

# HODNOCENÍ MÍRY POŠKOZENÍ LISTOVÝCH PLETIV PO PŮSOBENÍ OXIDAČNÍHO STRESU

**Karel Michna, Barbora Hluchníková, Kamil Feber**

*Ostravská univerzita v Ostravě, katedra biologie a ekologie, Chittussiho 10,  
710 00 Slezská Ostrava, 737 478 609, p13183@student.osu.cz*

## **Abstrakt**

Článek se zabývá metodou kvantitativní analýzy jehlic po působení oxidačního stresu. Metoda je prezentována na datech získaných z odběru vzorků ze smrku ztepilého *Picea abies* na lokalitě Bílý kříž v Beskydech. Byl nalezen vztah mezi poměrem plochy mezofylových buněk k celkové ploše mezofylu a stomatálním tokem ozónu do pletiva jehlic.

***Klíčová slova:*** jehlice; kvantitativní anatomie; smrk ztepilý *Picea Abies*; ozón

## **Úvod**

Oxidační stres je považován za stresový faktor, který působí na rostliny zpomalením životních funkcí, poškozením buněk, pletiv a celých orgánů, což vede až k uhynutí jedince. Příčinou oxidačního poškození rostlin je nerovnováha mezi množstvím reaktivních forem kyslíku (ROS) působících na rostlinu a jejich odbouráváním [1]. Oxidační stres působící na rostlinu můžeme tedy interpretovat jako jev závislý na poměru oxidační a antioxidační aktivity [2]. Významné narušení rovnováhy mezi systémem produkujícím obranné látky a množstvím působících ROS, vede až k patofyziologickým změnám v organismu.

Reaktivní formy kyslíku se velkou měrou podílejí na hypersenzitivní reakci, která vede k buněčné smrti v místě působení oxidačního činidla [3] a bývá považována za apoptózu [4]. Tuto myšlenku také potvrzují studie probíhající na buněčných suspenzních kulturách huseníčku rolního, sóji a tabáku [5].

V nižších koncentracích působí reaktivní formy kyslíku na fyziologické procesy v rostlině, inhibují fixaci CO<sub>2</sub>, inaktivují enzymy Calvinova cyklu a oxidují flavonoidy. ROS také poškozují DNA, lipidy a proteiny [6].

Působením oxidačního stresu na hospodářsky významné rostlinné taxony se stále zabývá mnoho autorů, např. na *Fagus sylvatica* L. [7] a *Betula pendula* Roth [8].

Náš výzkum se primárně zaměřuje na poškození jehlic smrku ztepilého *Picea abies*, rostoucího ve vyšších nadmořských výškách, kde dochází k častějším expozicím reaktivními formami kyslíku.

## **Materiál a metody**

Vzorky byly odebírány z reprezentativního jedince rostoucího na lokalitě Bílý Kříž (Beskydy, 49°33'N, 18°32'E, 908 m. n. m.). Výběr se omezoval na dvouleté heliofytní jehlice z jižní strany, aby nebyla zanesena chyba související se změnou poměru šířky a výšky u sciofytních jehlic a jehlice byly plně vyvinuté. Odběr proběhl pětkrát v průběhu vegetační sezóny (8.6., 19.7., 22.10., 2.11. a 13.11.), mezi 10 a 12 hodinou. Odstraněny byly všechny jehlice poškozené biotickými činiteli, jako je požer hmyzem nebo s viditelným napadením endofytickými houbami.

### *Měření koncentrace ozónu*

Koncentrace ozónu (Ozon) byla měřená ve výšce 15 m O<sub>3</sub> analyzátozem (O341M, Environment SA, France). Přepočet na hodnoty stomatálního toku ozónu (stom), byl prováděn pracovištěm Ekotoxa s.r.o. dle jejich metodiky [9].

