně sacharidů) a dalších organických látek z místa jejich tvorby do místa spotřeby. Tento přenos je řízen převážně osmózou v daném místě. Na rozdíl od transpiračního proudu může tok látek ve floému probíhat několika směry a vyžaduje dodání metabolické energie. I když má tok v dřevní části mnohem větší objem, koncentrace rozpuštěných látek je většinou vyšší ve floému (Luštinec et Žárský, 2003).

3.3 Transpirace

Transpiraci můžeme popsat jako výdej vodní páry vzniklé v mezibuněčných prostorech do atmosféry a ukončení transpiračního proudu vedeného xylémem. Rozeznáváme tři hlavní mechanismy, jak k tomu může docházet. První, nejdůležitější mechanismus je stomatální transpirace, při níž vodní pára prochází přes specializované struktury – průduchy (stomata). Průduch tvoří dvě ledvinkovité svěrací buňky (u lipnicovitých mají buňky tvar činky), které se v závislosti na denní době, množství vody v rostlině či množství záření otevírají nebo zavírají. Aby došlo k otevření průduchu a vytvoření štěrbin pro transport plynů, musí být svěrací buňky dobře zásobeny vodou a mít vysoký turgor. Pokud koncentrace osmotik v buňce a turgor klesne, buňky se zavírají. Většina cévnatých rostlin má velké množství průduchů umístěné na spodní straně listu, u mnohých vyšších rostlin je však najdeme také na vrchní straně podobně jako u rostlin jednoděložných. Vodní cévnaté rostliny jako jsou například lekníny (*Nymphaeaceae*) mají pak průduchy pouze na svrchní straně listu. Výhodou stomatální transpirace je, že ji

rostlina může citlivě regulovat a tím rychle kontrolovat své ztráty vody (Luštinec et Žárský, 2003).

Dále můžeme pozorovat také transpiraci kutikulární. Kutikula je tenká vosková vrstva na povrchu listové pokožky, jež je pro vodu a vodní páru jen stěží propustná. Tento mechanismus transpirace můžeme pozorovat hlavně u mladých rostlin, které nemají kutikulu na listech a stoncích ještě plně vytvořenou. U dospělých rostlin je měřitelná pouze tehdy, když jsou jejich průduchy uzavřené, tedy v noci či za sucha. Rostliny mají kutikulu dobře vyvinutou, aby nedošlo k přílišným ztrátám vody. Kutikulární transpirace tvoří méně než 10 % celkové transpirace a rostlina ji může omezit pouze vybudováním dostatečně silné kutikuly (Luštinec et Žárský, 2003).

Stromy využívají kromě dvou způsobů výše uvedených ještě jeden mechanismus transpirace, a to transpiraci lenticelární, kdy je vodní pára odváděna do drobných otvorů v borce kmene a větví odborně nazývaných lenticely nebo čochky (Luštinec et Žárský, 2003).

Může se zdát, že je transpirace pro rostliny nepotřebný a nevýhodný děj. Rostliny však dokáží přijímat oxid uhličitý (CO_2) pouze otevřenými průduchy, při čemž dochází i k velkým ztrátám vody, neboť pohyb velkých molekul CO_2 je pomalejší, než pohyb menších unikajících molekul H_2O . Vliv na příjem CO_2 má také jeho nižší koncentrace v ovzduší, jež zpomaluje průběh difúze do listů. Je tedy zásadní, aby rostliny udržovaly mezi výdejem vody a příjmem oxidu uhličitého určité optimum. Při rychlém výdeji vody hrozí její nadměrná ztráta a smrt rostliny, pokud však bude rostlina otevírat průduchy málo, nebude mít dostatek uhlíku na tvorbu sacharidů a dojde k jejímu vyhladovění (Pavlová, 2005).

Proces transpirace je však potřebný i z dalších důvodů. Voda transportovaná z kořenů do listů přináší důležité minerální živiny a také některé regulační látky, například hormony. Ve skutečnosti rostlina využije pouze 1–5 % přijaté vody na metabolické procesy, přebytečná voda se vypařuje. Pouze několik procent slunečního záření dopadajícího na listy je využito během fotosyntézy, většina záření se tak přeměňuje na teplo. Kdyby rostlina neměla způsob, jak se přijatého tepla zbavit, velmi rychle by se přehřála, což by způsobilo rozklad některých proteinů a následně smrt. Z tohoto důvodu je výpar vody velmi důležitý, neboť udržuje listy ve stabilní teplotě podobné nebo nižší, než je teplota okolí (Procházka et al., 1998).

Otevírání průduchů během dne je řízeno vnitřními (biologickými) hodinami rostlin, množstvím dopadajícího světla a nedostatkem oxidu uhličitého. Sluneční záření aktivuje receptory citlivé na modré světlo, což způsobí, že se ve vakuolách svěracích buněk začnou kumulovat draselné kationty K^+ , které jsou zodpovědné za jejich otevření (Campbell et al., 2006).

Zavření průduchů je způsobené změnou denní doby (noc) nebo reakcí na abiotické stresy např. sucha nebo vysokých teplot, kdy má rostlina nedostatek vody. To způsobí pokles turgoru ve svěracích buňkách a ty se zavírají. Dále se zvyšuje syntéza kyseliny abscisové (ABA), kvůli které se ve svěracích buňkách začíná zvyšovat koncentrace vápenatých iontů místo draselných. Nahromaděný vápník v cytoplazmě buňky má pak za následek postupné vytlačení draselných iontů, které z buňky spolu s vodou odchází, a průduch se zavírá. Rostlina tak omezuje příjem

CO₂ a fotosyntézu, což zpomaluje její růst (Luštinec et Žárský, 2003). Aby svěrací buňky zareagovaly co nejrychleji na vzniklý stres, mění se pH xylémové šťávy (z pH 6 na pH 7). Díky zvyšujícímu se pH šťávy se dokáže ABA rychleji a ve větším množství dostat do listu a proniknout do svěracích buněk, které se v reakci na ni začnou zavírat. Ačkoliv se ABA syntetizuje i v listech, větší množství je tvořeno v kořenech, což značně prodlužuje dráhu, kterou musí urazit, než se dostanou do místa působení (Wilkinson et Davies, 2002).

4 VÝŽIVA ROSTLIN

Rostliny ke svému životu potřebují minimálně 17 biogenních prvků. Tyto prvky dále řadíme na makrobiogenní (makroelementy), které rostlina potřebuje v relativně velkém množství, a mikrobiogenní (mikroelementy), jež jsou rostlinou využívány pouze ve stopovém množství především jako katalyzátory. Mezi devět makroelementů patří: uhlík (C), kyslík (O), vodík (H), dusík (N), síra (S), fosfor (P), draslík (K), vápník (Ca) a hořčík (Mg). Tyto prvky tvoří základ rostlinné hmoty, tedy nukleové kyseliny, ATP, rostlinné bílkoviny, tuky nebo například chlorofyl. Mezi mikroelementy nalezneme především kovy: nikl (Ni), molybden (Mo), měď (Cu), zinek (Zn), bor (B), železo (Fe) a chlor (Cl) (Campbell et al., 2006).

4.1 Příjem minerálů kořeny

Minerální prvky rostlina přijímá ve formě iontů z půdního roztoku. Většina kationtů (draselné kationty K^+ a amonné kationty NH_4^+) je však přitahována na záporně nabitě části jílu v půdě a nevyskytují se volně v půdním roztoku (Pavlová, 2006). K jejich absorpci rostlina využívá oxid uhličitý, jež se uvolňuje při buněčném dýchání z buněk kořenů dotýkajících se zrnek půdy. CO_2 reaguje s vodou za vzniku slabé kyseliny uhličitě, která se štěpí (disociuje) ve vodném roztoku na H^+ a hydrogenuhličitanový aniont HCO_3^- . Kationt H^+ nahrazuje kationty adsorbované na jílové částice, obdobně působí i HCO_3^- , který se vyměňuje s ostatními anionty. Ionty adsorbované na kořenový povrch se difúzí, iontovou výměnou nebo hromadným tokem s vodou dostávají do buněčných stěn kořenových vlásečnic, odkud jsou následně transportovány do xylému (Luštinec et Žárský, 2003). Přijaté ionty jsou přesouvány ve stejné formě jako byly přijaty nebo se v kořenech přeměňují na formy transportní, k jejichž přenosu se využívá transpirační proud xylémem. Příkladem mohou být dusičnanové ionty, které se po příjmu z vodného roztoku mohou asimilovat již v kořenech nebo se volně přesouvat v nezměněné formě po těle rostliny. S rostoucím příjmem dusičnanů se jejich větší množství ukládá ve vakuolách kořenových buněk a také roste množství transportované do nadzemních částí rostliny, kde může mít signalizační funkci (Pavlová, 2006).

