

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Kristýna Štěpánová

Změny v anatomii jehlic v odezvě na antropogenní znečištění
Changes in the anatomy of coniferous needles in response to anthropogenic
pollution

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Zuzana Lhotáková, Ph.D.

Praha, 2020

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14.8. 2020

Podpis

Poděkování

Mé poděkování patří především mé školitelce práce prof. RNDr. Janě Albrechtové, Ph.D. a konzultantce Mgr. Zuzana Lhotáková, Ph.D. za jejich cenné rady, poskytnutí studijních materiálů, trpělivost a podporu při psaní mé bakalářské práce. Děkuji i své rodině a přátelům za podporu nejen při psaní této práce, ale i během celého studia.

Abstrakt

Anatomická stavba listů jehličnanů je ovlivněna vnějšími podmínkami prostředí. Z abiotických se kromě ozáření jedná zejména o faktory klimatické změny – sucho, extrémní teploty. Významné postavení mezi vnějšími abiotickými faktory, které způsobují změny ve struktuře jehlic, má antropogenní znečištění. V současnosti jde především o troposférický ozón, SO₂, NO_x a pevné částice (PM).

Vlivem působení atmosférických polutantů dochází k celé řadě negativních strukturálních změn, mění se zastoupení jednotlivých pletiv v jehlici, podíl mezibuněčných prostor, a struktura buněčných organel, především chloroplastů. Mezofylové buňky vykazují příznaky degradace zejména v okolí nadprůduchové prohlubně. Na jehlicích dochází k viditelnému poškození v podobě chloróz a nekrot. Při působení stresových faktorů prostředí, jako je antropogenní znečištění, dochází u jehlic k urychlení senescence.

Cílem práce je shrnout poznatky o změnách ve struktuře listu jehličnatých dřevin, vyvolaných působením antropogenního znečištění, především ozónem, SO₂ a NO_x v kombinaci s faktory klimatické změny. Práce je zaměřena na změny v různých anatomických hierarchických úrovních, od viditelného, makroskopického poškození po změny na ultrastrukturální úrovni a přibližuje dopad atmosférických polutantů na fyziologický stav rostlin a senescenci.

Klíčová slova: chlorózy, jehlice, jehličnany, mezofyl, NO_x, oxidativní stres, ozón, reaktivní formy kyslíku, SO₂, struktura chloroplastu, struktura listu, subcelulární změny

Abstract

The anatomical structure of conifer needles is affected by external environmental conditions. From abiotic factors, apart of irradiation, main determining factors are drought and extreme temperatures belonging to factors of climate change. Anthropogenic pollution has a significant position among the external abiotic factors that cause changes in the structure of needles. At present, the main polluting compounds are tropospheric ozone, SO₂, NO_x and PM.

Due to the effect of atmospheric pollutants, the proportion of individual tissues in the needle changes, so does the proportion of intercellular spaces and the internal structure of cellular organelles, especially chloroplasts. Mesophyll cells show signs of degradation, especially around the substomatal cavity. There appears a visible damage on the needle surface – chloroses and necroses. The process of senescence speeds up during the activity of stress environmental factors, such as anthropogenic pollution.

The main objective of the present Thesis is to gather knowledge about changes of conifer needle structure, caused by anthropogenic pollution, especially ozone, SO₂ and NO_x, in combination with climate change factors – drought and extreme temperatures. The review is focused on modifications on various anatomic hierarchical levels, from visible macroscopic damage to modifications on ultrastructural level, and enlightens the effect of atmospheric pollutants on physiological conditions of plants and their senescence.

Key words: conifers, chloroplast structure, chloroses, leaf structure, mesophyll, needles, NO_x, oxidative stress, ozone, reactive oxygen species, SO₂, subcellular changes

Seznam použitých zkratk

EEA (European Enviromental Agency) – Evropská agentura pro životní prostředí

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) – Mezivládní panel pro změny klimatu

LM (Light microscopy) – Světelná mikroskopie

NO_x – Oxidy dusíku

PM (Particulate matter) – Pevné částice

SEM (Scanning electron microscopy) – Skenovací elektronová mikroskopie

SO_x – Oxidy síry

TEM (Transmissive electron microscopy) – Transmisivní elektronová mikroskopie

VOC (Volatile Organic Compounds) – Těkavé organické sloučeniny

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Atmosférické znečištění	1
2.1	Pevné částice	4
2.2	Dusík a jeho oxidy.....	5
2.3	Ozon	6
2.4	Síra a její sloučeniny	6
3	Anatomická stavba jehlice.....	7
4	Změny ve struktuře jehlice vyvolané působením atmosférického znečištění.....	10
4.1	Změny na úrovni celé rostliny	10
4.2	Změny na úrovni pletiva.....	11
4.2.1	Kvalitativní strukturální změny	12
4.2.2	Kvantitativní strukturální změny	15
4.3	Změny na buněčné úrovni	18
4.3.1	Změny způsobené sírou a jejími oxidy.....	20
4.3.2	Změny způsobené ozonem	22
5	Stresové reakce a urychlená senescence jehlic poškozených znečištěním	25
6	Závěr.....	26
7	Seznam použité literatury a internetových zdrojů	28
7.1	Literatura	28
7.2	Internetové zdroje.....	32

1 Úvod

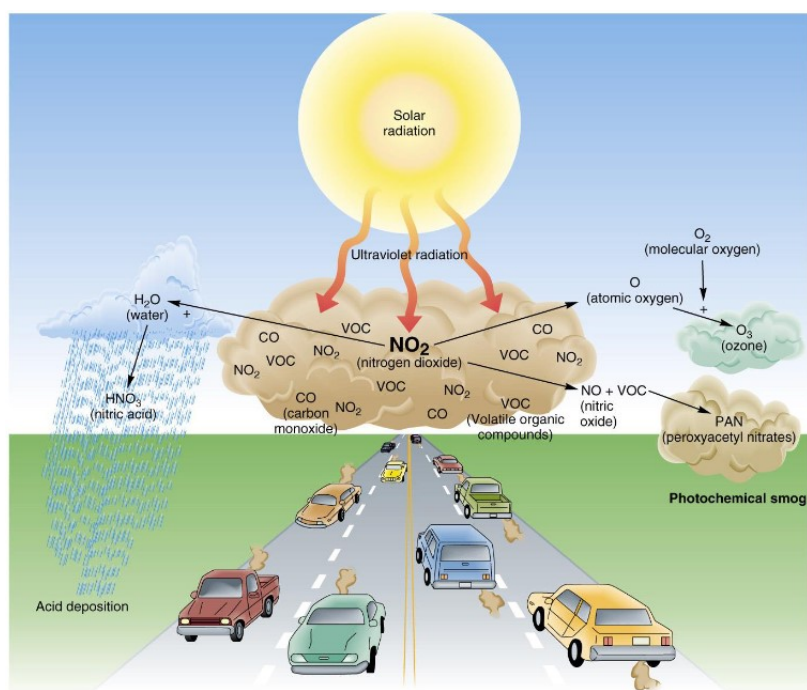
Hlavním morfogenním faktorem při vytváření struktury listu je ozáření. Kromě toho je anatomická stavba listu jehličnatých dřevin v současnosti ovlivňována především faktory klimatické změny a výskytem znečišťujících látek, primárně antropogenního původu, v atmosféře. Jedná se především o troposférický ozón, oxid siřičitý (SO_2), oxidy dusíku (NO_x) a pevné částice (PM). Vyšší koncentrace těchto znečišťujících látek v přízemních vrstvách atmosféry mají negativní vliv nejen na rostliny, ale i na lidské zdraví a ekosystémy a jejich součásti vůbec.

Cílem této práce je shrnout základní charakteristiku atmosférických polutantů a jejich vliv na anatomickou stavbu jehlic na různých hierarchických úrovních, od úrovně makroskopické po úroveň mikroskopickou. V předkládané práci popisují změny, které se projevují na makroskopické a mikroskopické úrovni anatomické stavby jehlic a k jakým dochází na úrovni pletiv, ale i jednotlivých buněk a buněčných organel. Vlivem působení znečišťujících látek jsou zasaženy i fyziologické procesy a dochází k urychlení senescence, této problematice se budu v práci též okrajově věnovat.

2 Atmosférické znečištění

Vzdušné polutanty můžeme řadit do dvou skupin podle původu jejich zdroje – přírodní a antropogenní, tedy zapříčiněné lidskou činností. Přírodní jsou pro naši planetu přirozené, vznikají při vulkanismu (SO_x , oxidy dusíku a pevné částice), požárech (NO_x , CO, CO_2 a pevné částice) či jsou produkovány mikroorganismy (CH_4 , H_2S a oxidy dusíku) a rostlinami (pyl a uhlovodíky), nebo prach z půdy, stratosférický ozon a mořský aerosol. Zdroje antropogenního znečištění pocházejí především ze spalování fosilních paliv, zemědělství, průmyslové výroby, zpracování odpadu a automobilové či lodní dopravy. Hlavní znečišťující látky jsou oxidy dusíku (NO_x), jakožto prekurzory fotochemického smogu, přízemního ozonu; oxid uhelnatý, SO_2 , těkavé organické sloučeniny (VOC – Volatile Organic Compounds), amoniak, pevné částice (PM – Particulate matter) a aerosoly. Všechny mají vysoké emise v okolí měst a průmyslových center (Carmichael a kol., 2003). Koncentrace výše popsaných částic a sloučenin, které jsou součástí ovzduší, jsou stále příliš vysoké a poškozují lidské zdraví a ekosystémy. Dle poslední zprávy EEA (2019) jsou pro vegetaci v Evropě maximální roční hodnoty koncentrací v atmosféře u SO_x $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ a u NO_x $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Jejich hodnoty však v rámci Evropy v roce 2017 přesáhly tento standard a u SO_x byly hodnoty kolem $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$, u NO_x však dosáhly hodnoty $60 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Negativní účinky znečištěného ovzduší na vegetaci jsou pocíťovány nejvíce ve dvou typech ekosystémů ovlivňovaných činností člověka – v městských oblastech, kde mají za následek předčasnou úmrtnost a zvýšenou morbiditu; a v ekosystémech, vyskytujících se v blízkosti městských či průmyslových oblastí, kde tlak ze znečištěného ovzduší narušuje růst vegetace a negativně ovlivňuje biodiverzitu (Guerreiro a kol., 2014).

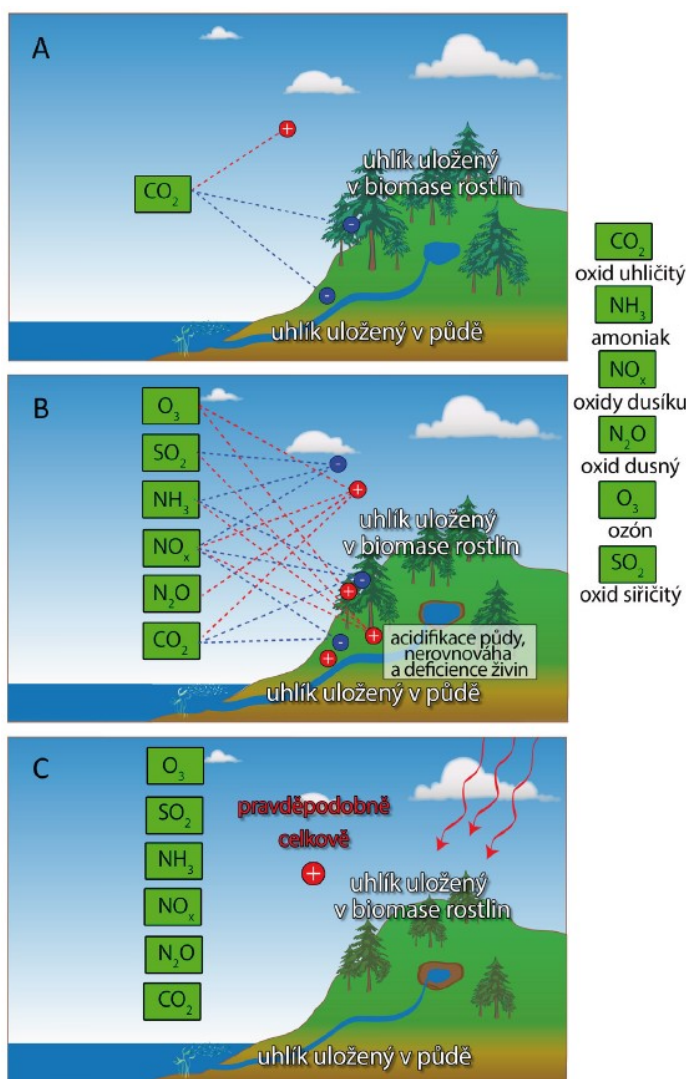
Více jak polovina světové populace žije ve městech, kvůli vidině možnosti lepší kvality života. Vysoké koncentrace lidí a aktivity, které provozují, vyvíjejí stále rostoucí tlak na životní prostředí, který má různorodé dopady na lokální, regionální, ale i globální úrovni. V posledních desetiletích se znečištěné ovzduší stává největším problémem velkých měst. Zpočátku byly problémem sloučeniny síry, vzniklé spalováním uhlí (Molina a Molina, 2004). Dnes je to hlavně fotochemická smogová reakce, zahrnující reakci oxidů dusíku, uhlovodíků a slunečního záření, která však byla už od 50. let minulého století brána jako významný faktor znečišťující ovzduší nad velkými městy (Robinson and Robbins, 1970). Fotochemický smog (Obr.1), jehož součástí jsou především troposférický ozon, uhlovodíky, NO_x a oxidy uhlíku, vzniká primárně kvůli dopravě, ale také z průmyslových činností, výrobou energie a rozpouštědel. Znečištěné ovzduší má vážné dopady na vegetaci i lidské zdraví, v průmyslových regionech se projevuje snížením intenzity slunečního záření, které je způsobeno městskými a regionální opary, zvýšením srážek a má potenciál se významně podílet na změně klimatu (Molina a Molina, 2004; Ottar, 1977).