### *Příprava vzorků pro kvantitativní analýzu pletiv*

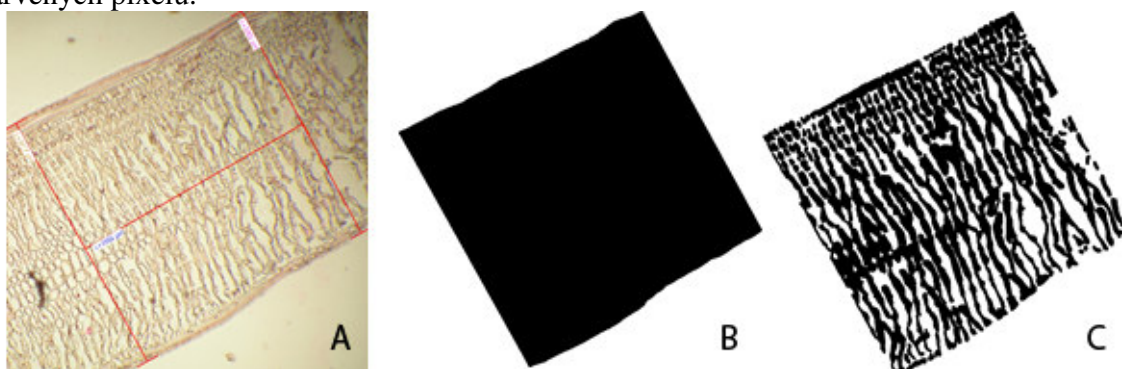
Jehlice byly ihned po odběru fixovány roztokem FAA (1,82 M formaldehyd – 9,89M ethanol – 0,87M kys. octová) [10]. Dále byly zpracovány podle metody trvalých preparátů botanické mikroskopické techniky: odvodnění ethanolovou řadou, převedení do xylému a prosycení parafinem. Zkoumaný materiál byl zalit do BIO-PLASTU EXTRA při teplotě 58 °C. Parafinové bloky byly podélně krájeny ve třech až čtyřech sériích na rotačním mikrotomu HM 325 MICROM GmbH, síla řezu činila 4 až 5 µm. Poté byly přeneseny na podložní sklíčko. Po odparafinování byly vzorky barveny základní metodou Hematoxylin – Eozin (HE), polychromní methylenovou modří nebo barvením Grocott - Gömöri. Nabarvené preparáty byly uzavřeny do enthellanu s xylémem.

### *Kvantitativní analýza podélných histologických řezů*

Analýza podélných histologických řezů probíhala na mikroskopu ZEISS Axiostar Plus propojeného s kamerou Olympus C5060 WZ a multimediálním PC. Pro získání snímku byl použit program Quick Photo Camera 2.3. Podélné řezy jehlic byly fotografovány s objektivem zvětšujícím 10x. Náhodně byl vybrán segment o délce 1000 µm z každého řezu, který byl dále analyzován.

Měření ploch probíhalo ve freeware programu CERNOTA vytvořeném Kalinou a Slovákem [11]. Program počítá množství černých pixelu na snímku a umožňuje jejich přepočet na plochu podle zadané rovnice. Vytvořením série čtverců a obdélníků o známém počtu pixelů a následným změřením jejich délky a šířky programem Quick Photo Camera 2.3, byla sestavena kalibrační křivka pro výpočet rovnice.

Vyfocené snímky byly v první fázi převedeny do programu Adobe Photoshop CS5. Tento software umožňuje pohodlné a přesné obarvení objektů na snímku, které chceme měřit. Z každého snímku (Obrázek 1. A) vznikly dva obrázky, jeden s obarvenou plochou celého měřeného segmentu (Obrázek 1. B) a druhý s plochou buněk v tomto segmentu (Obrázek 1. C). Ve druhé fázi byl černobílý obrázek nahrán do programu CERNOTA, který vypočítal plochu obarvených pixelů.

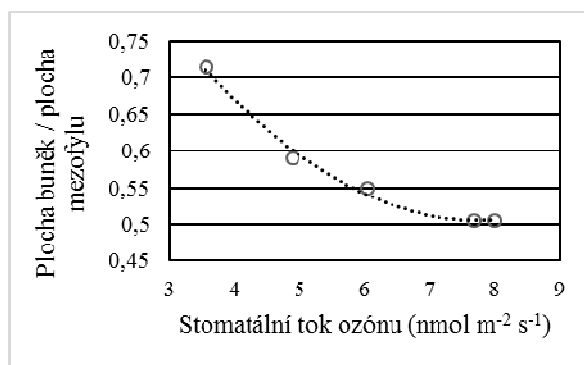


**Obrázek 1.** Ukázka přípravy snímků pro výpočet plochy programem CERNOTA. A. snímek ze světelného mikroskopu, zvětšení 100x, barvení HE, vyznačen segment o délce 1000 µm použitý pro další analýzu. B. černě obarvená plocha celého segmentu. C. černě obarvené buňky mezofylu v měřeném segmentu.

Plochu buněk (AreaC) jsme vydělili celkovou plochou mezofylu (Area) a získali tak parametr odrážející zdravotní stav pletiva uvnitř jehlice (CM). Odečtením hodnoty plochy buněk od celkové plochy mezofylu, jsme vypočítali plochu intercelulárních prostor (AreaI). Dalším parametrem vhodným pro popis změn probíhajících v mezofylu, je poměr plochy buněk k ploše intercelulárního prostoru (CI).

## Výsledky a diskuse

Analýza vzorků ukázala změnu v ploše a objemu mezofylových buněk, která se projevuje deformací protoplastu. U měřených vzorků byl nalezen vztah mezi poměrem plochy buněk k celkové ploše mezofylu (CM) a stomatálním tokem ozónu (Stom) do pletiva (korelační koeficient -0,72; (p-value = 3.833e-07)). Se zvyšujícím se stomatálním tokem ozónu se snižuje plocha buněk v mezofylu (Obrázek 2.). Průměrné hodnoty poměru CM se pohybovaly od 0,72 (zdravě vypadající pletivo) do 0,51 (poškozené pletivo).