4.2 Dusík

Dusík (N) je jedním z devíti makrobiogenních prvků, které rostlina potřebuje ke správnému růstu. Paradoxně, rostliny mohou velmi často trpět nedostatkem tohoto prvku, i když je jím zemská atmosféra tvořena téměř z 80 %. Toto je způsobeno formou, ve které se plynný dusík v ovzduší vyskytuje. Rostliny totiž nejsou schopny vstřebávat dvouatomové molekuly N_2 , proto přijímají anorganický dusík nejčastěji ve formě dusičnanů (NO_3^-) nebo amonných iontů (NH_4^+). Tyto sloučeniny vznikají v půdě přirozeným rozkladem organických sloučenin. Část dusíku je však činností bakterií přeměněna zpět na molekulový dusík, který je pro rostliny nevyužitelný. Rostliny jsou tak často závislé na činnosti půdních mikroorganismů, které vhodné formy dusíku uvolňují rozkladem organické hmoty nebo fixují plynný dusík (Campbell et al., 2006).

4.2.1 Koloběh dusíku v přírodě

Koloběh dusíku v půdě je vesměs vcelku složitý, na rozdíl od ostatních minerálních živin se na něm podílí půdní organismy a jejich metabolické procesy. Do půdy se dostává z odumřelých těl, exkrementů nebo exudátů rostlin a živočichů (většina dusíku v půdě je uložena právě v organických sloučeninách). Zde dochází k amonifikaci, kdy dusík navázaný v organické sloučenině je půdními mikroorganismy přeměněn na amoniak NH_3 , který se ve vodě rozpouští na amonný kationt NH_4^+ . V této formě může být dusík přijat rostlinou a asimilován, nebo oxidován půdními mikroorganismy za vzniku dusičnanového aniontu NO_3^- (nitrifikace). Nyní může být dusík opět přijat rostlinou nebo přeměněn mikroorganismy na jiné oxidy (NO_x) či N_2 , jež uniká do atmosféry. Procesu, kdy vzniká dvouatomová molekula dusíku se říká denitrifikace (Pavlová, 2005). K dalším ztrátám dusíku z půdy dochází při prudkých deštích nebo zavlažování, kdy jsou záporně nabitě částice, v našem případě NO_3^- , slabě vázány na povrch hlíny a snadno se odplavují (Campbell et al., 2006).

Amonný kationt NH_4^+ působí na neutrální půdu acidifikačními účinky, jelikož při jeho přeměně na nitrát dochází k uvolnění dvou H^+ , které zmenšují pH daného substrátu. Rostliny v půdě s nízkým pH preferují přijímat amonné ionty, které podporují jejich bujný růst. NO_3^- se naopak podílí na alkalizaci půd. Obecně však platí, že rostliny preferují příjem amonných kationtů nad nitráty (Llido et al., 2021). Zemědělské půdy však obsahují větší množství nitrátů než amonných iontů, což je z velké části způsobeno užívanými hnojivy (Kant et al., 2011).

4.2.2 Význam dusíku pro rostlinu

Dusík je součástí aminokyselin, nukleových kyselin, hormonů, koenzymů, amidů, proteinů, chlorofylu a dalších sloučenin (Campbell et al., 2006). Podílí se také na transportu elektronů po rostlině nebo slouží jako katalyzátor chemických reakcí. Podílí se na zdravě zelené barvě listů a podporuje růst vegetativních částí rostlin, stejně jako rozrůstání kořenů. Velké množství dusíku podporuje bujný a rychlý růst, proto největší spotřebu mají klíčící a mladé rostliny, s věkem jeho spotřeba v rostlině klesá. Velký význam se mu udává u hospodářských rostlin, protože zvyšuje kvalitu pěstovaného ovoce, růst listové zeleniny a procento rostlinných proteinů v plodinách určených pro krmení dobytka, jako jsou například píce, jelikož podporuje příjem a zpracování ostatních minerálů z půdy (Leghari et al., 2016).

4.2.3 Asimilace dusíku

Aby rostlina mohla lépe začlenit dusík do svých organických sloučenin, je třeba aby byl v redukované formě amonných iontů NH_4^+ . Pokud je dusík přijímán ve formě nitrátových iontů, je nutná jejich asimilace – redukce. K této reakci může dojít buď přímo v buňkách kořene nebo v listech, kam je neredukovaný nitrát transportován dřevní částí cévního svazku. Pokud rostlina přijme velké množství NO_3^- iontů, uchovává si je ve vakuolách buněk po celém těle rostliny. Přeměna dusičnanového aniontu na amoniak začíná redukcí nitrátu na aniont dusitanový (NO_2^-). V další reakci se NO_2^- asimiluje v plastidech na NH_3 , který následně reaguje s vodou za vzniku NH_4^+ . Amonné kationty jsou pro rostlinu toxické, jelikož omezují funkci membrán, proto jsou ihned zabudovány do organických sloučenin, nejčastěji glutaminu, který se tak stává

základní transportní a zásobní látkou dusíku. Organický dusík se pak po rostlině přemísťuje pomocí floému (Pavlová, 2006).

4.2.4 Příznaky nedostatku dusíku

Jelikož je dusík jedním z esenciálních prvků pro život rostlin, jeho deficience drasticky omezuje růst rostliny, kdy může dojít až k úplnému zastavení růstu. Při dlouhodobém nedostatku starší listy rostliny začínají od středu blednout až úplně zežloutnou (projev chlorózy), někdy dokonce odpadávají (Rustioni et al., 2018). Starší listy nižších pater rychleji stárnou z toho důvodu, že dusík rostlina přesouvá do mladých, rostoucích částí nebo generativních orgánů, aby se jejich růst v důsledku nedostatku nezpomaloval. Toto často vede ke klamnému dojmu, že plody rostlin dozrávají rychleji. Dochází také ke změnám v rozdělení biomasy rostliny do různých orgánů. Biomasa podzemních částí, zejména kořenů, roste rychleji na úkor nadzemních částí. Kořeny zejména rostou do délky a díky tomu efektivněji hledají nové zdroje dusíku, v hlubším profilu půdy se pak začnou větvit (Šmírová, 2020).

4.2.5 Příznaky nadbytku dusíku

Ačkoliv rostliny potřebují dusík v relativně velkém množství, při velkých koncentracích dochází k asimilačním poruchám. Vrchní listy takových rostlin mají temně zelenou až namodralou barvu, zatímco spodní listy často vadnou z nedostatku světla, dochází tedy ke zpomalení fotosyntézy. Stonky a listy mají nesprávně vyvinutá mechanická pletiva, ta jsou řídká a slabá, kvůli čemuž bývají rostliny poléhavé a křehké. Dřevnaté stonky zase velmi špatně dozrávají, a tudíž hůře odolávají mrazu. Rostliny žijící v nadbytku dusíku tak bývají snadným cílem pro různé druhy parazitických organismů a chorob (Šafaříková, 2014). Při vysokých koncentracích dusičnanů v rostlině a okolí se v rostlinných buňkách začnou hromadit dusitany (NO_2^-), které v kombinaci s molekulami kyslíku tvoří sloučeninu pro rostlinu toxickou (Chen et al., 2004).