Obr. 1: Schéma vzniku fotochemického smogu. Upraveno podle internetového zdroje č. 1: Portál životního prostředí hl. m. Prahy, Česká televize

Lidské aktivity vedou také ke zvýšené koncentraci několika plynů, které jsou účinné v absorbování a opětovném vyzařování v infračervené části elektromagnetického spektra (Harvey, 1993) a působí tak jako skleníkové plyny, jejichž uvolňování ovlivňuje klima v globálním měřítku (Jolivet a kol., 2016). Vlivem emisí skleníkových plynů je tedy množství sluneční energie absorbované Zemí větší, než množství energie vyzářené zpět do vesmíru (Irving a kol., 2019). Díky tomu je průměrná teplota planety příznivá pro rozvoj života. Nicméně problém nastává, pokud se v atmosféře hromadí větší množství skleníkových plynů a dochází k přílišnému oteplování, což se v současnosti děje v důsledku lidských

aktivit. Mezi primární skleníkové plyny se řadí oxid uhličitý (CO_2), metan (CH_4), troposférický ozon (O_3), chlorofluorouhlíky (CFCs) a oxid dusný (N_2O). Jiné plyny, jako je například oxid uhelnatý (CO), oxidy dusíku (NO_x) či uhlovodíky (HCs) nejsou samy o sobě skleníkovými plyny, ale ovlivňují koncentrace skleníkových plynů v atmosféře, a tak nepřímo ovlivňují míru skleníkového efektu (Harvey, 1993). V rámci rozhodnutí o přijetí Pařížské dohody v roce 2015, byla 18. října 2018 schválena při zasedání IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change – Mezivládní panel pro změny klimatu) zvláštní zpráva, za účelem omezení globálního oteplování z 2°C na 1.5°C nad předindustriální teploty do konce 21. století a s tím související ovlivnění globálního koloběhu skleníkových plynů (IPCC, 2018). Zpráva v první kapitole uvádí, že posílení skleníkového efektu lidskou činností dosáhlo v roce 2017 vzrůstu globální průměrné teploty přibližně o 1°C (pravděpodobně mezi 0.8°C a 1.2°C) nad úrovněmi před industrializací a vzrůstalo o 0.2°C za desetiletí. IPCC se tímto zabýval v souvislosti s posilováním globální reakce na hrozbu změny klimatu, udržitelného rozvoje a úsilí o vymýcení chudoby (IPCC, 2018). Jedná se o alarmující zjištění, které varuje před příliš rychlým nárůstem skleníkových plynů v atmosféře a v jeho důsledku k prohlubující se klimatické změně, kdy se environmentální faktory prostředí, jako se



sucho a extrémní teploty, zvyšují. Tyto nepříznivé stresové faktory pak působí negativně na rostliny. Výsledná interakce vzdušného znečištění spolu s faktory klimatické změny (zvýšená teplota, snížená dostupnost vody) je velmi komplexní a s největší pravděpodobností povede ke zhoršení zdravotního stavu vegetace a k zesílení jejich radiačního účinku na celkovou radiační bilanci Země (Obr. 2) (Albrechtová a kol., 2017).

Obr. 2: Vliv různých faktorů na radiační účinek skleníkových plynů v atmosféře pro zesílení skleníkového efektu a zvýšení teploty. a) Vliv samotného CO_2 . b) Interakce polutantů NH_3 , NO_x , N_2O , ozónu a SO_2 spolu s CO_2 je různorodá. c) Výsledná interakce všech vzdušných polutantů spolu s faktory klimatické změny (zvýšená teplota, snížená dostupnost vody) je velmi komplexní a s velkou pravděpodobností povede ke zhoršení zdravotního stavu lesů a k zesílení jejich radiačního účinku. (a, b překresleno podle J. Galloway, U.S. Carbon Cycle Science Program) Převzato a upraveno podle Albrechtová a kol. (2017), internetového zdroje č. 2.

Klimatický systém zahrnuje silně odlišné složky, které jsou však vzájemně velmi provázané a jsou charakterizované různými časovými stupni vývoje. Jedná se o atmosféru, oceány, kryosféru, biosféru/pevninské vodstvo a chemosféru, která zahrnuje chemické procesy v atmosféře, oceánech a na pevninách. Atmosféra a některé aspekty chemosféry jsou nejrychleji se vyvíjející, s charakteristickou dobou odezvy několika měsíců až let (Giorgi, 2005). Proto je důležité zmínit, že znečišťující látky nezmizí v atmosféře navždy (Bolin a kol., 1974) a jsou často nazývány krátkodobými klimatickými polutanty. Jedná se například o aerosoly s životností v řádech dnů, ozon s životností v řádech týdnů a metan, který v atmosféře vydrží desetiletí (Collins a kol., 2013). Doba setrvání znečišťujících látek v atmosféře je úzce spjata s charakterem zemského povrchu, meteorologickými podmínkami a výškou emise. Výsledky studie autorů Bolin a kol. (1974) naznačují, že rychlost větru je méně důležitý faktor, zejména pokud se zdroj emise nachází níž jak 10 m nad zemí. Pokud emise pochází z vyvýšeného zdroje, zasáhne znečištění oblast vzduchu jak nad sebou, tak pod sebou. Troposféra, část atmosféry vyskytující se nejbližší zemskému povrchu, zejména její spodní část, má strukturu vrstev, které se mění s povětrnostními podmínkami a často vykazují systematické denní a sezónní variace. Tato struktura vrstev omezuje disperzi znečišťujících látek, většina jich zůstává v dolních 2 km atmosféry. Koncentrace znečišťujících látek v blízkosti jejich zdrojů se rychle snižuje, jelikož v závislosti na podmínkách míchání, dochází ve vzdálenosti 100-200 km k jejich rovnoměrnému rozptýlení ve vrstvě (Ottar, 1977). V souvislosti s transportem polutantů na dlouhé vzdálenosti je důležité si uvědomit, že není zasažena jen vegetace v oblasti zdroje znečištění, ale i vegetace, vyskytující se relativně daleko od zdroje. V dalších podkapitolách se budu věnovat emisím jednotlivých znečišťujících látek a jejich hlavních důsledcích pro rostliny.

2.1 Pevné částice

Pevné částice či pevné prachové částice (anglicky zkratka PM – particulate matter), tvoří komplexní směs částic a plynů rozptýlenou ve vzduchu. Primární částice jsou emitovány přímo ze zdrojů, zatímco sekundární částice jsou vytvářeny v atmosféře z plynných emisí a obojí může být emitováno z antropogenních i přírodních zdrojů (Davidson a kol., 2005). Prachové částice jsou emitovány ze široké škály zdrojů (Cass, 1998). V přírodě prachové částice pochází z prachových bouří v pouštích, výbuchů sopek a požárů, ale jsou to i spory hub či pyl rostlin. V městech je to nejčastěji z různých typů motorových vozidel, které uvolňují částice z neúplného spalování paliva a mazacího oleje, ať už se jedná o benzín, diesel či zemní plyn, dále ze železničních lokomotiv, letadel, lodí, ale i průmyslové výroby, vytápění domácností (Cass, 1998).

Míra depozice prachových částicím je pro rostliny důležitá, jelikož negativně ovlivňuje funkčnost listu a může dojít například k ucpání průduchů (Farmer, 1993).

2.2 Dusík a jeho oxidy

Dusík je bezbarvý plyn, který tvoří hlavní složku zemské atmosféry. Mezi důležité dusíkaté sloučeniny v atmosféře patří oxid dusný (N_2O), oxid dusičitý (NO_2), oxid dusnatý (NO), amoniak (NH_3) a dusičnanové aerosoly. Významné polutanty emitované člověkem jsou NO a NO_2 , hlavně kvůli jejich účasti při fotochemických reakcích. Obvykle se tyto dvě formy (NO a NO_2) souhrnně označují jako NO_x (Robinson a Robbins, 1970). Přírodními zdroji dusíku a jeho sloučenin jsou např. blesk, vulkanická a mikrobiální činnost a představují méně jak 30 % emisí. NO_x se z troposféry odstraňují většinou ve formě HNO_3 , což přímo přispívá ke kyselosti dešťové vody a vzniká tak kyselý spad (Delmas a kol., 1997).

NO_x jsou emitovány během spalování paliva, vznikají na horkých površích, například motorových vozidel a lodí, dále průmyslovými zařízeními a vytápěním domácností. Mohou mít sice hnojící účinky, ale i nepříznivé účinky na vegetaci. Jsou příčinou eutrofizace i acidifikace a přispívají k tvorbě již zmiňovaných sekundárních PM částic či O_3 s přidruženými účinky na zdraví, ekosystémy a klima. Dominantním sektorem antropogenních emisí NO_x je doprava, která v roce 2011 v Evropě vyprodukovala 47 % z celkového množství a jako druhý byl energetický sektor, který přispěl 21 %. Pro porovnání je důležité zmínit, že míra emise byla mezi lety 2002 až 2011 u dopravy vyšší o 31 % a u energetiky o 27 %. Pokud se zaměříme jen na NO_2 , tak v roce 2011 byla jeho roční limitní hodnota v celé Evropě značně překročena, většinový podíl na tom má měření z dopravních stanic. Mezi lety 2002 a 2011 se překročení limitu pohybovalo mezi 5-23 % s klesající tendencí (Guerreiro a kol., 2014; Ritchie a kol., 2006). Na naléhavou potřebu opatření ke zlepšení kvality ovzduší v Evropě reagovala a reagují politická opatření v rámci Rady Evropské unie. V roce 2013 byl navržen balíček, který má mimo jiné zajistit krátkodobé splnění stávajících i nových cílů pro období do roku 2030 (Guerreiro a kol., 2014).

Další významný polutant je amoniak, za jehož emise může z 93% zemědělská činnost (Carmichael a kol., 2003; Guerreiro a kol., 2014). Reaktivní sloučeniny dusíku emitované jako NO_x i NH_3 , způsobují eutrofizace ekosystémů a po snížení emisí SO_2 jsou hlavními okyselujícími složkami ve vzduchu. I přes snížení nadměrné depozice atmosférického dusíku v Evropě o 23 % mezi lety 1990 až 2010 byly v roce 2010 ekosystémy stále ohroženy, a to zejména eutrofizací (EEA, 2012). Téměř trojnásobný globální nárůst dusíku v atmosféře, v důsledku lidské činnosti, byl naměřen mezi lety 1890 až 2016. Do budoucna se předpokládá, že globální snížení emisí NO_x bude kompenzováno pokračujícím zvyšováním emisí NH_3 a proto není očekávaná přílišná změna celkové depozice dusíku, zato její kyselost bude výrazně nižší (Kanakidou a kol., 2016).

2.3 Ozon

Ozon (O_3) je anorganická molekula, modrý plyn, který vzniká reakcí UV záření a molekul kyslíku (O_2). Přirozeně se vyskytuje v horních vrstvách atmosféry, ve stratosféře, kde tvoří tzv. ozonovou vrstvu. Tato vrstva je pro život na Zemi velmi důležitá, jelikož slouží jako ochrana biosféry před nadbytečným dopadem UV záření. UV záření výrazně poškozuje živé organismy, narušuje biologické membrány a nukleové kyseliny.

Menší přirozený výskyt má ozon v troposféře, jeho koncentrace je závislá na přírodních procesech a činnosti člověka (Krupa a Manning, 1988). V troposféře pod vlivem slunečního záření dochází v reakci s primárními znečišťujícími látkami ke tvorbě sekundárních vzdušných polutantů, do kterých patří i škodlivý přízemní ozon. Primární vzdušné polutanty se v atmosféře vyskytují v důsledku lidské činnosti a v souvislosti s fotochemickým oxidačním cyklem a vznikem O_3 se jedná o těkavé organické sloučeniny (VOC), oxid uhelnatý (CO) a oxidy dusíku (NO_x) (Obr. 2) (Krupa a Manning, 1988). Může tedy proběhnout např. tato reakce: oxid dusičitý (NO_2) se fotodisociací rozloží na oxid dusný (NO) a atom volného kyslíku, který následně reaguje s O_2 za vzniku troposférického O_3 (Jolivet a kol., 2016). Jelikož O_3 je velmi fytotoxický, je přílišná expozice troposférickému ozonu pro rostliny škodlivá a má za následek jak symptomatické, tak i chronické změny (Guerreiro a kol., 2014; Krupa a Manning, 1988). U rostlin je viditelné poškození listů, což má za následek nižší výnos zemědělských plodin i růst lesů a vše je kombinované s předčasným stárnutím (Matyssek a kol., 2008).

Vysoké koncentrace troposférického O_3 jsou sice produkovány hlavně městy, kde jsou spojeny s tvorbou NO_x převážně z dopravy a s tím související spalování fosilních paliv, ale jelikož O_3 či jeho prekurzory jsou součástí vzduchu, mohou poškodit vegetaci i daleko od zdroje emise (Jolivet a kol., 2016). Proto i když emise prekurzorů ozonu v Evropě v letech 2002 až 2011 významně poklesly, jeho množství negativně ovlivnilo například zvýšené globální emise methanu (CH_4), který k formaci O_3 také přispívá (Guerreiro a kol., 2014). Praktická pozorování ukazují, že městské stromy mají, ve srovnání se s stromy rostoucími v přírodních porostech, drasticky zkrácenou životnost (Whitlow a kol., 1992). Na to má vliv, kromě jiných polutantů, i nadměrná expozice O_3 , proto je potřeba vysazovat vegetaci, která má vůči O_3 vysokou toleranci (Pellegrini, 2014).

2.4 Síra a její sloučeniny

Síru vždy nalezneme ve stopovém množství v atmosféře, kde je ve formě částic síranu (SO_4^{2-}) a také v plynné formě jako oxid siřičitý (SO_2) a sulfan (H_2S), který je bakteriálního původu. Činností člověka vzniká oxid siřičitý, který také může vzniknout oxidací sulfanu. Oxid siřičitý může být oxidován na SO_3 fotochemickou a katalytickou oxidací. Obě tyto formy, SO_4 i SO_3 řadíme do kontaminantů (Nakai a Jensen, 1967).

SO₂ v je antropogenně emitovaný při spalování paliv obsahujících síru, nebo při vysokoteplotních průmyslových procesech, čímž jsou například hutě, které zahrnují suroviny s vysokým obsahem síry. Tyto emise přispívají k acidifikaci, což má negativní dopad na vodní ekosystémy v řekách i jezerech; poškození lesů a terestrických ekosystémů a s tím související vliv i na sníženou biodiverzitu (Guerreiro a kol., 2014).

Mezi 40. a 50. lety 20. století způsobily SO₂ a SO₄, vznikající spalováním uhlí, londýnský “zabíjácí smog“, který souvisel se zvýšením počtu nemocí a úmrtnosti. Přechod na paliva s nízkým obsahem síry tuto situaci zlepšil, přesto oblasti s vysokou hladinou síry stále přetrvávají v některých regionech rozvojového světa (Molina and Molina, 2004). Problémy se znečištěním atmosféry na bázi oxidů síry, a jimi způsobené velkoplošné chřadnutí a odumírání lesních porostů, proběhly i na našem území, zejména v oblasti Krušných hor v tzv. Černém trojúhelníku, kvůli hnědouhelným elektrárnám, které se hojně stavěly mezi 50. a 70. lety 20. století (Albrechtová a kol., 2017).