**Obrázek 2.** Graf závislosti poměru CM a stomálního toku ozónu do pletiva jehlic smrku ztepilého *Picea abies*

Závislost mezi CM poměrem a datem sběru nebyla nalezena (korelační koeficient -0,04; (p-value = 0.804)). Lze tedy říci, že se nejedná o sezonní změny, jako tomu bývá například u koncentrace fotosyntetických pigmentů.

Vzájemné korelace vybraných měřených hodnot ukazuje tabulka 1.

**Tabulka 1.** Vzájemné korelace měřených hodnot. Významné hodnoty jsou označeny tučně.

	Date	Stom	CM	CI
<b>Stom</b>	0,18			
<b>Ozon</b>	0,10	<b>1,00</b>		
<b>CM</b>	-0,04	<b>-0,72</b>		
<b>CI</b>	0,16	<b>-0,72</b>	<b>0,89</b>	
<b>AreaC</b>	0,36	-0,30	<b>0,61</b>	<b>0,61</b>
<b>AreaI</b>	0,21	<b>0,78</b>	<b>-0,90</b>	<b>-0,79</b>
<b>Area</b>	<b>0,51</b>	0,43	-0,31	-0,20

## Závěr

Cílem výzkumu bylo najít vhodný parametr pro kvantitativní hodnocení stavu pletiv po působení stresu. Poměr plochy buněk k celkové ploše mezofylu velmi dobře odráží změny

objemu buněk uvnitř jehlice. Kombinací programu CERNOTA a Adobe Photoshop vznikl velmi přesný a levný nástroj pro kvantitativní analýzu histologických řezů.

### Poděkování

Studie byla finančně podpořena z projektu SGS29/PřF/2015.

### Literatura

- [1.] PITERKOVÁ, J., TOMÁNKOVÁ, K., LUHOVÁ, L., PETŘIVALSKÝ, M., PEČ, P. *Oxidativní stres: lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu*. Chemické listy, 2005, 99, s. 455-466.
- [2.] ARORA, A., SAIRAM, R. K., SRIVASTAVA, G. C. *Oxidative stress and antioxidative systems in plants*. Current Science, 2002, 82, s. 1227-1238.
- [3.] DANGL, J. L., DIETRICH, R. A., RICHBERG, M. H. *Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interaction*. The Plant Cell, 1996, 8, s. 1793-1807.
- [4.] LAMB, C., DIXON, R. A. *The oxidative burst in plant disease resistance*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1997, 48, s. 251-275.
- [5.] HOUOT, V., ETIENNE, P., PETITOT, A. S., BARBIER, S., BLEIN, J. P., SUTY, L. *Hydrogen peroxide induces programmed cell death features in cultured tobacco BY-2 cells, in a dose-dependent manner*. Journal of Experimental Botany, 2001, 52, s. 1721-1730.
- [6.] BERLETT, B. S., STADTMAN, E. R. *Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress*. The Journal of Biological Chemistry. 1997, 272, s. 20313-20316.
- [7.] MATYSSEK R., BAHNWEG G., CEULEMANS R., FABIAN P., GRILL D., HANKE D. E., KRAIGHER H., OSSWALD W., RENNENBERG H., SANDERMANN H., TAUSZ M., WIESER G. *Synopsis of the CASIROZ case study: carbon sink strength of Fagus sylvatica L. in a changing environment--experimental risk assessment of mitigation by chronic ozone impact*. Plant Biology, 2007, 9, s. 163-180.
- [8.] OKSANEN E., KONTUNEN-SOPPELA S., RIIKONEN J., PELTONEN P., UDDLING J., VAPAAVUORI E. (2007). *Northern environment predisposes birches to ozone damage*. Plant Biology, 9, 191-196.
- [9.] ZAPLETAL, M., PRETEL, J., CHROUST, P., CUDLÍN, P., EDWARDS-JONÁŠOVÁ, M., URBAN, O., POKORNÝ, R., CZERNÝ, R., HŮNOVÁ, I. *The influence of climate change on stomatal ozone flux to a mountain Norway spruce forest*. Environmental Pollution, 2012, 169, s. 267-273.
- [10.] GEBAUER R., VOLAŘÍK D., URBAN J., BORJA I., NAGY N. E., ELDHUSET T. D., KROKENE P. *Effect of thinning on anatomical adaptations of Norway spruce needles*. Tree Physiology, 2011, 31, s. 1103-1113.
- [11.] KALINA J., SLOVÁK V. *The inexpensive tool for the determination of projected leaf area*. Ekológia (Bratislava), 2004, 23, s.163–167.

### Abstract

The article deals with a method of quantitative analysis of needles after exposure to oxidative stress. The method is tested on data obtained from sampling of Norway spruce *Picea abies* in the Bílý kriz Experimental Station in the Beskydy Mts. (Czech Republic). A relationship has been found between the ratio of the area of mesophyll cells to the total area of mesophyll and stomatal ozone flux.