4.2.6 Krátkodobé změny dostupnosti dusíku

Rostliny v prostředí, které neobsahuje žádný dusík, začínají negativně reagovat již v průběhu dvou dnů. Během těchto 48 hodin dochází ke zpomalování procesů, jako je například transpirace ve starších listech. Rostlina tudíž nedokáže přijímat tolik atmosférického oxidu uhličitého, což v ní omezuje průběh fotosyntézy (mladé listy naopak více transpirují i fotosyntetizují), a rostlina tak není schopna vyrábět dostatek látek potřebných pro aktivní růst. Škrob a jiné zásobní látky se přesouvají pomocí floému do kořenů, které začínají aktivně růst do hloubky ve snaze najít potřebný dusík. S přerušением transpirace též klesá turgor ve svěracích buňkách, rostlina tedy v tomto okamžiku odpařuje pouze malé množství nastřádané vody. S minimální úrovní transpirace též souvisí téměř úplné zastavení transpiračního proudu. V cévách není dostatečný podtlak, který by podporoval příjem půdního roztoku s minerálními látkami kořenovým systémem. V xylému tedy dochází k poklesu koncentrace iontů, včetně NO_3^- .

Pokud rostlina nepřijímá dusíkaté sloučeniny ze svého okolí, může využít k růstu dusík uložený v různých formách ve svých pletivech. V porovnání s rostlinou v optimálním prostředí bude mít tedy stejně stará rostlina bez přístupu k dusíku po několik dní menší hmotnost. Ačkoliv má rostlina v optimálním prostředí zásoby dusíku na jeden celý den, rostliny ve dvoudenní deficienci spotřebují pouze 60 % uskladněného dusíku. Ze starých listů se v takovém případě začíná uvolňovat (mobilizovat) dusík navázaný v organických sloučeninách a z kořenů zase dusík ve formě aniontu dusičnanového NO_3^- . Tento dusík rostlina využívá zejména pro růst mladých listů a kořenového systému (Chapin et al., 1988).

5 STRES ROSTLIN

Rostlina je ve stresu, pokud na ní působí nepříznivé podmínky okolí tzv. stresory neboli stresové faktory. Nejenže stresory negativně ovlivňují metabolické procesy rostliny, respektive je zpomalují, ale navíc mohou způsobit poškození jednotlivých rostlinných orgánů. V krajních případech mohou také způsobit úmrtí rostliny. Stresu jsou rostliny vystaveny po celý svůj život kvůli proměnlivým podmínkám svého okolí. Díky adaptacím rostlin na různá stanoviště je odezva na konkrétní stres velmi odlišná mezi jednotlivými druhy rostlin (Procházka et al., 1998). Mezi tyto rozdíly patří například rychlost fotosyntézy, příjmu živin kořeny, růstu, citlivost na některé hormony (kyselina abscisová, cytokininy) nebo schopnost skladovat minerální látky v pletivech. Rostliny uzpůsobené k určitým podmínkám prostředí např.: na život v suchých oblastech a v půdách chudých na živiny, budou velmi pomalu růst i v optimálních podmínkách, neboť si vyvinuly větší odolnost vůči určitým stresovým faktorům. Tato vlastnost však omezuje jejich schopnost maximálně využít živiny pro rychlý růst v půdách na ně bohaté, a tudíž rostou přirozeně pomaleji než jiné druhy, méně odolné ke stresu. Avšak i takto specializované rostliny budou reagovat stejným způsobem na vnější stresory jako rostliny zvyklé na život v méně náročném prostředí (Chapin, 1991).

Stresové faktory rozdělujeme podle toho, kdo daný stres vyvolává. Pokud rostlinu ovlivňují přírodní podmínky, fyzické nebo chemické, mluvíme o stresu abiotickém. Stres vyvolaný živými organismy (bakteriemi, houbami, hmyzem či živočichy) nazýváme stres biotický (Bolaji Umar, 2022).

5.1 Prvotní reakce na deficienci dusíku

Předpokládá se, že rostliny dokáží reagovat na svou vnitřní koncentraci dusíku pomocí receptorů, speciálních proteinů, které snímají koncentraci glutaminu (případně aminokyselin). Glutamin je organická sloučenina sloužící k uchování asimilovaného dusíku a k jeho přenosu po těle rostliny. Pokud je jeho koncentrace vysoká, rostliny regulují příjem energeticky náročných forem dusíku, jako je aniont dusičnanový (Gent et Forde, 2017). Jako první na nízkou koncentraci dusíku zareagují podzemní části rostliny, které začnou okamžitě růst do hloubky. Dále se rostlině zpomalí metabolické procesy včetně fotosyntézy. Nicméně příjem a asimilace dusíku není nijak omezena. V rostlině jsou zatím aktivní pouze geny zodpovídající za prvotní univerzální reakce na daný stres, jiné geny odpovídající za reakci rostliny na stresovou situaci zůstávají neaktivní (Lian et al., 2006). Až po spotřebování vnitřních zásob se začnou projevovat pozorovatelné změny v nadzemních částech rostliny jako je chloróza, opadávání starších listů nebo předčasné dozrávání plodů. Kdyby rostlina nedokázala hlídat svou vnitřní koncentraci dusíku, mnohem rychleji by došlo k jeho spotřebování ve chvíli, kdy ho přestanou kořeny přijímat, což by mohlo vést k předčasnému úhynu rostliny.

6 SIGNALIZAČNÍ FUNKCE DUSIČNANŮ

Jak již víme, dusík je esenciálním prvkem pro správný růst. Dusík ve formě dusičnanového aniontu může navíc působit v rostlině jako signální molekula. Přerušuje například dormanci semen, podporuje růst listů a reguluje tvorbu a růst laterálních (postranních) kořenů. Pomáhá také regulovat expresi genů souvisejících s metabolismem dusičnanů v rostlině (příjem, asimilace), čemuž se jinak také říká primární reakce na nitráty (primary nitrate response) (Krapp, 2014).

6.1 Primární reakce na nitráty

Dusičnany regulují syntézu mnoha proteinů, které rostliny potřebují pro jejich využití, příkladem mohou být proteiny potřebné k jejich transportu rostlinou nebo jejich asimilaci na amoniak. Regulace těchto proteinů probíhá velmi rychle, výsledky jsou pozorovatelné již během několika minut (3–9 minut). Předpokládá se, že reakce vyvolané dusičnany jsou následně ovlivněny i ostatními signálními molekulami, jakými jsou třeba hormony. Mnoho o procesech, jež probíhají v rámci signalizace nitrátů, bohužel nevíme a je potřeba dalších studií (Krapp, 2014).

6.2 Receptory

Podobně jako zvířata i rostliny mají ve svých buňkách receptory, kterými dokáží vnímat a přenášet biochemické informace pomocí proteinů do svého jádra, kde dochází k odezvě v expresi genů. Také dusičnany jsou rozpoznávány buněčnými receptory. Některé z nich jsou už známé, ale mnoho mechanismů je stále nejasných (Krapp, 2014). Když se NO_3^- dostane do buňky, zareaguje na jeho přítomnost hned několik genů, které vyvolají další reakci v buňce. Příkladem je protein NRT1.1, který se nachází ve svěracích buňkách průduchů a laterálních kořenech. Pokud se tento protein setká s dusičnanovými ionty spustí se reakce, která vyústí v navýšení vápenatých iontů v cytoplazmě dané buňky. Zvýšená koncentrace vápníku se pak stává signálem pro další geny reagující na dostupnost NO_3^- . V kořenech tak například rostlina dostává informace, jaká je koncentrace nitrátů kolem nich. (O'Brian et al., 2016).

PRAKTICKÁ ČÁST

7 METODY

7.1 Rostlinný materiál a jeho kultivace

Během experimentů byly použity rostliny hrachu setého (*Pisum sativum*), pěstované v hypotonickém prostředí. Sterilizování semen proběhlo namočením do zředěného roztoku Savo Original[®] a destilované vody v poměru 1 : 4, kde setrvala po dobu 4 hodin a poté byla přesunuta do roztoku obsahujícího pouze destilovanou vodu. Aby nedošlo ke kontaminaci patogeny, bylo nutné využít sterilní nástroje. Následně semena 12 hodin bobtnala, než byla přenesena sterilním vybavením na tál s navlhčenou vrstvou buněčné vaty a filtračního papíru. Zabalená v igelitovém pytli se ponechala 5 až 7 dnů klíčit při pokojové teplotě. Ve skleníku s řízenou teplotou a osvětlením byly pak mladé klíčky přesunuty do vany s perlitem a destilovanou vodou. Užívání sterilních prostředků bylo velmi důležité, neboť jakýkoliv kontakt mohl být příčinou vzniku infekce, především plísní.