3 Anatomická stavba jehlice

V této kapitole popíšu anatomickou stavbu jehlice, pro lepší pochopení problematiky týkající se změn struktury jehlice v následujících kapitolách. Při popisu jsem vycházela ze základní anatomické učebnice autorů Lux a kol. (2019).

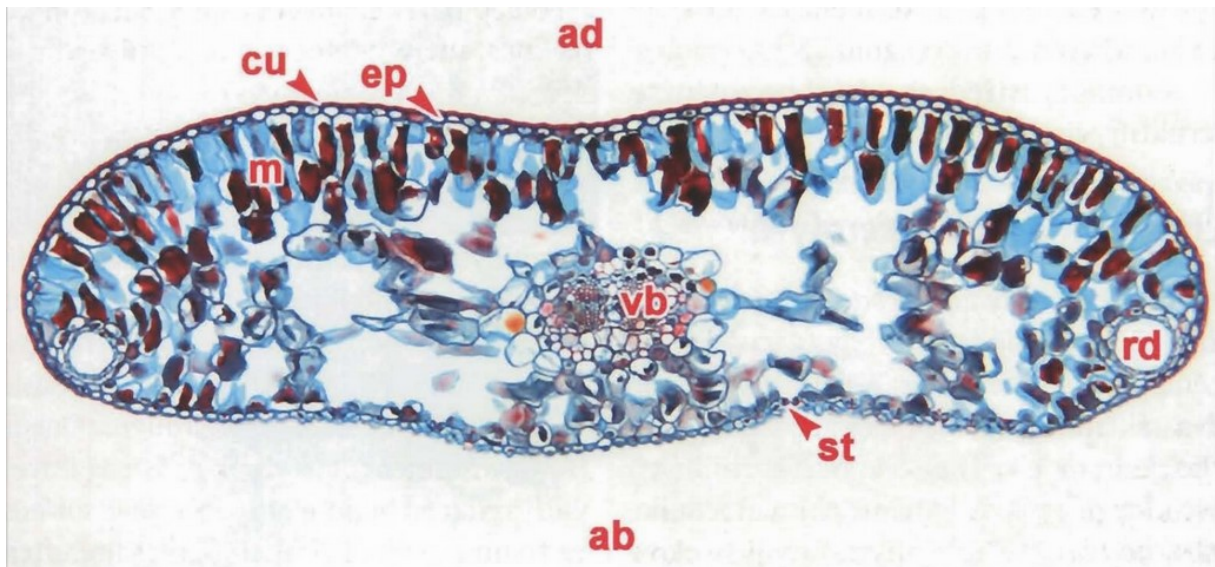
Jehlice je list většiny nahosemenných rostlin a jedná se o asimilační orgán. Listy jehličnanů jsou často xeromorfní a jejich povrch se skládá z jednovrstevné silnostěnné epidermis, která je pokryta silnou vrstvou kutikuly. Vrstva kutiny a vosků na povrchu epidermis, která omezuje průnik látek, chrání jehlici před slunečním zářením a především snižuje výdej vody.

Pod pokožkou se nachází jedno – až vícevrstevná vrstva sklerenchymatické hypodermis, sloužící jako mechanická opora jehlice. Buněčné stěny hypodermis jsou stejně jako u epidermis silně ztloustlé. Vrstva hypodermálních buněk je vždy přerušována v oblasti pod průduchy, kde se nachází podprůduchová dutina.

Průduchy, také stomata, tvořeny dvěma svěracími buňkami, jsou vnořené pod povrch pokožky, často se vytváří nadprůduchová či epistomální prohlubeň a pod nimi v mezofylu se nachází podprůduchová dutina, obkroužená mezofylovými buňkami. Průduchy slouží ke kontrolované výměně plynů mezi rostlinou a vnějším prostředím a také regulují výdej vody, což je výhodné hlavně v zimě, kdy je přísun vody omezen. Průduchy, včetně základních epidermálních buněk, jsou hojně pokryty strukturou tubulárních voskových krystalů (Meng a kol., 1995).

Mezofyl je fotosyntetické pletivo, umístěné pod hypodermis a vyplňuje většinu objemu jehlice. Tvar mezofylových buněk se u různých druhů nahosemenných rostlin liší. Pro čeled' borovicovité (*Pinaceae* Spreng. ex F. Rudolphi) je typický ramenovitý parenchym. U jedle je naopak mezofyl rozlišen

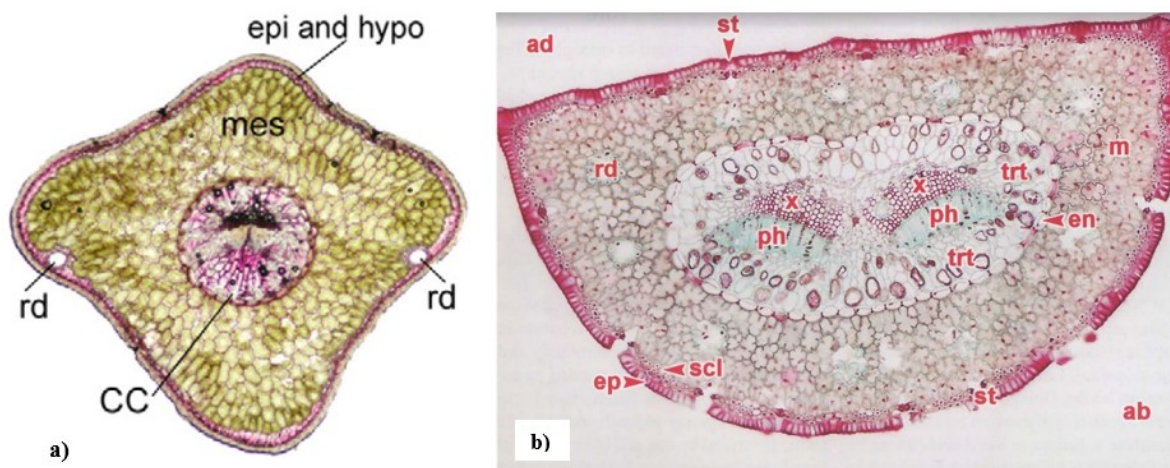
na palisádový a houbovitý parenchym (Obr. 3). Smrk má mezofyl nerozlišený. Tis červený (*Taxus baccata* L.) se vyznačuje několikavrstevným palisádovým parenchymem a nápadnými intercelulárami v houbovitém parenchymu (Buns a kol., 1993).



Obr. 3: a) Průřez jehlicí jedle obrovské (*Abies grandis* (Douglas ex D.Don) Lindley). Abaxiální strana (ab), adaxiální strana (ad), kutikula (cu), epidermis (ep), mezofyl (m), pryskyřičný kanálek (rd), průduch (st), cévní svazek (vb). Světelná mikroskopie (LM). Převzato a upraveno podle Lux a kol. (2019).

V mezofylu, na rozhraní s hypodermis, se nachází pryskyřičné kanálky. Vznikají schizogenně rozpuštěním střední lamely a rozestoupením buněk. Jejich počet a rozložení v pletivu se různí opět podle druhu. Borovice má kanálky rozmístěny po vnějším obvodu mezofylu a jejich počet se pohybuje mezi 6–10. U smrku je nalezneme po stranách jehlice, ale zpravidla je jen jeden či dva. Tis pryskyřičné kanálky postrádá (Wu a Hu, 1996).

Středem jehlice prochází střední válec, který je od mezofylu oddělen vrstvou endodermis, s typickými Caspariho proužky. Buňky středního válce jsou později silnostěnné a lignifikované. Ve středním válci se nachází jeden nebo dva cévní svazky s vodivými pletivy, xylémem na adaxiální straně jehlice a floémem na straně abaxiální. Vodivá pletiva zajišťují transport vody, minerálů a asimilátů. Pro borovici jsou typické dva cévní svazky, u smrku najdeme jen jeden (Obr. 4). V listech nahosemenných také najdeme jednotné transfúzní pletivo, ležící mezi endodermis či parenchymatickou pochvou a cévním svazkem. Transfúzní pletivo se skládá se z tracheid s lignifikovanou sekundární buněčnou stěnou, transfúzního parenchymu a albuminových buněk. Transfúzní parenchym se vyskytuje na vnitřní straně endodermis. Transfúzní parenchymatické buňky jsou charakteristické vakuolizovanými hyalinními protoplasty a některé mohou být bohaté na denzní obranné látky, jako je například tanin. Albuminové buňky jsou živou částí transfúzního pletiva a vždy je najdeme na laterálních stranách floému, mají bohatý obsah protoplastu a prominentní jádra (Hu a Yao, 1981).



Obr. 4: Příčné řezy jehlicemi a) Průřez jehlicí smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) H. Karst). b) Průřez jehlicí borovice černé (*Pinus nigra* J. F. Arnold). Abaxiální strana (ab), adaxiální strana (ad), epidermis (epi/ep), hypodermis (hypo), sklerenchym (scl), mezofyl (mes/m), endodermis (en), pryskyřičný kanálek (rd), centrální válec (CC), transfúzní pletivo (trt), floém (ph), xylém (x). LM. a) 80 μ m. Převzato a upraveno podle Lhotáková a kol. (2012) (a) a Lux a kol. (2019) (b)

Jehlice stejného druhu jehličnanů mají vždy složení pletiv stejné, což bylo popsáno výše, ale kvantitativně se může zastoupení jednotlivých pletiv lišit v závislosti na konkrétních podmínkách na stanovišti nebo v koruně stromu. Jedná se o schopnost adaptivního, či aklimačního vývoje jehlice, což dokazuje skutečnost, že heterogenní prostředí zvyšuje fenotypovou variaci (Meng a kol., 2019). Bez ohledu na taxonomické rozdělení, anatomie jehlice jasně souvisí s adaptací či aklimací na dané podnebí v rámci areálu výskytu. Například borovice ve středomořských klimatických zónách se zimními dešti, mají silné jehlice se zesílenou sklerenchymatickou vrstvou, povrchovými vosky a více pryskyřičnými kanálky. Pro aridní oblasti a období sucha jsou typické svazky jen o jedné jehlici a redukce povrchové plochy (Cole a kol., 2007). Nejdůležitějším morfogenním faktorem v koruně stromu je ozáření, která je primárně spojena se změnou tloušťky a šířky jehlice. Podle druhově specifické reakce na intenzitu světla se ovlivní objem středního válce, hypodermis a také objemový podíl mezofylu. Při zvětšujícím se ozáření se zvyšuje objem xylému, hypodermis a přibývá fotosyntetického pletiva. Jehlice tedy mívají při vyšší ozáření větší objem k celkovému povrchu a vrstva mezofylu se zvětšuje (Niinemets a kol., 2007) a s tím i souvisí, že průřez ozářenou jehlicí má tvar kruhový, zatímco stinná jehlice má průřez plošší (Kubínová a kol., 2018).

Stálezelené jehličnany si vyvinuly účinné fyziologické ochranné mechanismy, díky nimž jsou relativně odolné vůči stresu a funkční jehlice mohou na stromu setrvat celou řadu let (Gillies a Vidaver, 1990), což je energeticky velice výhodné. Například u zdravého smrku ztepilého může mít výhon až přes 10 ročníků zdravých jehlic. Fyziologické adaptace zahrnují například schopnost omezit ztrátu vody, systémy umožňující zbavení se reaktivních forem kyslíku a ochranu membrán a proteinů před extrémními teplotami či vysoušením (Gillies a Vidaver, 1990). Stále zelené jehličnany, jako je například borovice lesní (*Pinus Sylvestris* L.) či smrk ztepilý, rostoucí ve vyšších nadmořských výškách či vysokých

zeměpisných šířkách, mají jehlice s delší životností, než stejné druhy žijící jinde. Vliv na to má pravděpodobně nízká teplota v kombinaci s krátkým vegetačním obdobím a omezeným přísunem živin, ale také genetické a enviromentální faktory (Reich a kol., 1996).

4 Změny ve struktuře jehlice vyvolané působením atmosférického znečištění

Morfologickým změnám listu během životního cyklu stromu je věnováno více pozornosti kvůli prohlubujícím se změnám globálního klimatu (Pensa a kol., 2004), ale i přes mnoho studií je stále nejasné a také obtížné určit, které vlastnosti jehlic jsou více ovlivněny geneticky a které spíše vlivem životního prostředí (Meng a kol., 2019). V této kapitole se budu zabývat změnami ve struktuře jehlice, které vznikají vlivem antropogenního atmosférického znečištění. Nejdříve popíšu změny na makroskopické úrovni, tedy viditelné poškození rostliny a jehlice a následně se zaměřím na změny mikroskopické, na úrovni pletiva, buněk a organel.

Důležitými faktory způsobujícími strukturální a funkční poruchy, jsou v lesních ekosystémech, kromě přímých účinků plynných a vodních znečišťujících látek, i nepřímé účinky acidifikace půdy, vyluhování živin z listů a půdy a narušená funkce kořenů. V přírodě je stres ze znečištění často doprovázen klimatickým stresem, jako je sucho či mráz, což přispívá ke vzniku poškození. Proto je při zkoumání strukturálních změn potřeba znát příznaky stresů (Holopainen a kol., 1992).

Poškození rostlin může být akutní nebo chronické, v závislosti na koncentraci vzdušných polutantů a době trvání expozice, což může ovlivnit růst a výnos s vizuálními příznaky nebo bez nich, jak už jsem zmiňovala výše. Akutní poškození zahrnuje smrt buněk a je charakteristické pro vysokou koncentraci a krátkodobou expozici rostliny. Chronické poškození je naopak důsledkem dlouhodobé expozice rostliny s nízkou koncentrací daných škodlivin. V přírodě se mohou na jedné rostlině objevit oba typy poškození, v závislosti na životním cyklu rostliny a kolísavých koncentracích polutantů (Krupa a Manning, 1988). Například koncentrace O_3 jsou během roku víceméně konstantní, jen přes léto se s minimální odchylkou zvyšují. Koncentrace NO_2 jsou podobné jako u O_3 , ale naopak se lehce snižují v létě, zatímco koncentrace SO_2 se mění s mnohem znatelnými výkyvy. Nárůst průměrné koncentrace SO_2 bývá v zimním období oproti létu výrazně vyšší, v důsledku vyšší spotřeby energie člověkem (Slovik a kol., 1996).

4.1 Změny na úrovni celé rostliny

Působení nepříznivých faktorů má za následek poškození jehlic, což vede postupem času k vyššímu zastoupení poškozených jehlic vůči zdravým a následné defoliaci koruny. Na opad jehlic strom reaguje intenzivním dorůstáním primárních a sekundárních pupenů a dochází k postupné transformaci struktury koruny (Albrechtová a Lhotáková, 2019; Polák a kol., 2006). Symptomy poškození můžeme

sledovat pomocí indikátorů (markerů) fyziologického stavu rostlin. Tyto změny a symptomy jsou viditelné pouhým okem i z určité vzdálenosti od stromu. Zpravidla však nejsou prvotním indikátorem poškození a k jejich projevu dochází až v pokročilejší fázi poškození, v důsledku změn na ultrastrukturální a mikroskopické úrovni (Albrechtová a kol., 2017).

Z makroskopického měřítka se poškození SO₂ projevuje nespecifickým žloutnutím jehlic a jejich následným předčasným opadem (Slovík a kol., 1996), tedy urychlenou senescencí. Poškození ozonem se projevuje blednutím, drobnými žlutými či světle zelenými skvrnami a chlorózami na adaxiální i abaxiální straně jehlice (Obr. 5), která je vystavena plnému slunečnímu záření a s věkem jehlice se frekvence příznaků zvyšuje (Vollenweider a kol., 2003, 2013). Obvykle se jedná o malé, ohraničené chlorózy, které se nazývají bodové chlorózy. Tyto příznaky mají u mladých jehlic nerozlišené hranice a světlejší barvu, zatímco starší generace jehlic mají skvrny bronzovou až hnědou barvu s ostrými hranicemi (Vollenweider a kol., 2013). Projev příznaku může být ovlivněn houbovými chorobami či sáním hmyzu, což způsobí ostré ohraničení skvrn, jejichž podoba by byla bez napadení neohraničená (Šrámek a kol., 2007). Při závažném znečištění ozonem dochází ke tvorbě chlorotických skvrn, které jsou viditelně odlišné od příznaků vyvolaných jinými látkami znečišťujícími ovzduší (Miller a kol., 1996).



Obr. 5: Poškození smrku ozonem. Na smrkových jehlicích se účinek přízemního ozonu projevuje jako světlé (zelené, žluté, žlutozelené) skvrny (body, tečky). Na jehlicích se hromadění produktů vyvolaných oxidačním stresem může kumulovat, to znamená, že na starších jehlicích lze pozorovat silnější poškození. Převzato a upraveno podle (Šrámek a kol., 2007).

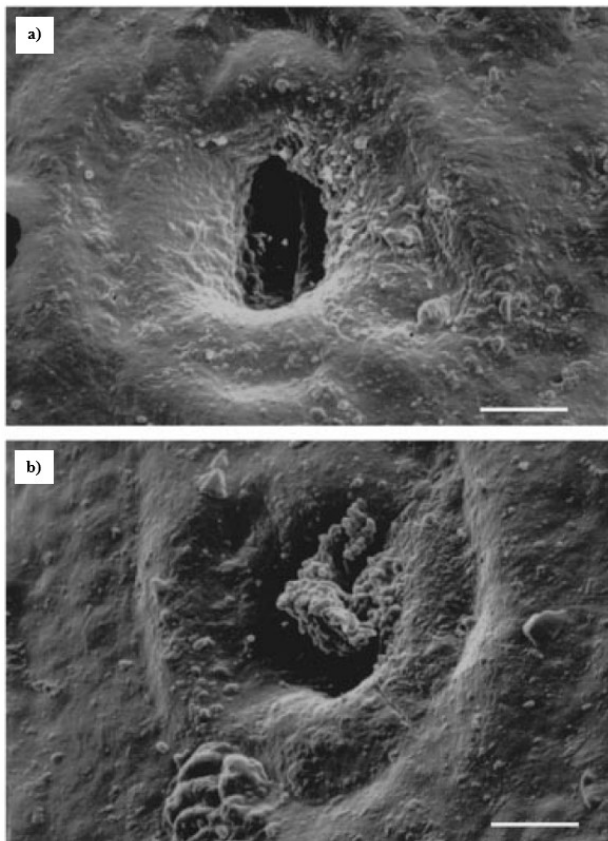
4.2 Změny na úrovni pletiva

V následujících dvou podkapitolách bych ráda představila vliv atmosférického znečištění na strukturu pletiv jehlice a zároveň nastínila i jeho negativní vliv na fyziologické procesy, neboť struktura a funkce jsou spolu neodmyslitelně spjaty. Nejprve anatomické změny popíšu kvalitativně a dále se zaměřím na studie, které anatomické změny kvantifikovaly.

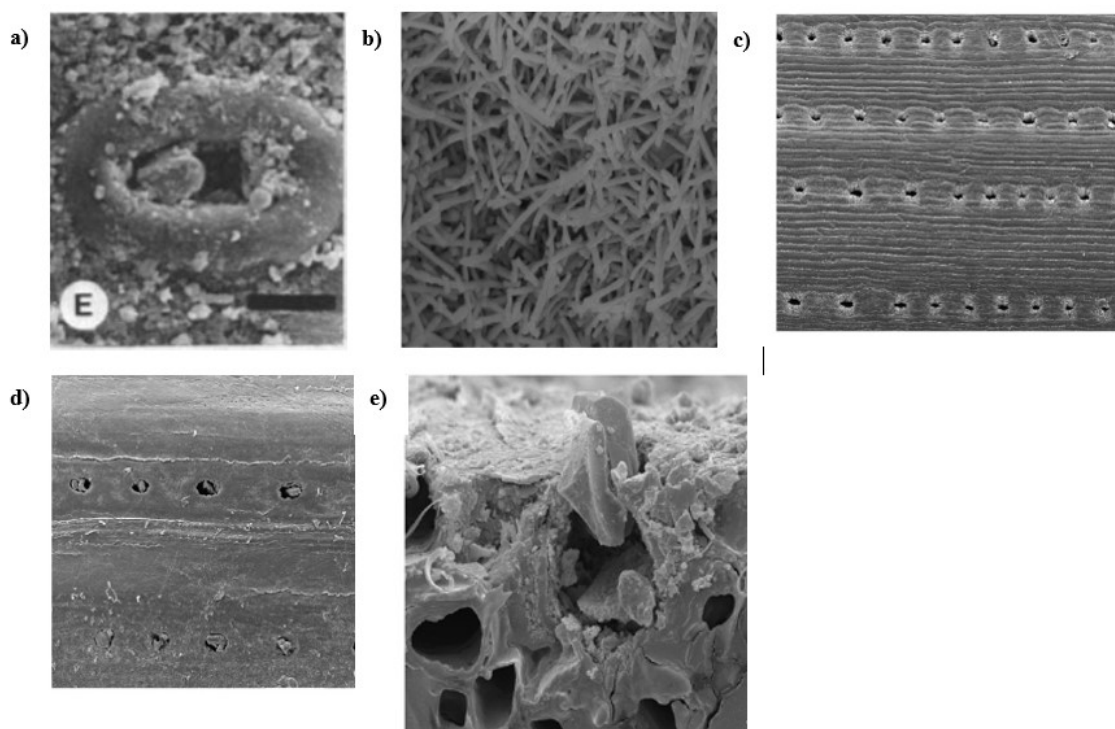
4.2.1 Kvalitativní strukturální změny

Abych navázala na předchozí kapitolu, uvádím demonstraci příčin viditelných nekrotických procesech a poškození vnitřních pletiv. K viditelným nekrotickým změnám dochází v důsledku degradace buněčné stěny mezofylových buněk, degradací chlorofylu, následuje plazmolýza buněčného obsahu a nakonec buněčná smrt (Miller a kol., 1996).

Atmosférické polutanty přichází nejdříve do styku s epikutikulárním voskem na povrchu jehlic. Účinky znečišťujících látek ovzduší na strukturu epikutikulárních vosků mají se zvyšující se depozicí a věkem jehlice za následek jejich postupnou degradaci (Meng a kol., 1995; Turunen a Huttunen, 1990). Dochází k fúzi tubulárních voskových krystalů v nadprůduchové prohlubni a jejich struktura se mění do podoby plochých vločkovitých útvarů (Obr. 7). Mohlo by se zdát, že tato změna struktury by mohla blokovat vstup plynů do průduchové prohlubni a tím narušit transpiraci a stomatální vodivost, tak to mu však pravděpodobně není. Co by ale mohlo stomatální vodivost snížit, je ukládající se prach v nadprůduchové prohlubni. Takovéto ukládání nečistot zjevně omezující funkci průduchů, bylo pozorováno u jehlic smrku ztepilého v Krušných horách, vystavených atmosférickému znečištění (Obr. 6) (Soukupová a kol., 2000). Se zvyšujícím se věkem jehlice byly zjištěny vyšší hladiny hliníku (Al), vápníku (Ca), křemíku (Si) a síry v předprůduchové prohlubni jehlice (Meng a kol., 1995). Voskové struktury na kutikule odrážejí a rozptylují fotosynteticky aktivní a UV záření, proto jakýkoli fytotoxický plyn, který tuto ochrannou vrstvu degraduje, způsobuje zvýšenou absorpci světla a možné fotooxidační poškození v jehlicích (Shepherd a Wynne Griffiths, 2006).



Obr. 6: Průduchy na jehlicích smrku ztepilého vystavených atmosférickému znečištění. a) Čistý průduch bez usazenin se zřetelnou průduchovou štěrbinou. b) Průduch zanesený nečistotou. (SEM). 10 μ m. Převzato a upraveno podle Soukupová a kol. (2000)



Obr. 7: Změna struktury epikutikulárních vosků. a) Voskové krystaly v podobě vločkovitých útvarů u borovice lesní, po vystavení znečišťujícím látkám. b) Tubulární podoba voskových krystalů nepoškozené jehlice. c) Abaxiální strana jehlice borovice halepské s neporušenou voskovou strukturou. d) Abaxiální strana jehlice s voskovou krustou na epidermis. e) Abaxiální strana jehlice s voskovým krystalem v nadprůduchové dutině a s postupně fúzujícími epikutikulárními vosky. (SEM). Převzato a upraveno podle Bartiromo a kol. (2012) (b, c, d) a Turunen and Huttunen (1990) (a).

Složení a struktura kutikulárních vosků se může lišit podle faktorů, které na rostlinu působí. Ovzduší znečištěné ozonem vede u jehlic smrku při dlouhodobých depozicích k výraznému snížení syntézy vosku *de novo*. U jehlic vystavení depozici SO₂ ke snížení syntézy vosku nedochází (Percy a kol., 1992). Kyselá depozice NO_x z dopravního znečištění způsobuje degradaci voskových krystalů (Viskari, 2000). Pro porovnání změny struktury epikutikulárních a epistomatálních vosků, při působení přírodních polutantů, uvádím následující studii. Bylo prokázáno, že vystavení jehlice vulkanickým plynům způsobuje fúzi či degradaci epikutikulárních a epistomatálních vosků. Za normálních podmínek je nadprůduchová prohlubeň pokryta velkým množstvím voskových krystalů a otvor průduchu je velký. Neustálé emise toxických sopečných plynů mohou způsobit změnu struktury vosku, zmenšení průduchového otvoru a v některých případech i kolaps a rozpad podprůduchové dutiny. Na jehlicích se dají nalézt krystaly CaSO₄, které pravděpodobně vznikají důsledkem reakce s vápníkem ze sopečného plynu, nebo vyluhovaného z jehlice. U jednoletých jehlic borovice halepské (*Pinus halepensis* Mill.), vystavených neustálé emisi sopečných plynů, mohou v okolí průduchů tubulární voskové krystaly fúzovat a vytvořit jednolitý celek, voskovou krustu (Obr. 7). K tomuto dochází ve větší míře na abaxiální straně jehlice než adaxiální. V nadprůduchových prohlubních je struktura vosků z části zachována, nebo také fúzují a vytvoří amorfni zátku (Obr. 7). Pozorování a měření v této studii naznačují, že tvorba voskové krusty

na epidermis jehlice je reakcí na síru. Jehlice se adaptuje a vytvoří mezní vrstvu, která zabrání vstupu toxických plynů do listu (Bartirromo a kol., 2012).

Sopečné události jsou důležitou součástí hromadného vymírání v historii Země, kdy došlo k výraznému poklesu biodiverzity. Předpokládá se, že tyto události jsou spojeny s uvolňováním vulkanického SO₂ (Shen a kol., 2011). Studie Elliott-Kingston a kol. (2014) je zaměřena na změny v kutikule jehličnanů, jako paleoindikátorů sopečné činnosti, z důvodu nedostatku existujících metod pro přímou detekci vlivu vulkanického SO₂ na rostliny v geologické minulosti. Při přímé expozici SO₂ zkoumané jehlice vykazují změnu ve sktruktuře povrchových vosků, tubulární struktura vosku nebyla zaznamenána u žádného druhu, dochází k fúzi voskové struktury. U jehlic damaroně jižního (*Agathis australis* (D. Don) Steudel) se zdá, že má v okolí poškozených stomat vyšší vrstvu vosku, což je v rozporu s výsledky studie autorů Percy a kol. (1992), ve které u jehlic smrku k nárustu vosku nedocházelo. Možná je to způsobeno odlišným chemickým složením vosků, či procesu syntézy vosku u jednotlivých druhů jehličnanů. K nárustu voskové vrstvy v okolí stomat došlo i u wolemie (*Wollemia nobilis* W. G. Jones, K. D. Hill & J. M. Allen) a povrch jehlice byl pokryt jednotlivými menšími strukturami vosku, namísto hustého pokrytí voskem u nepoškozené jehlice. Další poškození bylo v podobě vyčnívajících puchýřovitých lézí na povrchu jehlic a docházelo k deformaci stomatálního komplexu.

Vyšší koncentrace SO₂ a NO_x v ovzduší má negativní dopad na fyziologický stav jehličnanů. Dochází především ke změně pH v buňkách. Atmosférické polutanty vstupují do jehlice přes průduchy pomocí difuze, stejně jako CO₂. Uzavření průduchu lze ovlivnit průchodnost polutantů přes epidermis a míru poškození (Heath, 1980). Po průchodu SO₂ skrz průduch do intercelulárního prostoru dojde k reakci s vodou za vzniku kyseliny sírové (H₂SO₄), která je pro jehlice toxická. H₂SO₄ je následně v buňkách redukována a dojde k oxidaci glutathionu a uvolní se H⁺ ionty, které snižují pH v cytoplazmě (Mehlhorn a kol., 1986; Pfanz a Heber, 1986). Jelikož mezofylové buňky jsou kyselým pH zasaženy jako první, dochází k poklesu efektivity fotosyntézy a transpirace (Heath, 1980). Glutathion je antioxidant, jehož obsah a redukční stav může sloužit jako ukazatel při fyto toxickém účinku atmosférických polutantů. Při detekci oxidačních procesů je glutathion pravděpodobně nejcitlivějším krátkodobým ukazatelem, další a méně citlivé antioxidanty jsou obsah vitamínů E a C (Mehlhorn a kol., 1986).