Jakmile nadzemní části klíčků měřily okolo tří centimetrů, byly přesunuty do hydroponických van, kde byly uchyceny do pěnových zátek, jež se umístily nad původní semeno hrachu. Pro kultivaci byl použit dvojnásobně koncentrovaný Hoaglandův roztok, který byl měněn každý týden a byl připravován ze zásobních koncentrátů označených A až E. Aby nedocházelo k vysrážení solí živin, byly zásobní roztoky přilévány do nádoby s půl litrem destilované vody, ta byla následně doplněna na potřebný objem opět destilovanou vodou. Vany s rostlinami byly také provzdušňovány, aby kořeny rostlin netrpěly nedostatkem kyslíku. Po dvou týdnech byly rostliny připevněny pomocí gumiček ke dřevěným špejlím, které byly upevněny vedle rostliny v pěnové zátce, aby se zamezilo mechanickému poškození při manipulaci.

Během kultivace byly rostliny několikrát ošetřeny postřikem proti plísním, především proti padlí hrachu (*Erysiphe pisi*), které bylo příčinou několika nepovedených pokusů. Postřik byl prováděn dva až tři týdny před zahájením experimentů, aby nedošlo ke zkreslení výsledků.

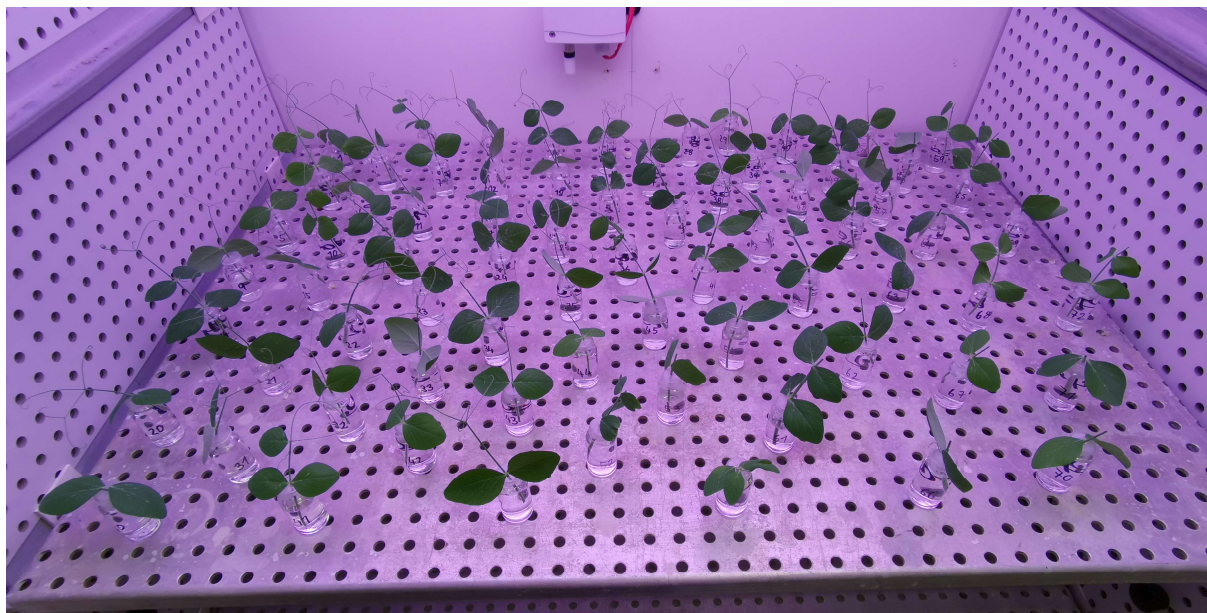
Dva dny před zahájením experimentu byly vany s rostlinami ve stáří 3 až 4 týdnů přemístěny do klimaboxu s řízenými podmínkami, aby se aklimatizovaly. Současně byl v experimentálních vanách vyměněn roztok a část rostlin pak rostla v roztoku bez dusíku po dobu jednoho (varianta D1) a dvou dnů (varianta D2); rostliny s plným živným roztokem sloužily jako kontrolní. Teplota byla nastavena na 24 °C ve dne a 20 °C v noci, při ozáření 370 až 380 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ s fotoperiodou 16 hodin ve dne a 8 hodin v noci a vlhkostí vzduchu 60 %.

7.2 Měření rychlosti transpirace

Před začátkem experimentu byly rostliny zkontrolovány a jedinci poškození herbivory byly vyřazeny stejně jako mechanicky poškozené rostliny. Z experimentálních rostlin hrachu vystavených deficienci jeden nebo dva dny byly ve tmavé místnosti postupně odřezány jednotlivé listy a ty byly následně vloženy do připravených lahvíček naplněných přefiltrovaným

fosfátovým pufrům s pH 6, jež napodoboval xylémovou šťávu v rostlině. Použitý pufr měl různé koncentrace nitrátů: 0; 0,5; 1 a 4 mM.

Každý vzorek byl před vložením do klimaboxu zvážen, další vážení probíhalo vždy po jedné hodině a celkem pětkrát. Po posledním měření byly zbylé celé rostliny ekologicky zlikvidovány. Sledované listy byly následně vloženy do průhledných plastových složek a oskenovány v programu pro analýzu obrazu ImageJ. Na základě výpočtů programu byla zjištěna listová plocha. Z naměřených hodnot byla poté vypočítána hodnota transpirace mezi jednotlivými měřeními.



Obrázek č. 1: Oddělené listy v klimaboxu při měření transpirace. Foto autor

7.3 Analýza obsahu dusičnanů v listech

Po dokončení měření transpirace byly jednotlivé listy hrachu rozstříhány na malé čtverečky o velikosti zhruba 1 mm^2 a vloženy do přichystaných očíslovaných mikrozkušavek o objemu 1,5 ml po 100 mg. Takto přichystané byly uloženy při teplotě $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ či nižší do doby zpracování nebo byly zpracovány ihned po měření transpirace.

Do mikrozkušavek se vzorky byl přidán 1 ml horké destilované vody, následně se mikrozkušavka protřepala na třepačce, aby byly všechny části listů uvnitř ponořeny pod hladinou. Poté se takové mikrozkušavky nechaly inkubovat 30 minut v termobloku při teplotě $95,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Po vytažení a zchladnutí, byly vzorky centrifugovány na 10 000 rpm 10 minut. Takto vyčištěná část extraktu, zhruba 10 μl , byla přepipetována do nové mikrozkušavky. Zbylý extrakt byl ponechán na opakované měření v mrazničce.

Před samotným měřením obsahu nitrátů ve vzorcích bylo nutné sestavit kalibrační křivku. Vzhledem k malé koncentraci dusíku v rostlinách hrachu, jež se pohybuje v řádech mM, byla křivka sestavena z následujících hodnot: 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 mM NO_3^- . Zásobní

roztok byl vyroben rozpuštěním 0,68 g NaNO_3 v 1 litru destilované vody, vzniklý roztok měl koncentraci dusičnanových iontů 8 mM. Následným ředěním byly získány předepsané koncentrace.

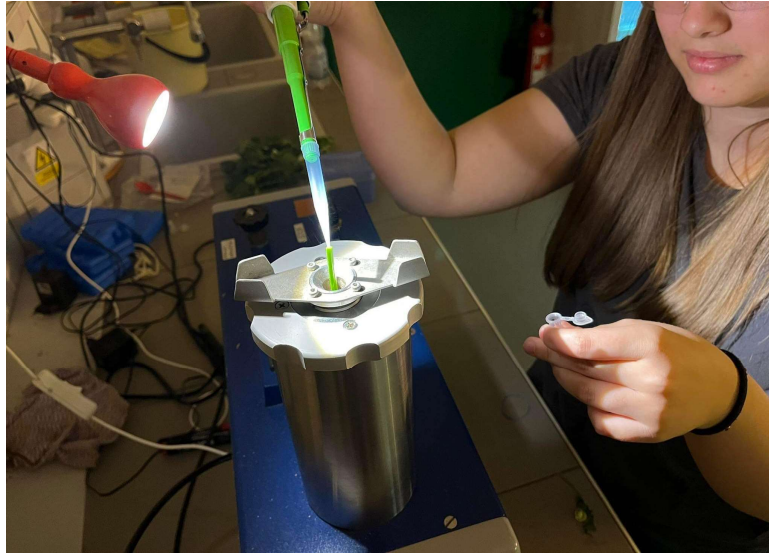
K provedení reakce bylo nutné ke vzorkům nebo standardu přidat dvě činidla, A a B. Činidlo A byla koncentrovaná kyselina sírová, které se k 10 μl vzorku přidalo 40 μl . Následně se mikrozkušavky s činidlem A vložily do centrifugy na rychlé zatočení, aby se spojily případné kapičky roztoků ulpívající na stěnách zkumavky a roztok řádně zreagoval. Mikrozkušavky byly následně postaveny do stojanu a nechaly se inkubovat 20 minut ve tmě. Poté byl ke vzorkům přidán 1 ml činidla B, což byl koncentrovaný roztok hydroxidu sodného. Činidla mezi sebou vyvolala exotermickou reakci, proto se vzorek musel nechat před dalším použitím opět zchladnout.