Ke změně pH, vlivem koncentrací SO₂ a NO₂ v atmosféře, dochází i u deště a nazýváme ho deštěm kyselým. Voda se do atmosféry dostává ve formě vodní páry z evaporace a transpirace bez příměsí dalších látek. V atmosféře však voda začne kondenzovat na pevných částicích a dosáhne rovnováhy s atmosférickými plyny. Jelikož se CO₂ ve vodě rozpouští, vytvoří se kyselina uhličitá (H₂CO₃), která je slabou kyselinou. Déšť je tedy přirozeně lehce kyselý (5.6 pH). Ostatní látky, které se do atmosféry dostanou, posouvají hodnotu pH. SO₂ je v atmosféře oxidován na SO₃ a po rozpuštění tvoří H₂SO₄. NO_x se podobně přeměňují na kyselinu dusičnou (HNO₃). Pokud jsou tyto kyseliny přítomny ve vyšším množství, mohou okyselit dešťové srážky pod 5.6 pH (Likens a kol., 1979).

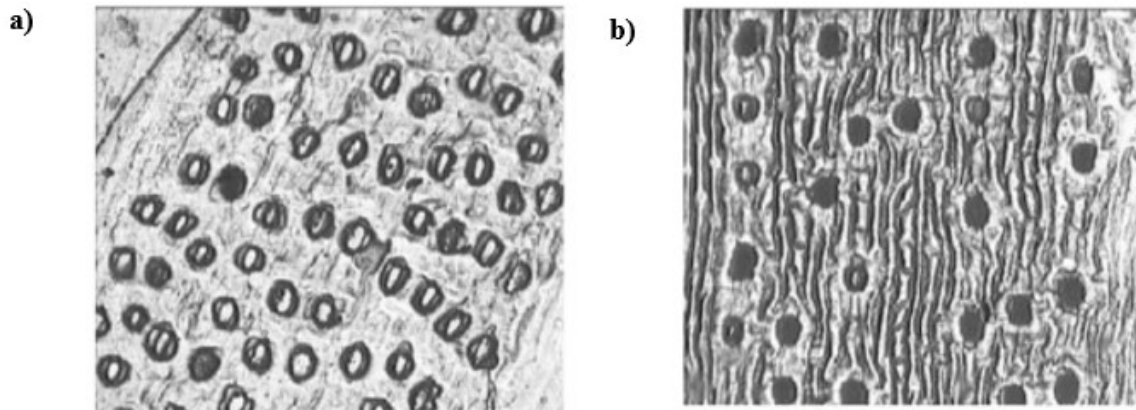
Kyselý déšť může mít následně za následek uvolňování kationtů z povrchu jehlic. Povrchový obsah Ca^{2+} se na 4 nebo 5letých jehlicích snižoval se zvyšující se depozicí SO_2 a povrchové koncentrace S se nezměnily, oproti tomu koncentrace Ca^{2+} a S se v jehlicích zvyšovaly se zvyšující se depozicí SO_2 (Meng a kol., 1995). Tato nedostatečná korelace mezi povrchovými a vnitřními koncentracemi naznačuje, že přenos Ca^{2+} iontů z vnitřních prostor jehlice na povrch je pravděpodobně pomalý a translokace či difúze k rychlému naplnění rovnovážného stavu nestačí. Snižené koncentrace Ca^{2+} na povrchu jehlice naznačují, že postupně se usazující síra, ať už při mokré či suché depozici, může mít za následek zrychlené vyluhování Ca^{2+} z povrchu jehlice (Meng a kol., 1995). Ca^{2+} jsou důležití druzí poslové při přenosu signálu v reakci na environmentální podněty. Zejména u jehličnanů ovlivňují propustnost a stabilitu membránové struktury. Protony uvolněné disociací kyseliny sírové vytěsňují Ca^{2+} ionty z těsného sousedství plazmatické membrány, následkem toho se narušuje stabilizační funkce Ca^{2+} a plazmatická membrána se destabilizuje, což zhoršuje fyziologické reakce k environmentálním stresům (DeHayes a kol., 1999; Elliott-Kingston a kol., 2014).

Atmosférické znečištění a kyselý déšť mají negativní vliv na chemické vlastnosti a složení půdy, dochází též k jejímu okyselení. Stejně jako z povrchu jehlice, tak i z půdy se uvolní a vymývají bazické kationty Ca^{2+} , Mg^{2+} a K^+ , které jsou takto snadno odplavitelné deště, v daném místě rostlinám chybí a dochází k nutričnímu stresu (Huete a Mc Coll, 1984). Deficience Mg^{2+} hraje klíčovou roli při expozici SO_2 či O_3 , má za následek žloutnutí a snižování obsahu chlorofylu v jehlici. Malé jehlice mladých smrků na tento deficit odpovídají sníženou tvorbou palisádového parenchymu (Siefertmann-Harms a kol., 2005; Slovák a kol., 1996). Snižování obsahu chlorofylu a žloutnutí jehlic je spojeno s úbytkem fotosyntetických pigmentů – chlorofyl a, chlorofyl b a snižuje se i obsah karotenoidů (Lukjanova a kol., 2013).

4.2.2 Kvantitativní strukturální změny

V důsledku rostoucího obsahu znečišťujících látek v ovzduší se může měnit velikost jehlice a také hustota stomat na jejím povrchu. V bělehradských parcích byla prováděna studie na různých druzích jehličnanů (Nikolić a kol., 2019) a zaměřila se i na změnu v anatomii jehlice při pěti stupních znečištění (I – nejnižší stupeň znečištění; V – nejvyšší stupeň znečištění). V silně znečištěných parcích byly jehlice výrazně kratší a to zejména u jedle bělokoré (*Abies alba* Mill), jedle ojínné (*A. concolor* (Gord. Et Glend.) Lindl. Ex Hildebr), smrku ztepilého a tisů červeného. V důsledku toho, měly druhy s kratšími jehlicemi větší hustotu průduchů (Obr. 8). Dochází však i ke zvětšování délky jehlic, jako například u borovice černé a smrku omorika (*P. omorika* (Pančić) Purk.). Hustota průduchů se u nich zvýšila, ale ne tak markantně, dokonce byla vyšší na IV. než na V. stupni znečištění. Je zajímavé, že douglaska tisolistá (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) měla v oblasti s nejvyšším znečištěním jehlice delší, než v oblasti středně znečištěné (III) a hustota stomat se u ní zvyšovala se zvětšující se mírou znečištění. Dle výsledků studie mělo mnoho druhů v oblastech IV. a V. stupně znečištění hustotu stomat největší, pole autorů se to ale nedá pokládat za spolehlivý ukazatel znečištěného ovzduší (Nikolić a kol., 2019).

Domnívám se, že ke zvyšující se hustotě průduchů u douglasky dochází v důsledku zvětšení délky jehlice a potřeby rozprostřít průnik polutantů do jehlice více průduchy a tím zmírnit stresovou zátěž. Také to může být vysvětleno tím, že menší průduchy jsou citlivější k pohybům a vstup polutantů do jehlic může být snáze regulován.



Obr. 8: Řady stomat na povrchu jehlice. a) jedle bělokoré v V. stupni znečištění. b) jedle ojiněné ve III. Stupni znečištění. (SEM). Převzato a upraveno podle Nikolić a kol. (2019).

Kvantitativní analýzy strukturálních parametrů jehlic mohou odhalit potenciální rozdíly v poměrném zastoupení pletiv, které může ovlivnit citlivost různých druhů jehličnanů na negativní účinky znečištěného ovzduší. U smrku pichlavého (*Picea pungens* Engelm.) může hustá vrstva kutikuly minimalizovat možný kontakt buněk epidermis se znečišťujícími látkami rozpuštěnými v dešťové vodě. Silnější vrstva sklerenchymatické hypodermis může také sloužit jako účinná bariéra proti polutantům pronikajícím do mezofylu (Soukupová a kol., 2001).

Při vysokých depozicích O_3 dochází v jehlici ke změnám v proporcii pletiv. U smrku ztepilého se zvýší podíl epidermis a hypodermis, podíl mezofylového pletiva se naopak sníží a sním i podíl mezibuněčného prostoru a podíl endodermis se nepatrně zvýší (Obr. 9). Tyto reakce naznačují zvýšenou obranu proti oxidativnímu stresu (Kivimäenpää a kol., 2017). Snížením podílu mezibuněčných prostor se snižuje počet buněk mezofylu, interagujících s ozonem a jinými plynnými znečišťujícími látkami (Soukupová a kol., 2001). Jelikož došlo ke snížení podílu poměrného zastoupení středního válce, včetně xylému a floému, můžeme se domnívat, že O_3 ovlivnil transport vody, minerálů a asimilátů přes endodermis (Kivimäenpää a kol., 2017).

	C	T	O	OT
Délka jehlice (mm)	10.4	11.2	10.9	10.4
Příčný řez jehlice (mm ²)	0.332	0.311	0.332	0.285
Hustota stomat (no.·mm ⁻²)	166	149	143	149
Epidermis (μm)	13.5	12.9	14.7	13.7
Hypodermis (μm)	12.5	11.8	13.7	12.2
Mezofyl (%)	76.2	77.7	75.9	74.5
Mezibuněčný prostor – abaxiální strana (%)	31.3	33.7	30.9	38.0
Mezibuněčný prostor – adaxiální strana (%)	36.0	36.3	30.2	37.2
Endodermis (%)	2.2	2.1	2.3	2.5
Střední válec (%)	5.2	5.3	5.2	5.9
Sklerenchym (%)	8.1	7.8	7.0	8.9
Floém (%)	4.8	5.1	4.0	4.8
Xylém (%)	5.5	5.4	5.3	4.5

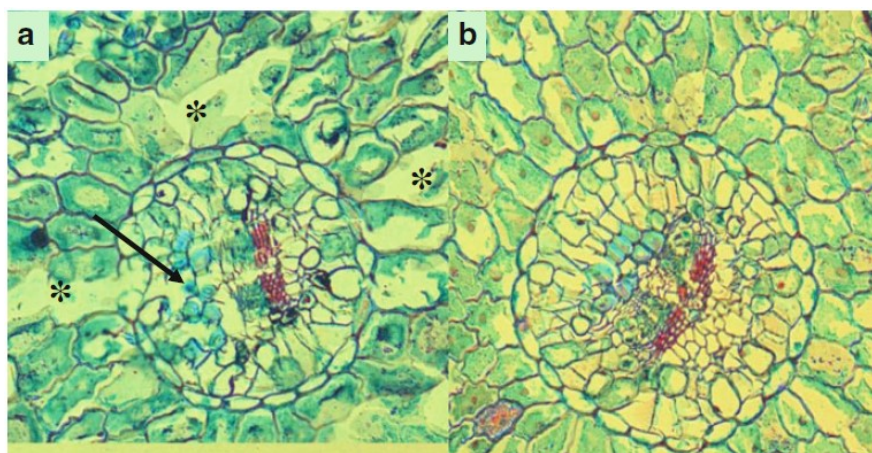
Obr. 9: Tabulka zaznamenávající změny ve struktuře pletiv u jednoletých jehlic smrku ztepilého. Kontrola (C), vyšší teploty (T), ozon (O), působení vyšších teplot i ozonu (OT). Převzato a upraveno podle Kivimäenpää a kol. (2017).

Jak už jsem zmínila v úvodní kapitole týkající se vzdušných polutantů, globální klimatická změna je v dnešní době velice aktuální téma a ráda bych tedy představila i další výsledky studie Kivimäenpää a kol. (2017) související se změnou zastoupení pletiv v jehlici. Jejich experiment spočíval v pozorování anatomické aklimace jehlic smrku ztepilého a borovice lesní, v interakci s oteplováním a depozicí O₃. U smrku oteplování zvýšilo podíl mezibuněčného prostoru v mezofylu a snížilo výměnu plynů, růst výhonů, jehlice byla užší a vrstvy epidermis a hypodermis tenčí. U borovice se naopak jehlice oteplováním prodloužily, včetně většího růstu výhonků a stonku, zvýšil se počet stomatálních řad a také objemový podíl centrálního válce, xylému a floému, naopak se snížil objemový podíl mezofylu. Ozon u obou druhů způsobil zahuštění vrstev epidermis a hypodermis a nižší stomatální vodivost. U smrku ozon snížil hustotu stomat, což je zajímavé v porovnání se studií Nikolić a kol. (2019), kde se u smrku z bělehradského parku naopak hustota stomat zvýšila. Domnívám se, že je to dáno prostředím, kde se smrky nacházely a mírou znečištění. V městském parku na smrk působilo více polutantů a případně i limitujících stresových faktorů prostředí, zatímco na smrk rostoucí na volném prostranství působil jen ozon. Nedá se říct, že vyšší hustota stomat byla dána stářím jehlice a delší dobou expozice, protože stáří jehlic z aktuální studie jsou dva roky a jehlice z bělehradského parku byly staré jen jeden rok.

U borovice ozon snížil růst jehlice, ale zvýšil podíl floému, xylému a sklerenchymu. Z výsledků je patrné, že se borovice aklimovala na současné a budoucí zvyšující se koncentrace ozonu bez výrazných růstových ztrát. Při dlouhodobé aklimaci na zvýšené hladiny ozonu a teploty hraje zásadní roli stomatální reakce. Jehlice borovice při vystavení vyšším teplotám a ozonu zároveň inklinovaly ke zvýšení hustoty průduchů. Tyto výsledky naznačují, že smrk ztepilý může v budoucích klimatických podmínkách se zvyšující se teplotou trpět, zatímco borovice může prosperovat (Kivimäenpää a kol., 2017).

Nejen kyselá depozice navozuje kvantitativní změny pletiv. Autoři Lukjanova a kol. (2013) se ve své studii zaměřili na vegetaci smrku ztepilého rostoucího v okolí cementárny. Prach emitovaný z cementárny má obvykle vysoké pH a způsobuje alkalizaci území obklopující zdroj emisí. Přestože emise

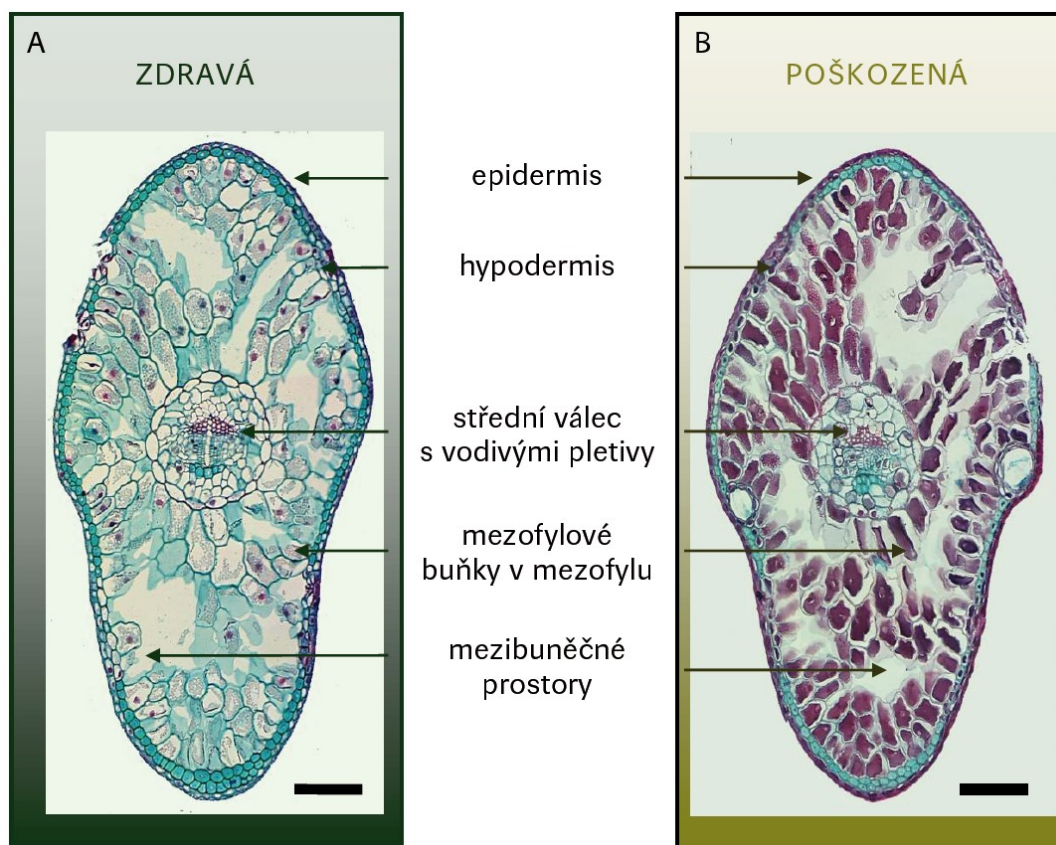
prachu měly v roce 1996 ustát, tak i po 14 letech byly rozdíly v chemické složení půdy značné, oproti půdě mimo dosah emisí z cementárny. V analýze byly porovnány jehlice vystavené znečištění z cementárny a kontrolní jehlice ze znečištěné oblasti. Autoři došli k závěru, že jehlice z nejvíce znečištěné oblasti měly největší celkovou plochu příčného řezu, což bylo dáno vysokým nárůstem buněk epidermis a mezofylu. Naopak procentuální podíl pletiva s cévními svazky se snížil. Kromě toho byly floémové a mezofylové buňky jehlic ze zasažené oblasti poškozeny více, než v místech s nižší mírou znečištění (Obr. 10). I když se tedy v alkalickém prostředí podíl mezofylu na řezu zvětšil, snížil se fotosyntetický potenciál stromů, jelikož se zvýšil počet poškozených mezofylových buněk a snížila se koncentrace chlorofylu.



Obr. 10: Příčný řez jednoleté jehlice smrku, zobrazující mezofyl a střední válec s cévním svazkem. a) Poškozené buňky mezofylu (*) a floému (→) z nejvíce zasažené oblasti. b) Průřez zdravou kontrolní jehlicí. (LM). Převzato a upraveno podle Lukjanova a kol. (2013).

4.3 Změny na buněčné úrovni

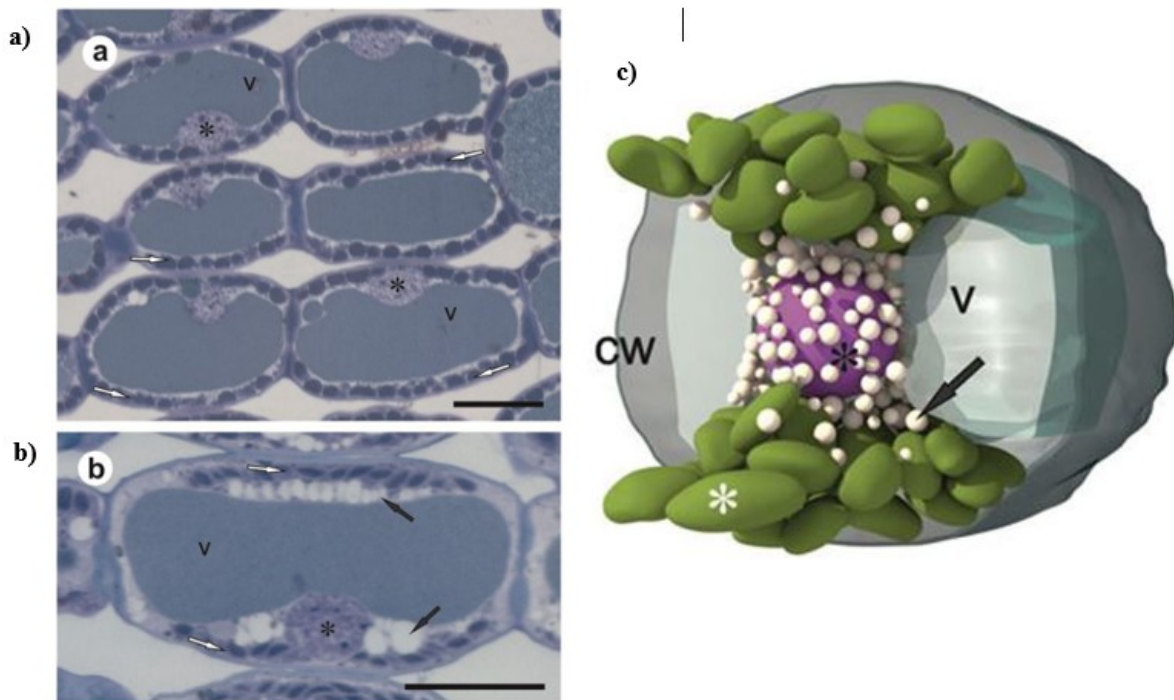
Buněčné struktury jehlice jsou nejčastěji studovány pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) nebo světelné mikroskopie (LM), často s využitím histochemických barvicích metod (Obr. 11). Většina mikroskopických studií se v případě vzdušných polutantů zaměřuje na jehlice, protože znečišťující látky nejprve prochází skrz průduchy a tudíž se očekává, že právě zde se objeví první účinky (Kivimäenpää a kol., 2005). V nejranější fázi znečišťující látky narušují citlivé biochemické procesy rostlinných buněk, tyto zásahy se posléze objeví na ultrastrukturální úrovni. Ultrastrukturální studie má možnost odhalit časné příznaky poškození, způsobené vzdušnými polutanty a jinými stresy dlouho předtím, než se objeví viditelná poškození a také může být použita jako pomůcka při identifikaci místa působení a mechanismů poškození souvisejících se známými stresy (Holopainen a kol., 1992). Dnes se dává přednost nedestruktivním indikátorům stresu, například na bázi odrazivosti jehlic použitím spektroskopie (Lhotáková a kol., 2013).



Obr. 11: Celkový řez zdravé a poškozené jehlice smrku ztepilého. A) Jehlice se zřetelnými chloroplasty rozmístěnými rovnoměrně v cytoplazmě mezofylových buněk, tvorba centrální vakuoly není příliš pokročilá a fenolické látky se ve vakuolách téměř nevyskytují. B) Jehlice s výraznou akumulací fenolických látek v centrální vakuole, nezřetelné chloroplasty v silně poškozených mezofylových buňkách, plazmolýza patrná po celém obvodu buňky. (LM). 200 μ m. Převzato a upraveno podle Albrechtová a kol. (2017).

Při pozorování buněčných struktur je také třeba počítat se změnou ultrastruktury vlivem střídání ročních období. Na podzim a na jaře procházejí nadzemní části jehličnanů intenzivními fyziologickými a biochemickými změnami. Tyto změny se primárně týkají ultrastruktury mezofylových buněk – změny v umístění a orientaci organel a v množství skladovaných látek (Holopainen a kol., 1992). Jelikož tenké řezy jehlicemi neposkytují úplné informace o dynamice polohy organel, byla na smrku pichlavém a smrku sibiřském (*Picea obovata* Ledeb.) provedena studie, která propojila příčné a podélné řezy s 3D rekonstrukcí. Během růstového období jsou chloroplasty čočkovitého tvaru rovnoměrně rozmístěny v jedné vrstvě, blízko buněčné stěny a po celém obvodu buňky, jen v místě kontaktu se sousední buňkou zpravidla chybí (Ovsyannikov a Koteyeva, 2020). Tato pozice je nejvýhodnější z hlediska absorpce světla a efektivní fotosyntézy (Holopainen a kol., 1992). Značnou část buňky zabírá centrální vakuola a jádro se nachází uprostřed jedné z příčných stěn. Při přechodu do zimní dormance se v prvotní fázi v buňce vyskytuje velké množství drobných průhledných vakuol, které jsou umístěny v cytosolu mezi centrální vakuolou a chloroplasty. Tyto drobné vakuoly začnou tvořit kontinuální řetězec mezi dvěma bočními stěnami buňky. Během přechodného období, mezi podzimem a zimou je tvar chloroplastů ne-

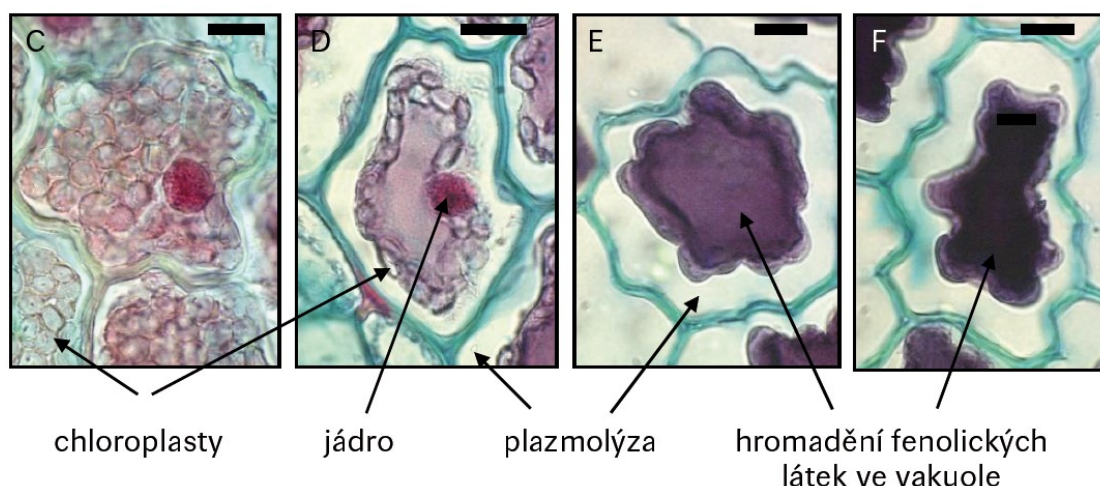
pravidelný se zvyšujícím se objemem stromatu. Drobné vakuoly nakonec vytvoří uprostřed buňky cytoplazmatické vlákno, obsahující ještě mitochondrie a lipidové kapénky a uprostřed tohoto vlákna se nachází jádro obklopené drobnými vakuolami (Obr. 12) (Ovsyannikov a Koteyeva, 2020). Tato reorganizace cytoplazmatických organel, snížení objemu centrální vakuoly a obohacení o drobné vakuoly se děje jako prevence proti poškození ledovou krystalizací.



Obr. 12: Struktura mezofylových buněk smrku pichlavého. a) Podélný řez mezofylovými buňkami v červenci. b) Podélný řez mezofylovými buňkami v říjnu. Vakuola (V), jádro (*), chloroplasty (bílá šipka), drobné vakuoly (černá šipka). c) Zobrazení 3D rekonstrukce zimní buňky s cytoplazmatickým provazcem tvořeným z drobných vakuol. Centrální vakuola (CW), vakuola (V), jádro (*); a, b – (LM), 20 μm . Převzato a upraveno podle Ovsyannikov a Koteyeva (2020).

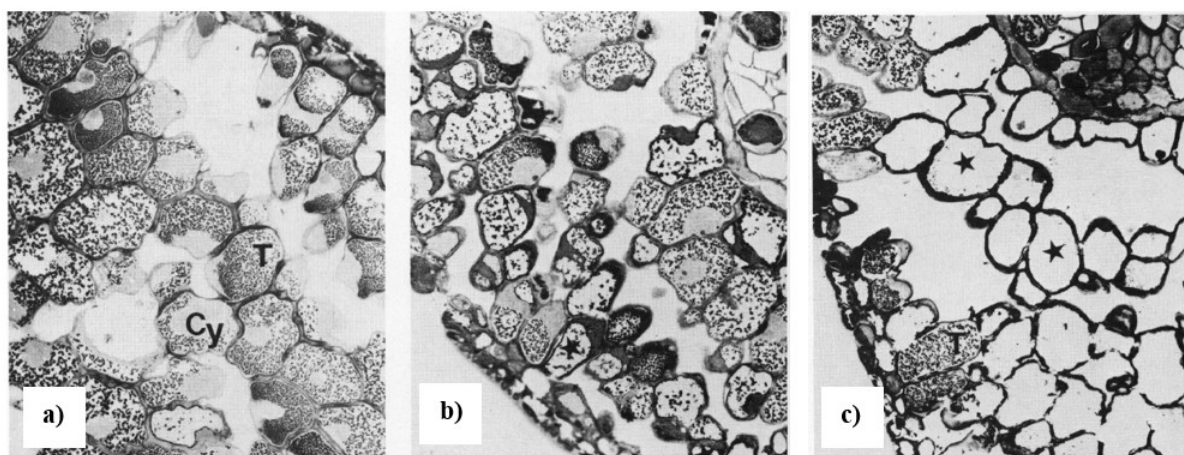
4.3.1 Změny způsobené sírou a jejími oxidy

Z atmosféry se do jehlic dostává síra ve formě SO_2 skrz průduchy a poškozuje okolní mezofyl (Holopainen a kol., 1992). Míru poškození lze identifikovat podle akumulace fenolických látek, především taninu. Zdravá jehlice má mnohočetné chloroplasty vyskytující se rovnoměrně v cytoplazmě buněk mezofylu, centrální vakuola nezabírá příliš mnoho místa a hromadění fenolických látek je zanedbatelné (Obr. 13) (Albrechtová a kol., 2017). Ve studii autorů Soukupová a kol. (2000) byla v pletivech poškozených jehlic smrku ztepilého pozorována výrazná koncentrace fenolických látek ve většině vakuol a buněčných stěn. Největší akumulace byla v okolí pryskyřičných kanálek a podprůduchové dutiny, nebo v malých buňkách, které měly zahojit místa poškozená hmyzem či plísňovou infekcí.