Po skončení reakce bylo již možné vzorky přelit do jednorázových plastových kyvet a měřit jejich absorbanci na spektrofotometru (SPECORD 205) při vlnové délce 410 nm.

Na základě naměřených hodnot spektrofotometru a hmotnosti navážky bylo možné podle kalibrační rovnice vypočítat koncentrace nitrátů pro každý vzorek.

Aby nedošlo k nečekanému otevření mikrozkušavky a ztrátám na objemu, byly při zahřívání vzorků v termobloku použity barevné chrániče. Zároveň se jednotlivé mikrozkušavky s různě barevnými chrániči daly snadno rozpoznat, což usnadnilo rozlišení jednotlivých sad vzorků od sebe.

Pro zjištění množství nitrátu transportovaného z kořenů do listů byla z celých rostlin odebrána xylémová šťáva pomocí tlakové komory (3005 Plant Water Status Console, Soil Moisture Equipment Corp., Santa Barbara, USA). Nadzemní část rostliny 10–15 cm dlouhá byla zešikma odříznuta ostrou žiletkou. Část rostliny se pak dobře upevnila a utěsnila v tlakové komoře tak, že jen část stonku s řeznou plochou vyčnívala mimo nádobu. Do komory se následně začal vpouštět vzduch, čímž se zvyšoval tlak kolem rostliny, který způsobil vytlačení rostlinných šťáv. První kapka se odsála pryč, jelikož mohla obsahovat zbytky rozřizlých buněk, než se začalo s odběrem pipetou. Minimální množství potřebné pro provedení analýzy nitrátu je 10 μl , vždy bylo však odebráno více, aby mohlo být případně provedeno opakované měření. Stanovení obsahu dusíku v xylémové šťávě se provádělo dle postupu výše.



Obrázek č. 2: Odběr xylémové šťávy pomocí tlakové komory. Foto Alžběta Floriánová

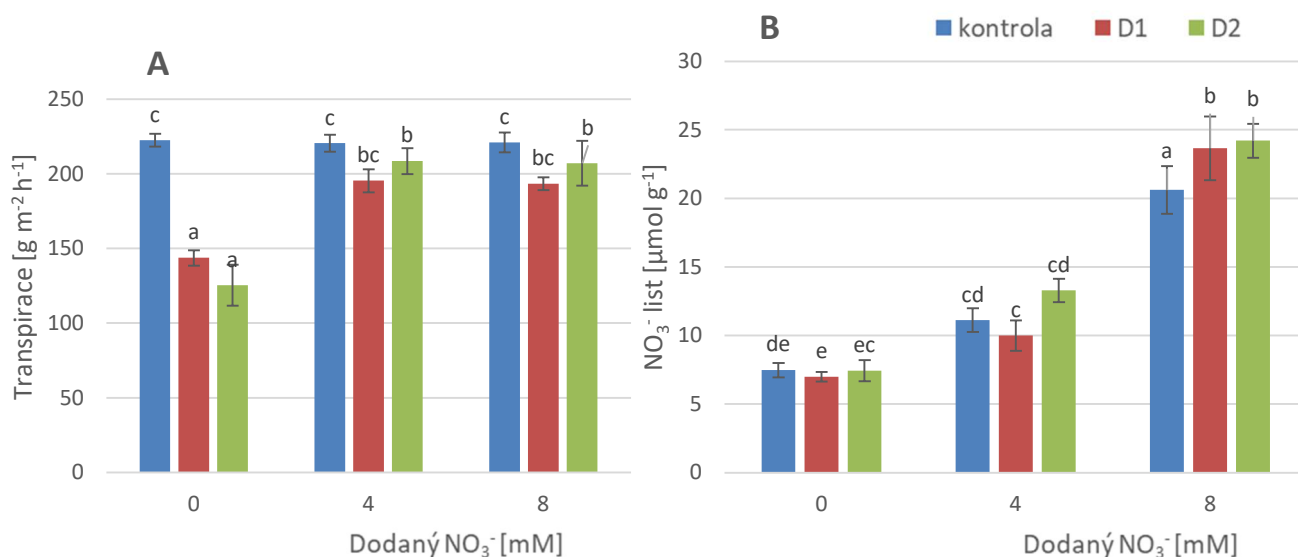
8 VÝSLEDKY

Experimenty na rostlinách hrachu setého byly prováděny od května 2022 do září 2022 a navazovaly na experimenty na celých rostlinách provedené v roce 2021, jejichž výsledky jsou uvedené v diplomové práci A. Floriánové (2023). Pro tuto práci je důležitý poznatek, že celé rostliny hrachu reagují na deficienci dusíku již během 24 hodin snížením transpirace a koncentrace dusíku v pletivech.

8.1 Experimenty na oddělených listech rostlin hrachu

8.1.1 Experiment 1

S pokusnými rostlinami se pracovalo od 16. 5. 2022 do 18. 5. 2022

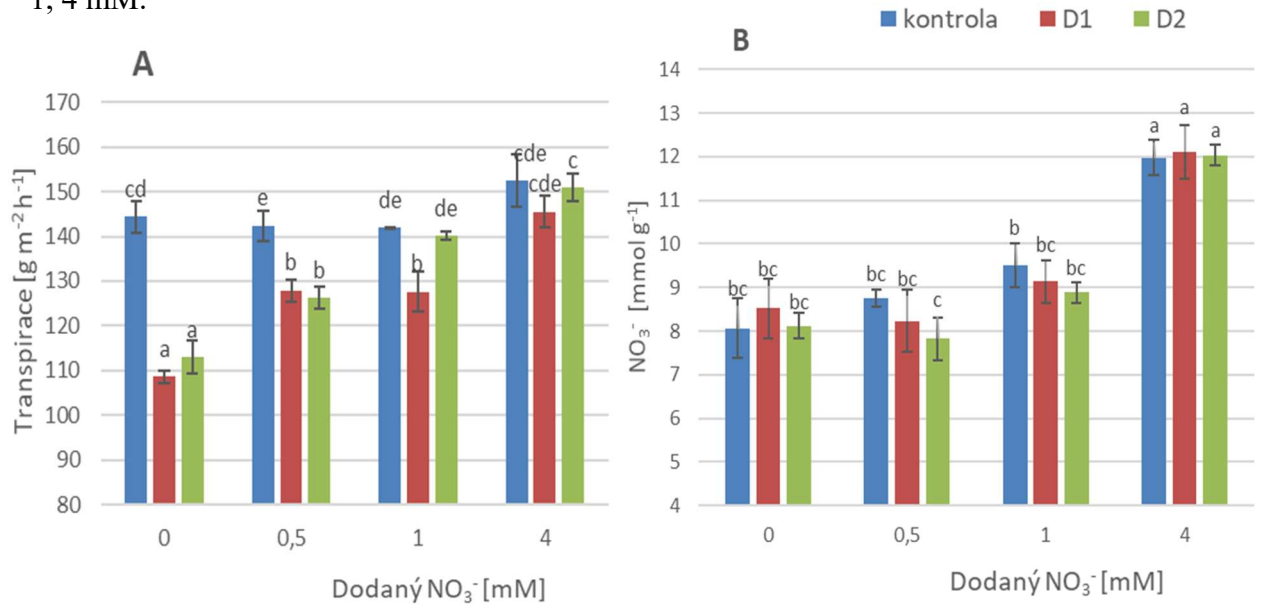


Obrázek č. 3: (A) Maximální transpirace. (B) Koncentrace dusičnanových aniontů v listech, které transpirovaly dle grafu A. (kontrola) rostliny byly po celou dobu před odříznutím listů v plném živném médiu, (D1) rostliny vystavené deficienci dusíku po 24 h, (D2) rostliny vystavené deficienci dusíku po 48 h. Různá písmena označují statisticky významný při rozdíl $\alpha = 0,05$, chybové úsečky \pm SD, $n = 4-6$.