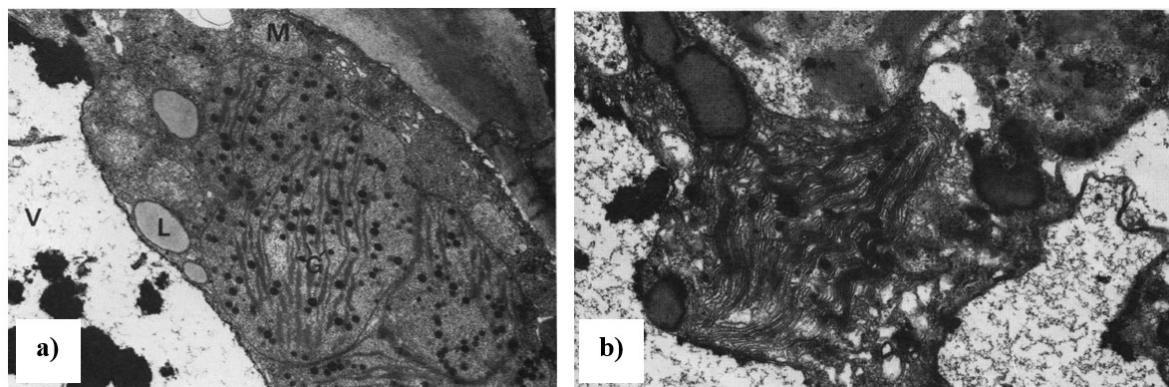
Obr. 13: Detaily mezofylové buňky jehlice smrku ztepilého. C) zdravá mezofylová buňka smrku ztepilého s jasně ohraničenými a zřetelnými chloroplasty, jádrem a nízkou akumulací taninových látek. D) Počáteční stádium poškození mezofylové buňky s počínajícím hromaděním taninů ve vakuole a tvorba plazmolýz, jádro zřetelné. E) Silně poškozená mezofylová buňka s patrnou plazmolýzou po celém obvodu buněčné stěny, jádro již není zřetelné. F) Dezintegrace mezofylové buňky – jádro a jednotlivé chloroplasty jsou nezřetelné, ve vakuole je extrémní množství fenolických látek. (LM), 10 μ m. Převzato a upraveno podle Albrechtová a kol. (2017).

Poškození buněk SO_2 lze pozorovat v několika fázích (Obr. 14). V první fázi poškození je tanin patrný jako tenký lem u buněčné stěny a občas je viditelný v podobě granulí nebo rozptýlených částic v centrální vakuole, zatímco v zdravých buňkách se vyskytuje pouze v podobě granulí. V druhé fázi už tanin tvoří tlustý lem a granulí se v buňce nachází jen pár, cytoplazma je velmi tmavá. V třetí fázi může být buňka docela prázdná a skládá se pouze z buněčných stěn a taninu. Tanin tvoří tlustý lem a cytoplazma nejde rozeznat. Tyto stádia jsou velmi podobná u smrku i borovice. V prvním a druhém stádiu byly zasaženy buňky v okolí průduchů a epidermis a poškození bylo mírné. Třetí fáze už zasahuje i do buněk mezofylu a poškození je pokročilejší. Ve své studii smrku a borovice došel Soikkeli (1981) k závěru, že překročili podíl poškozených buněk 24-28 %, je toto poškození patologické.



Obr. 14: Poškození buněk mezofylu smrku ztepilého. a) Normální zimní struktura buněk s granulovým taninem (T) a světlou cytoplazmou (Cy). b) Zasažené buňky v první fázi poškození. c) Zasažené buňky v třetí fázi poškození. (LM), $\times 250$. Převzato a upraveno podle Soikkeli (1981).

Na ultrastrukturální úrovni lze pomocí TEM pozorovat poškození ve změně struktury chloroplastů. Dochází k redukci lamel mezi grany, i samotných gran (Obr. 15) a chloroplasty zaujímají kulovitý tvar. Tylakoidy se vlní a otékají (Obr. 15) (Soikkeli, 1981). U silných krátkodobých expozic SO₂ dochází k rozvolnění tylakoidů a snížení syntézy škrobu, zatímco u dlouhodobých expozic s nízkou úrovní znečištění se zvyšuje akumulace lipidů, kulatých chloroplastů a plastoglobulů (Holopainen a kol., 1992).



Obr. 15: Poškození chloroplastů. a) Mírné poškození charakteristické redukcí gran (G) v mitochondrii (M), normální zimní lipid (L) a centrální vakuola (V). b) Typ poškození se zvlněnými tylakoidy. Oba obrázky zobrazují příčný řez jehlicí borovice. (TEM), a) 3 × 18 000; b) 4 × 24 000. Převzato a upraveno podle Soikkeli (1981).

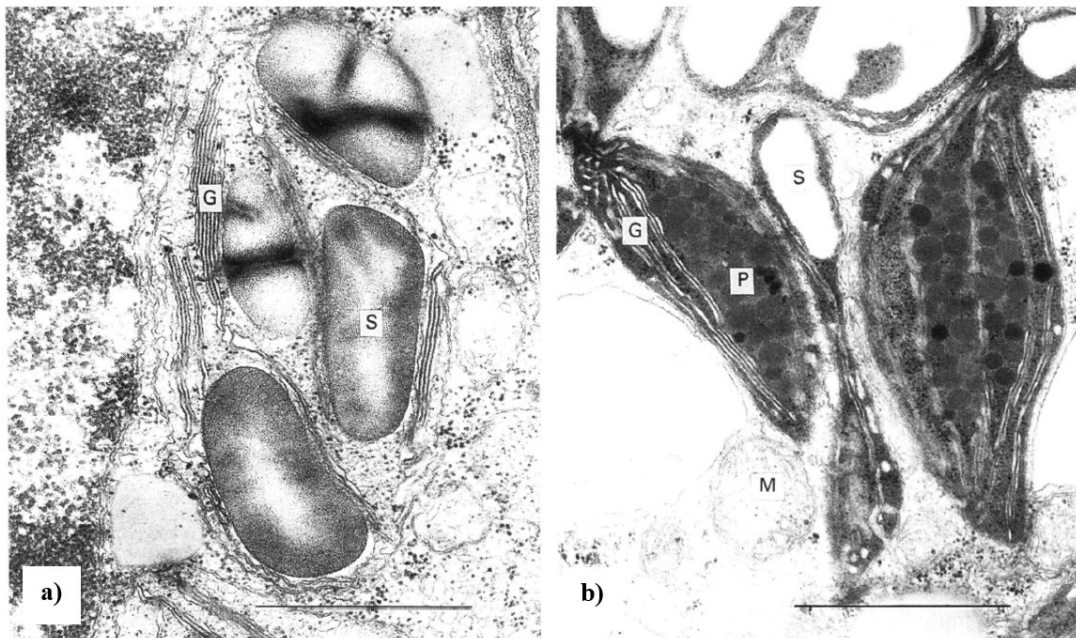
Jak už jsem se zmiňovala výše, poškození je rozdílné v závislosti na ročním období. Obecně se dá říct, že nejvíce náchylné k SO₂ jsou jehlice na počátku vegetačního období a velice rychle začnou vykazovat známky poškození (Manninen a Huttunen, 2000). Soikkeli a Tuovinen (1979) ve své studii, která probíhala do konce června, zjistili, že u smrku ztepilého lze pozorovat dva hlavní typy poškození – první od ledna do dubna a druhý od dubna do června. U prvního typu se v lednu v poškozených buňkách vyskytují kulovité chloroplasty s redukovanými grany, která jsou obvykle spojena dvěma až třemi intergranálními tylakoidy. Od března do dubna lamely mohutní a chloroplasty jsou kvůli tomu velmi napnuté, od dubna již téměř k prasknutí a celá buňka má granulární a vezikulární vzhled. Následkem popsanych změn v ultrastruktuře chloroplastů buňka pravděpodobně kolabuje. Druhý typ poškození začíná tím, že se plastoglobuly stanou elektron-translucentní a posléze jsou v těsném okolí chloroplastu k vidění malé lipidové kapky. Tvar plastoglobulů se často mění a jejich počet se zvyšuje. Intergranální tylakoidy se v tomto stádiu zredukují, nebo jsou normální.

4.3.2 Změny způsobené ozonem

Troposférický ozon je považován za nejvýznamnější vzdušný polutant pro lesy (Paoletti a kol., 2010). Jehličnany jsou známé svou relativní tolerancí vůči krátkodobým expozicím, viditelné příznaky a vliv na růst rostliny nastávají většinou až po delší době (Langebartels a kol., 1998). Viditelné poškození ve formě chlorotických skvrn bylo ve výzkumu Sutinen a kol. (1990) pozorováno po třech letech expozice s tím, že u starších jehlic, kvůli kumulativním účinkům ozonu, dochází k vážnějšímu poškození

dřív, než u jehlic mladších. Hlavní faktor, určující absorpci ozonu, je vodivost stomat na jehlici, která je ovlivněna sezónními výkyvy a množstvím dopadajícího světla (Kivimäenpää a kol., 2004; Wieser, 2000). Největší tok plynů skrz stomata je během vegetačního období a na zimu je téměř potlačen, na jaře a na podzim se odvíjí od sezónních teplot. Vodivost se také zvyšuje s rostoucí nadmořskou výškou a liší se v závislosti na věku stromu a jehlice, klesá s rostoucím věkem a to jak na slunci, tak i ve stínu (Wieser, 2000).

Při pozorování jehlic smrku při expozici ozonu dochází ke změnám v několika fázích, nejdříve na úrovni chloroplastů, zmenší se jejich délka a naopak se zvýší hustota stroma, hromadí se v nich grana, škrobová zrna jsou menší a ubývá množství tylakoidních membrán. V horní vrstvě buňky se zvětší počet plastoglobulů (Obr. 16). V druhé fázi už jsou změny pozorovány na úrovni chloroplastů. V třetí fázi jsou strukturální změny viditelné ve všech buněčných organelách, včetně mitochondrií a cytoplazmy (Sutinen a kol., 1990).

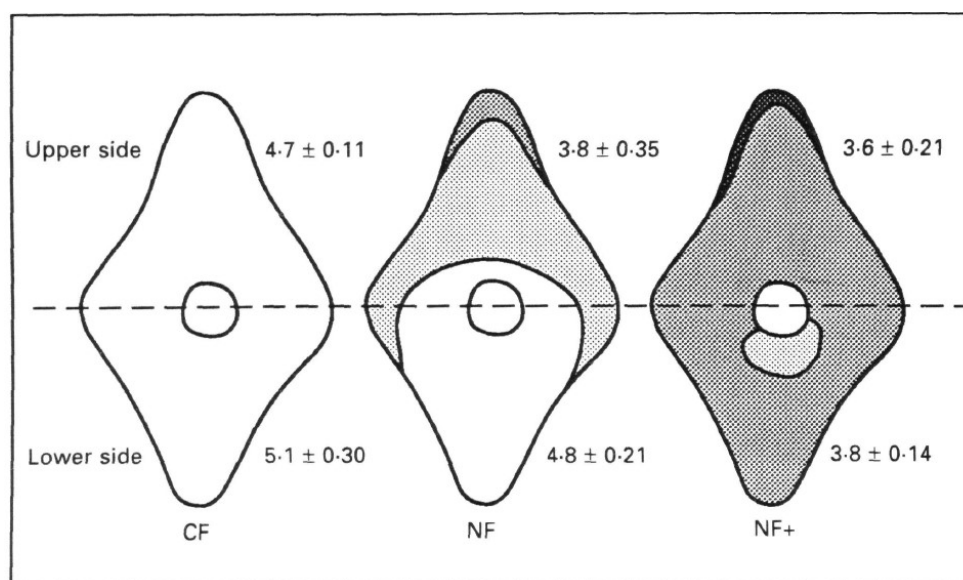


Obr. 16: Detail chloroplastu u jehlice smrku ztepilého. a) Chloroplast v neporušené buňce. b) Chloroplasty v porušené buňce vystavené expozici vzdušných polutantů a ozonu. Elektron-denzní stroma redukovaného chloroplastu bohaté na grana (G), plastoglobuly (P) a menší škrobové zrno (S). (TEM), 1 µm. Převzato a upraveno podle Sutinen a kol. (1990).

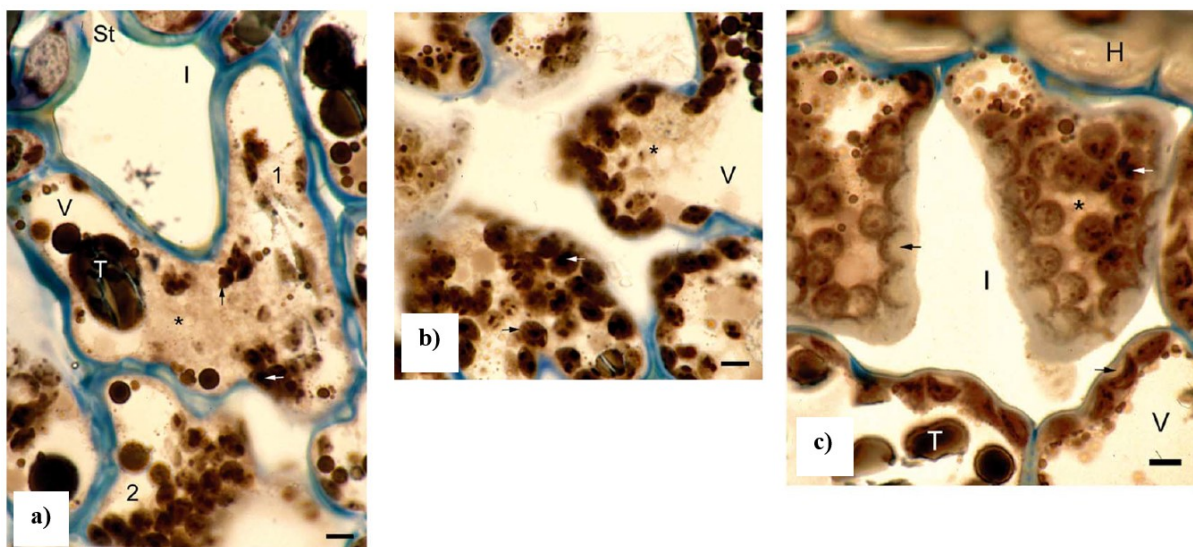
Poškození se však netýká jen svrchní buněčné vrstvy mezofylu jehlice, která je obrácená k obloze – adaxiální, ale s postupem času a rostoucí koncentrací ozonu, dojde ke strukturální změně i v hlubších vrstvách mezofylu, na úrovni endodermis a cévních svazků a nakonec je zasaženo i mezofylové pletivo na spodní straně jehlice (Obr. 17 a Obr. 18) (Sutinen a kol., 1990). Pokud jsou ve svrchní mezofylové vrstvě vidět malé elektron-densní chloroplasty, jejich výskyt se směrem k vnitřním vrstvám pletiva snižuje a na abaxiální straně pod endodermis už nebyly nalezeny. Dá se tedy říci, že vlivem ozonu se zmenšuje velikost chloroplastů, menší chloroplasty jsou elektron-densní a tyto chloroplasty vykazují postupné rozložení výskytu od vnějších vrstev po vrstvy vnitřní (Kivimäenpää a kol., 2004).