Před dodáním dusičnanů deficientním rostlinám mají tyto vzorky (D1, D2) výrazně nižší hodnotu transpirace než rostliny kontrolní (Obrázek č. 3 A). Po dodání 4 mM i 8 mM se jejich transpirace navýší téměř na úroveň maximální transpirace kontroly. Obsah dusičnanových iontů se mezi rostlinami deficientními a kontrolními neliší, avšak s vyšší koncentrací dodaných dusičnanů naroste i jejich koncentrace v listech (Obrázek č. 3 B).

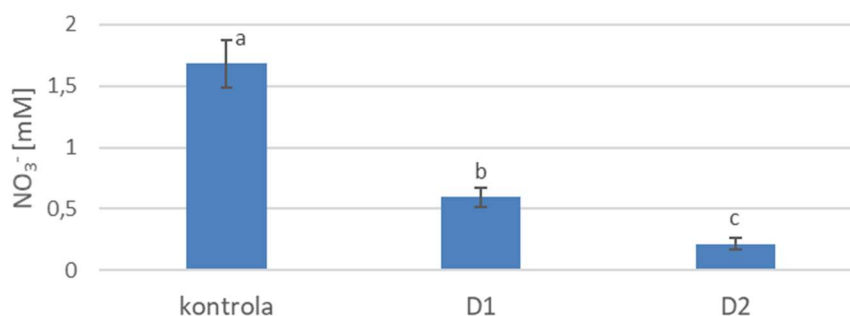
8.1.2 Experiment 2

S pokusnými rostlinami se pracovalo od 23. 7. do 25. 7. 2022. Na základě výsledků z experimentu 1 byla snížena dodávaná koncentrace dusičnanů v inkubačním roztoku na 0, 0,5, 1, 4 mM.



Obrázek č. 4: (A) Maximální transpirace. (B) Koncentrace dusičnanových aniontů v listech, které transpirovaly dle grafu A. (kontrola) rostliny byly po celou dobu před odříznutím listů v plném živném médiu, (D1) rostliny vystavené deficienci dusíku po 24 h, (D2) rostliny vystavené deficienci dusíku po 48 h. Různá písmena označují statisticky významný při rozdíl $\alpha = 0,05$, chybové úsečky \pm SD, $n = 4-6$.

Rostliny s deficiencí dusíku (D1, D2) mají výrazně nižší rychlost transpirace v porovnání s kontrolou v roztoku bez přidaného nitrátu. Na rozdíl od deficientních rostlin se rychlost transpirace kontrolních rostlin s koncentrací N příliš neměnila, u listů s nedostatkem dusíku měla však účinek už koncentrace 0,5 mM, s rostoucí koncentrací se pak zvyšovala i rychlost transpirace nezávisle na době deficience (Obrázek č. 4 A). Hodnoty koncentrace dusíku v listech se při dodání 0, 0,5 a 1 mM se příliš nelišily, velký nárůst je patrný až u listů v koncentraci o 4 mM (Obrázek č. 4 B).

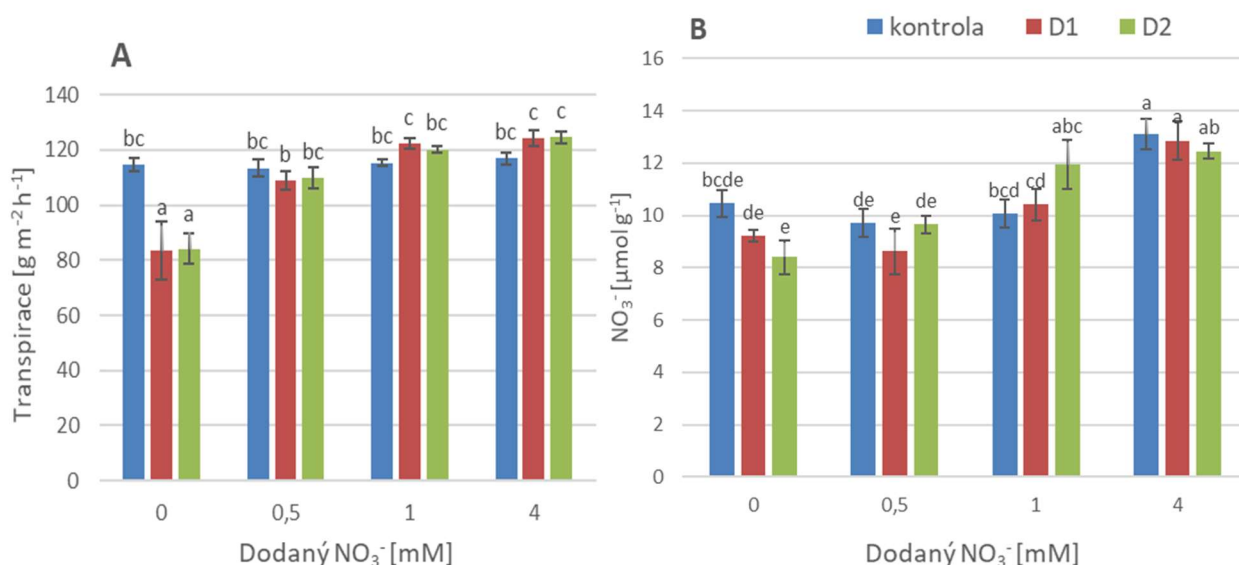


Obrázek č. 5: Obsah nitrátů v xylémové šťávě celých pokusných rostlin. (kontrola) rostliny byly po celou dobu v plném živném roztoku, (D1) rostliny vystavené deficienci dusíku po dobu 24 h, (D2) rostliny vystavené deficienci dusíku po dobu 48 h. Různá písmena označují statisticky významný při rozdíl $\alpha = 0,05$, chybové úsečky \pm SD, $n = 4-6$.

Pro kontrolu byla změřena koncentrace dusičnanových aniontů i v celých rostlinách po skončení měření transpirace jejich listů. Nestresované rostliny si udržely koncentraci dusíku kolem 1,5 mM, u rostlin v deficienci je pozorovatelný pozvolný pokles.

8.1.3 Experiment 3

S pokusnými rostlinami se pracovalo od 12. 9. do 14. 9. 2022. Experiment byl opět zaměřen na reakci listů po znovuobnovení dusíku.



Obrázek č. 6: (A) Maximální transpirace. (B) Koncentrace dusičnanových aniontů v listech, které transpirovaly dle grafu A. (kontrola) rostliny byly po celou dobu před odříznutím listů v plném živném médiu, (D1) rostliny vystavené deficienci dusíku po 24 h, (D2) rostliny vystavené deficienci dusíku po 48 h. Různá písmena označují statisticky významný při rozdíl $\alpha = 0,05$, chybové úsečky \pm SD, $n = 4-6$.

V porovnání s experimentem 2, deficientní rostliny měly stejnou úroveň transpirace jako kontrolní rostliny již v koncentraci dusíku 0,5 mM (Obrázek č. 6 A). Dále je také vidět, že tato koncentrace měla vliv na konečný obsah nitrátů v listech rostlin ve dvoudenní deficienci (D2), což se značně liší od předchozího experimentu (Obrázek č. 4 B).

9 DISKUZE

Transpirace u rostlin má svoji denní dynamiku s maximem většinou v dopoledních hodinách nebo kolem poledne, což bylo dobře pozorovatelné během vážení rostlin. Většina experimentů byla zahájena kolem 8. hodiny ráno a maximální hodnoty se objevovaly ke 12. hodině. U experimentů, které byly započaty kolem 9. hodiny ráno, se maximální hodnoty také objevily kolem poledne a hodnoty z následujících měření byly výrazně nižší. Pro srovnání variant s různými stupni deficience je důležité porovnávat hodnoty, které jsou rostliny maximálně schopné dosáhnout. Většina testovaných listů dosahovala maximální transpirace kolem $140 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ v prvním experimentu a $120 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ během druhého. Tento rozdíl si můžeme vysvětlit změnou roční doby, nestálými podmínkami v laboratoři (klimatizace, větrání) nebo tím, že rostliny byly při experimentech v mírně odlišných stádiích vývoje (některé jen vegetativně rostly, jiné již měly vyvinuté generativní orgány).

Tyto experimenty vycházely z práce Chapina, Waltera a Clarksona (1988), kde rostlinám ječmene a rajčat zatahali přísun dusíku a 2., 5. a 10. den měřili koncentraci různých látek a také sledovali růst orgánů rostlin. Tímto pokusem dokázali, že rostliny reagují na deficienci dusíku již během 48 hodin snížením transpirace. Avšak nebylo jisté, jestli rostliny nereagují ještě dříve a jim se to pouze nepodařilo odhalit. Z výsledků této práce opakovaně vyplývá, že rostliny na nedostatek dusíku reagují již v průběhu 24 hodin snížením transpirace a zmenšenou koncentrací nitrátů v listech, což je nejspíš způsobeno zpomaleným transportem z kořenů, jak naznačují výsledky analýz nitrátů xylémové šťávy. Zásoby volných dusičnanů v kořenech tedy nestačily pro udržení stálého transportu dusičnanových aniontů do listů po omezení příjmu z média. Schopnost rostliny tlumit kolísání dostupnosti dusíku v prostředí je tedy omezená na tak krátkou dobu jako je 1 den. Jde o zajímavé zjištění, jelikož se uvádí, že rostliny ze svých kořenů dokáží čerpat dusík po dobu až dvou dnů bez velkého omezení svého růstu. Poté jeho transport klesá a začíná se uvolňovat z rozkládajících se sloučenin rostliny například chlorofylu nebo nukleových kyselin (Richard-Molard et al., 2008).

Pokles obsahu nitrátu v listech také naznačuje, že se jejich asimilace v listech v této stresové situaci nezpomalila, nebo alespoň výrazně méně než rychlost transportu z kořenů. Nicméně tuto domněnku nebylo možné během pokusů zcela potvrdit, každopádně souhlasí s hypotézou, že rostliny rozdělují nitráty do dvou různých míst v buňkách listů. V cytoplazmě buněk se mohou ihned asimilovat, avšak z druhého místa (vakuoly) se uvolňují pomaleji. Až při působení světla se takto uskladněné dusičnanové anionty přesouvají do místa asimilace v cytoplazmě (Granstedt et Huffaker, 1982). Pokusné rostliny byly každý den vystaveny stejné úrovni fotosyntetického záření, tudíž jejich rychlost asimilace zůstala také konstantní, ale přísun dusíku z kořenů ubýval, což by mohlo vysvětlovat pokles koncentrace v biomase listů po jednom nebo dvou dnech deficience.

V práci jsem dále otestovala hypotézu, že množství dusičnanů v listech ovlivňuje otevřenost průduchů a tím také rychlost transpirace, která vyplynula z experimentů na celých rostlinách viz práce A. Floriánová (2023). Pro zjednodušení a podrobném prozkoumání jsem využila pokusy na oddělených listech – tím se vyloučil vliv všech procesů probíhajících v kořenech

a souvisejících s dostupností nitrátů (např. asimilace, syntéza hormonů, transport apod.). Z výsledků experimentů se ukázalo, že oddělené listy reagovaly totožně s celými nepoškozenými rostlinami, tj. transpirace i obsah nitrátů zůstal snížený u listů deficientních rostlin i po odříznutí, oproti listům kontrolních rostlin plně zásobených dusičnany.

Dále bylo dokázáno, že po přidání NO_3^- do vodivého pletiva řapíků listů se zvýšila jejich transpirace. Tento zjištěný efekt nebyl v minulosti ještě u listů pozorován. Z dat také vyplývá, že listy rostlin po jednodenní i dvoudenní deficienci reagovaly na dodání dusičnanů obdobně, rychlost jejich maximální transpirace se výrazně nelišila. Listy deficientních rostlin také reagovaly na poměrně malé koncentrace dusičnanů (0,5 mM), avšak nepodařilo se mi prokázat koncentrační závislost reakce. Použité koncentrace dusičnanů byly z těchto důvodů výrazně sníženy ve druhém experimentu. I v tomto případě však všechny použité koncentrace zřejmě stimulovaly rychlost transpirace maximálně, byly tedy nejspíš stále příliš vysoké.

Z výsledků mé práce vyplývá zajímavá otázka; jaký je přesný mechanismus, kterým dochází ke zrychlení transpirace v listech? Jedním vysvětlením může být, že nitráty slouží ve svěracích buňkách jako důležité osmotikum, a tím pomáhají udržet jejich otevřenost. Dusičnanové anionty by tak mohly sloužit jako protiiont draselných kationtů, které jsou do svěracích buněk přemísťovány díky reakci draselných pump na světlo. Obvykle se draselné kationty váží na anionty chloridové, existují však domněnky, že při malé koncentraci chloru se volné kationty váží také na nitráty, čímž stabilizují pH ve svěracích buňkách průduchů, které se následně otevírají (Guo et al., 2003). Alternativním vysvětlením by mohlo být působení nitrátových iontů na propustnost buněčných membrán pro vodu prostřednictvím svého vlivu na aktivitu akvaporinů – transportních míst, kudy molekuly vody procházejí přes membrány buněk. Tento efekt byl v minulosti pozorován u buněk v kořenech rostlin (Li et al., 2016). Zrychlení transportu vody přes buňky listového mezofylu může následně usnadnit transport vody potřebné pro zvýšení tlaku ve svěracích buňkách průduchů při jejich otevření. Prověření uvedených hypotéz je tedy velmi zajímavé téma pro vědecký výzkum v budoucnosti.

10 ZÁVĚRY

Během všech experimentů bylo dokázáno, že rostliny reagovaly na nedostatek dusíku v kultivačním médiu zpomalením transpirace.

Výsledky všech experimentů statisticky prokázaly, že rostlina reaguje na odebrání dusíku v médiu zpomalením transpirace již v průběhu 24 hodin, což je rychleji, než bylo dosud známo.

Jednoznačně se ukázalo, že snížení rychlosti transpirace souvisí s poklesem obsahu dusičnanů v pletivech listů, který je zřejmě důsledkem zpomalení transportu dusičnanů z kořenů xylémovou šťávou.

Zpomalená transpirace listů deficientních rostlin se po dodání dusičnanů přes odříznuté řapíky vrátila na úroveň listů kontrolních rostlin a reakce byla patrná i u nízkých koncentrací – běžně se vyskytujících u neporušených rostlin. Funkční závislost mezi dodanou koncentrací dusičnanů a rychlostí transpirace se však prokázat nepodařilo.

Dusičnanové ionty se tedy v listech zřejmě podílí na regulaci rychlosti transpirace rostlin. Dalším důležitým krokem výzkumu bude zjistit, jestli je jejich působení přímé nebo je podmíněné jejich asimilací v buňkách listu.

11 POUŽITÁ LITERATURA

ARAUS, Viviana, Joseph SWIFT, Jose M ALVAREZ, Amelia HENRY, Gloria M CORUZZI a Guohua XU. A balancing act: how plants integrate nitrogen and water signals. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2020, **71**(15), 4442-4451 [cit. 2022-11-19]. ISSN 0022-0957. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/eraa054

BENEŠOVÁ, Marika. *Odmaturuj! z biologie. 2.*, přeprac. vyd. Brno: Didaktis, c2013. Odmaturuj!. ISBN 978-80-7358-231-9.

BOLAJI UMAR, Olayinka, Lawal AMUDALAT RANTI, Abdulkaki SHEHU ABDULBAKI, Abdulra'uf LUKMAN BOLA, Abdulkareem KHADIJAT ABDULHAMID, Murtadha RAMAT BIOLA a Kayode OLUWAGBENGA VICTOR. Stresses in Plants: Biotic and Abiotic. In: ANSARI, Mahmood-ur-Rahman, ed. *Current Trends in Wheat Research* [online]. IntechOpen, 2022, 2022-5-11 [cit. 2022-12-10]. ISBN 978-1-83968-593-4. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.100501

CAMPBELL, Neil A. a Jane B. REECE. *Biologie*. Brno: Computer Press, c2006. ISBN 80-251-1178-4.

FLORIÁNOVÁ, Alžběta. *Význam hormonální signalizace v časné reakci rostlin na změny dostupnosti dusíku* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-01-22]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/t6t42/>. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce doc. RNDr. Vít Gloser, Ph. D.

GENT, Lucas, FORDE, Brian G. How do plants sense their nitrogen status?, *Journal of Experimental Botany*, Volume 68, Issue 10, 1 May 2017, Pages 2531–2539, <https://doi.org/10.1093/jxb/erx013>

GLOSER, Jan. *Fyziologie rostlin*. Brno: Masarykova univerzita, 1998. ISBN: 80-210-1789-9

GONZALEZ-DUGO, Victoria, Jean-Louis DURAND a François GASTAL. Water deficit and nitrogen nutrition of crops. A review. *Agronomy for Sustainable Development* [online]. 2010, **30**(3), 529-544 [cit. 2022-11-19]. ISSN 1774-0746. Dostupné z: doi:10.1051/agro/2009059

GRANSTEDT, Robert C. a Ray C. HUFFAKER. Identification of the Leaf Vacuole as a Major Nitrate Storage Pool. *Plant Physiology* [online]. 1982, **70**(2), 410-413 [cit. 2023-01-22]. ISSN 0032-0889. Dostupné z: doi:10.1104/pp.70.2.410

GUO, Fang-Qing, Jared YOUNG a Nigel M. CRAWFORD. The Nitrate Transporter AtNRT1.1 (CHL1) Functions in Stomatal Opening and Contributes to Drought Susceptibility in Arabidopsis. *The Plant Cell* [online]. 2003, **15**(1), 107-117 [cit. 2023-01-22]. ISSN 1040-4651. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.006312

CHAPIN, F. Stuart, Colin H. S. WALTER a David T. CLARKSON. Growth response of barley and tomato to nitrogen stress and its control by abscisic acid, water relations and photosynthesis.

Planta [online]. 1988, **173**(3), 352-366 [cit. 2022-12-02]. ISSN 0032-0935. Dostupné z: doi:10.1007/BF00401022

CHAPIN, F. Stuart. Integrated Responses of Plants to Stress. *BioScience* [online]. 1991, **41**(1), 29-36 [cit. 2022-12-10]. ISSN 00063568. Dostupné z: doi:10.2307/1311538

CHEN, Bao-Ming, Zhao-Hui WANG, Sheng-Xiu LI, Gen-Xuan WANG, Hai-Xing SONG a Xi-Na WANG. Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. *Plant Science* [online]. 2004, **167**(3), 635-643 [cit. 2022-11-18]. ISSN 01689452. Dostupné z: doi:10.1016/j.plantsci.2004.05.015

KANT, Surya, BI, Yong-Mei, ROTHSTEIN, Steven J. Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency, *Journal of Experimental Botany*, Volume 62, Issue 4, February 2011, Pages 1499–1509, <https://doi.org/10.1093/jxb/erq297>

KRAPP, Anne, Laure C. DAVID, Camille CHARDIN, et al. Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2014, **65**(3), 789-798 [cit. 2022-12-11]. ISSN 1460-2431. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/eru001

LEGHARI, Shan Jahan, Niaz Ahmed WAHOCHO, Ghulam Mustafa LAGHARI, Abdul HAFEEZLAGHARI, Ghulam MUSTAFABHABHAN, Khalid HUSSAINTALPUR, Tofique Ahmed BHUTTO, Safdar Ali WAHOCHO a Ayaz Ahmed LASHARI. "Role of nitrogen for plant growth and development: a review." *Advances in Environmental Biology* [online]. 2016, **10**(9) 209-218. *Gale Academic OneFile* [cit. 2022-11-18]. ISSN: 1995-0756. Dostupné z: <https://link.gale.com/apps/doc/A472372583/AONE?u=anon~c82a83ac&sid=googleScholar&xid=f7cdfc60>.

LI, Guowei, Pascal TILLARD, Alain GOJON a Christophe MAUREL. Dual regulation of root hydraulic conductivity and plasma membrane aquaporins by plant nitrate accumulation and high-affinity nitrate transporter NRT2.1. *Plant and Cell Physiology* [online]. 2016, **57**(4), 733-742 [cit. 2023-01-23]. ISSN 0032-0781. Dostupné z: doi:10.1093/pcp/pcw022

LIAN, Xingming, WANG, Shiping., ZHANG, Jianwei *et al.* Expression Profiles of 10,422 Genes at Early Stage of Low Nitrogen Stress in Rice Assayed using a cDNA Microarray. *Plant Mol Biol* **60**, 617–631 (2006). <https://doi.org/10.1007/s11103-005-5441-7>

LLIDO, Jolibe, Shyam PARIYAR a Mathias BECKER. "Application of nitrogen forms affect pH and rice performance in different soil types":. *Towards shifting paradigms in agriculture for a healthy and sustainable future, Plant nutrition, Germany* [online]. 2021, 4. [cit. 2023-01-10]. Dostupné z: <https://www.tropentag.de/2021/abstracts/full/539.pdf>

LUŠTINEC, Jiří a Viktor ŽÁRSKÝ. *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*. Praha: Karolinum, 2003. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0563-5.

NACRY, Philippe, Eléonore BOUGUYON a Alain GOJON. Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant and Soil* [online]. 2013, **370**(1-2), 1-29 [cit. 2022-11-19]. ISSN 0032-079X. Dostupné z: doi:10.1007/s11104-013-1645-9

O'BRIEN, José A., Andrea VEGA, Eléonore BOUGUYON, Gabriel KROUK, Alain GOJON, Gloria CORUZZI a Rodrigo A. GUTIÉRREZ. Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. *Molecular Plant* [online]. 2016, **9**(6), 837-856 [cit. 2023-01-14]. ISSN 16742052. Dostupné z: doi:10.1016/j.molp.2016.05.004

PAVLOVÁ, Libuše, Univerzita Karlova. „Fyziologie rostlin.“ Praha: Karolinum, 2005. ISBN: 80-246-098-51

PROCHÁZKA, Stanislav. *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia, 1998. ISBN 80-200-0586-2.

RICHARD-MOLARD, C., A. KRAPP, F. BRUN, B. NEY, F. DANIEL-VEDELE a S. CHAILLOU. Plant response to nitrate starvation is determined by N storage capacity matched by nitrate uptake capacity in two *Arabidopsis* genotypes. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2008, **59**(4), 779-791 [cit. 2023-01-21]. ISSN 0022-0957. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/erm363

RUSTIONI, Laura, Daniele GROSSI, Lucio BRANCADORO a Osvaldo FAILLA. Iron, magnesium, nitrogen and potassium deficiency symptom discrimination by reflectance spectroscopy in grapevine leaves. *Scientia Horticulturae* [online]. 2018, **241**, 152-159 [cit. 2022-11-18]. ISSN 03044238. Dostupné z: doi:10.1016/j.scienta.2018.06.097

STEUDLE, Ernst. Water uptake by plant roots: an integration of views. *Plant and Soil* [online]. **226**(1), 45-56 [cit. 2022-11-27]. Dostupné z: doi:10.1023/A:1026439226716

ŠAFAŘÍKOVÁ, Hana. *Vinohradnické faktory ovlivňující obsah dusíkatých látek v hroznech* [online]. Lednice, 2014 [cit. 2022-11-21]. Bakalářská práce. Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta v Lednici. Vedoucí práce doc. Ing. Pavel Pavloušek, Ph.D.

ŠMÍROVÁ, Barbora. *Využití cihelného recyklátoru při pěstování užitkových rostlin* [online]. Brno, 2020 [cit. 2022-11-18]. Dostupné z: <https://dspace.vutbr.cz/handle/11012/20041>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce doc. Ing. Tomáš Opravil, Ph. D.

WILKINSON, S. a W. J. DAVIES. ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell & Environment* [online]. 2002, **25**(2), 195-210 [cit. 2023-01-15]. ISSN 01407791. Dostupné z: doi:10.1046/j.0016-8025.2001.00824.x