Dochází také k mírnému otoku tylakoidů a relativně brzy se vlivem ozonu v buňkách objeví malé vezikuly vázané na membránu a později i retikulace stromatu bez zjevného spojení s tylakoidy (Sutinen a kol., 1990).

Změny ultrastruktury albuminových buněk proběhly relativně ve stejnou dobu, jako změny v endodermis u jehlic, na které působí jen znečištěné ovzduší anebo i ozon, ale lišily se od změn v mezofylu a endodermis. Došlo k celkovému zhroucení všech buněčných organel společně s rozpadem cytoplazmy. Jejich chloroplasty měly síťovaný vzhled a nebylo možné detekovat žádné tylakoidy. I mitochondriální krysty byly rozvolněné a kvůli těmto zásadním změnám v ultrastruktuře vnitřních membrán byly těžko rozeznatelné malé plastidy od mitochondrií. Avšak, úplně degenerované albuminové buňky se vyskytovaly jen v jehlicích s vážně poškozeným mezofylovým pletivem. Ke kolapsu buněčné stěny nedošlo v žádném vodivém pletivu (Sutinen a kol., 1990).



Obr. 17: Schématické znázornění postupu poškozeného pletiva po třech letech. Vlevo jehlice s filtrovaným vzduchem (CF), uprostřed jehlice zasažená vzdušným znečištěním (NF) a napravo jehlice zasažená vzdušným znečištěním i ozonem (NF+). U každého schématu řezu je uvedena odchylka délky chloroplastů na horní i spodní vrstvě jehlice. Míra poškození se stupňuje s intenzitou poškození, nejvíce poškozeny jsou tmavě šedé oblasti. Převzato a upraveno podle Sutinen a kol. (1990).



Obr. 18: Rozdílné struktury buněk mezofylu u jehlic smrku ztepilého. a,b) Změna struktury mezofylu po třech letech expozice ozonu. Chloroplasty jsou malé a tmavé, kvůli hustému stroma. c) Buňky mezofylu dvou let staré jehlice ze stejného stromu, vykazující neporušené struktury. Buňky se nachází těsně pod hypodermis. a) Mezofylové buňky adaxiální strany nacházející se těsně pod hypodermis. b) Buňky nacházející se ve střední části mezofylu. Stoma (St), Intercelulární prostor (I), vakuola (V), tanin (T), hypodermis (H). (LM), 5 μ m. Převzato a upraveno podle Kivimäenpää a kol. (2004).

5 Stresové reakce a urychlená senescence jehlic poškozených znečištěním

Jehlice ze znečištěných oblastí vykazují zrychlenou senescenci, tedy urychlení procesů stárnutí. Senescence je poslední vývojovou fází jehlice a zahrnuje celou řadu symptomů. Obecně je senescence definována jako degenerativní proces, který je podmíněn časově a prostorově (Günthardt-Goerg a Voll-enweider, 2007). Rostliny jsou schopny rychlé fenotypové aklimace při působení stresových faktorů v rámci metabolických drah a mají o něco pomalejší adaptační, evolučně podmíněné reakce na vyvinutí určitých mechanismů tolerance vůči stresu. Při přizpůsobení se stresovým faktorům, dochází ke snížení aktivity buněk a růstu rostlin na minimum, pokud jsou rostliny často vystaveny náhlým krátkodobým nebo dlouhodobým stresovým událostem. Stresová reakce se skládá po sobě následujících fází, jejichž délka se liší v závislosti na síle a délce působení stresového faktoru, ontogenetickém stádiu rostliny a jejím fyziologickém stavu. Jako první je poplachová fáze, kdy dochází k narušení buněčných struktur a funkcí, následuje resuscitační fáze, kdy dochází k mobilizaci kompenzačních mechanismů. Poté dochází k fázi rezistence, kdy nastává zvýšení odolnosti proti působícím faktorům a pokud se rostlina energeticky vyčerpá, tak dochází k poslední fázi, fázi vyčerpání, po dlouhodobém a intenzivním působení stresového faktoru (Albrechtová a kol., 2017).

Skutečné následky stresu se projeví až při překročení určité prahové hodnoty, která již nemůže být rostlinou kompenzována. Po překročení této prahové hodnoty stresové tolerance, může krátkodobá vysoká zátěž vyvolat stejné poškození, jako dlouhodobá nízká zátěž (Lichtenthaler, 1996). Z počátku

působení stresoru dochází k akutnímu poškození, na které rostlina reaguje spuštěním genové exprese a syntézou obranných látek. Dochází ke změnám metabolickým, pak mikroskopickým a pokud stresory působí nadále, poškození se stává chronickým. V této fázi může rostlina přežívat i řadu let, v závislosti na genotypu, délce a intenzitě působení stresorů. Pokud stresor působí i nadále, nastanou nevratné změny v podobě nekrotických listů a jeho opadu až rostlina odumře v důsledku energetického vyčerpání. Může dojít i k tomu, že se rostlina adaptuje a stane se rezistentní a pokud stresor přestane působit v čase, může nastat i regenerace (Albrechtová a kol., 2017)

Zrychlené stárnutí jehlic ve znečištěných oblastech může souviset s nutriční nerovnováhou, která je způsobena vyluhováním živin z listů i půdy, k čemuž pravděpodobně dochází v důsledku působení kyselin na jehlici a acidifikace půdy (Holopainen a kol., 1992). Vlivem okyselení půdy dochází nejen k nerovnováze dostupnosti živin v půdě, ale i k poruše a kořenového systému a mykorrhizy, která může při extrémních podmínkách na kořenech zcela chybět (Cudlín a Chmelíková, 1996).

Dlouhodobě působící antropogenní znečištění a jeho poškození jehlic má za následek větší citlivost k napadení patogeny. V souvislosti se zvyšujícím se věkem jehlic stoupá i množství houbových kolonií, vyskytujících se na jejich povrchu. Tyto mikroorganismy mohou pozitivně či negativně reagovat na fyziologický stav jehlice. Například černé kvasinky na jehlicích smrku červeného (*Picea Rubens* Sarg.) reagovaly na vysokou depozici SO₂ pozitivně, zatímco *Xylolypha pinicola* negativně (Meng a kol., 1995).

6 Závěr

S rostoucím urbanismem roste obsah látek znečišťujících ovzduší, jako je ozon, SO₂, NO_x, aerosoly a PM, což má nepříznivý dopad na vegetaci. Rostliny tyto chemické látky, které jsou vůči nim zatěžující či toxické, absorbují a pevné částice ukládají. Vzhledem k tomu, že rostliny trpí i zátěží jiných stresových faktorů, poškozením a změnami, vede to následně k jejich pomalému vývoji a ke snížení odolnosti vůči napadení chorobami a škůdci. Tyto změny jsou viditelné (makroskopické změny) a pouhým okem neviditelné (mikroskopické změny) a jsou spolehlivými ukazateli zranitelnosti městských stanovišť i lesních společenstev (Nikolić a kol., 2019).

Negativní účinky znečištěného ovzduší jsou pocíťovány nejvíce v městských oblastech a v ekosystémech, vyskytujících se v blízkosti městských či průmyslových oblastí, kde tlak ze znečištěného ovzduší narušuje růst vegetace a negativně ovlivňuje její biodiverzitu.

Anatomická struktura listů jehličnatých dřevin se dá použít, jako bioindikátor znečištěného ovzduší. V důsledku rostoucího obsahu znečišťujících látek v atmosféře dochází u jehlic k poškozením, která se projevují na makroskopické i mikroskopické úrovni. Jedná se o viditelné chlorózy a nekrózy, ke kterým dochází v důsledku poškození chloroplastů, úbytku fotosyntetických pigmentů a degradace buněčné stěny mezofylových buněk, vyskytujících se v okolí průduchů. Mění se struktura a množství

epikutikulárních vosků a ukládání prachových částic v oblasti stomat, což může komplikovat výměnu plynů. Dále se může měnit velikost jehlice a také hustota stomat na jejím povrchu, což může následně ovlivňovat stomatální vodivost. V jehlici dochází také ke změnám v poměrném zastoupení pletiv. Ozon je v současnosti v hustě zalidněných oblastech nejvýznamnější znečišťující látkou. Vysoká depozice ozonu může často vést ke zvýšení podílu pletiv epidermis a hypodermis, v rámci obrany proti oxidativnímu stresu. Strukturální změny jsou viditelné na makroskopické a subcelulární úrovni ve všech buněčných organelách, včetně mitochondrií a cytoplazmy. V mezofylových buňkách může dojít ke změně tvaru a velikosti chloroplastů v důsledku vlnění a otékání tylakoidů; zvyšují se degradační projevy, jako je akumulace lipidů a plastoglobulů. Často také dochází k výskytu plazmolýz mezofylových buněk a akumulaci taninu. Vlivem těchto změn a současným působením dalších stresových faktorů, dochází k urychlené senescenci jehlic v důsledku navýšené stresové zátěže.

Vývoj poškození jehlic a změna struktury epidermálních a epistomatálních vosků mohou poskytovat záznam o expozici toxickým plynům v nedaleké minulosti i dobách geologických. Pokud jsou jehlice uchovány za pomoci fosilizace, je možné detekovat známky poškození znečišťujícími látkami, jako je SO_2 ve fosilizované kutikule a použít tento záznam pro detekci vlivu vulkanismu i na fosilní rostliny. Citlivost jednotlivých druhů jehličnanů na vzdušné znečištění je odlišná, a je třeba to zohlednit při interpretacích.

V přírodě je stres z atmosférického znečištění u rostlin často doprovázen klimatickým stresem, jako je sucho či extrémní teploty – vlny veder nebo mraz, což prohlubuje stresovou zátěž, poškození jehlic a často to vede k předčasné senescenci. Proto je velice důležité nadále věnovat pozornost anatomické aklimaci jehlic u různých druhů jehličnanů, které jsou zároveň různě odolné, nejen k atmosférickému znečištění, ale i k faktorům globální klimatické změny. Odezvy na stresové faktory, vyvolané atmosférickým znečištěním, jsou u jehlic různých druhů jehličnanů rozdílné a často i protichůdné. Z toho důvodu, je při výsadbě či rekultivaci lesních společenstev třeba zvážit, vliv veškerých faktorů v dané oblasti, včetně faktorů klimatické změny a pro rekultivaci použít vhodné genotypy jehličnanů, se zvýšenou odolností vůči abiotickému i biotickému stresu.

7 Seznam použité literatury a internetových zdrojů

7.1 Literatura

Albrechtová, J., and Lhotáková, Z. (2019). Metodika určování vitality smrku ztepilého podle kritéria zastoupení vývojových směrů pupenů. Univerzita Karlova.

Albrechtová, J., Kupková, L., and Campbell, P.K.E. (2017). Metody hodnocení fyziologického stavu smrkových porostů: případové studie sledování vývoje stavu smrkových porostů v Krušných horách v letech 1998-2013 (Geographica - Česká geografická společnost).

Bartirromo, A., Guignard, G., Lumaga, M.R.B., Barattolo, F., Chiodini, G., Avino, R., Guerriero, G., and Barale, G. (2012). Influence of volcanic gases on the epidermis of *Pinus halepensis* Mill. in Campi Flegrei, Southern Italy: A possible tool for detecting volcanism in present and past floras. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 233–234, 1–17.

Bolin, B., Aspling, G., and Persson, C. (1974). Residence time of atmospheric pollutants as dependent on source characteristics, atmospheric diffusion processes and sink mechanisms. *Tellus* 26, 185–195.

Buns, R., Acker, G., and Beck, E. (1993). The Plastids of the Yew Tree (*Taxus baccata* L.): Ultrastructure and Immunocytochemical Examination of Chloroplastic Enzymes. *Botanica Acta* 106, 32–41.

Carmichael, G.R., Ferm, M., Thongboonchoo, N., Woo, J.-H., Chan, L.Y., Murano, K., Viet, P.H., Mossberg, C., Bala, R., Boonjawat, J., et al. (2003). Measurements of sulfur dioxide, ozone and ammonia concentrations in Asia, Africa, and South America using passive samplers. *Atmospheric Environment* 37, 1293–1308.

Cass, G.R. (1998). Organic molecular tracers for particulate air pollution sources. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 17, 356–366.

Cole, K.L., Fisher, J., Arundel, S.T., Cannella, J., and Swift, S. (2007). Geographical and climatic limits of needle types of one- and two-needled pinyon pines. *J Biogeography* 35, 257–269.

Collins, W.J., Fry, M.M., Yu, H., Fuglestedt, J.S., Shindell, D.T., and West, J.J. (2013). Global and regional temperature-change potentials for near-term climate forcers. *Atmos. Chem. Phys.* 13, 2471–2485.

Cudlín, P., and Chmelíková, E. (1996). Degradation and Restoration Processes in Crowns and Fine Roots of Polluted Montane Norway Spruce Ecosystems. 36, 69–76.

Davidson, C.I., Phalen, R.F., and Solomon, P.A. (2005). Airborne Particulate Matter and Human Health: A Review. *Aerosol Science and Technology* 39, 737–749.

DeHayes, D.H., Schaberg, P.G., Hawley, G.J., and Strimbeck, G.R. (1999). Acid Rain Impacts on Calcium Nutrition and Forest Health. *BioScience* 49, 789–800.

Delmas, R., Serca, D., and Jambert, C. (1997). Global inventory of NO_x sources. 48, 51–60.

EEA (2012). Evaluation of progress under the EU National Emission Ceilings Directive (European Environment Agency).

EEA (2019). Air quality in Europe - 2019 report (EEA).

Elliott-Kingston, C., Haworth, M., and McElwain, J.C. (2014). Damage structures in leaf epidermis and cuticle as an indicator of elevated atmospheric sulphur dioxide in early Mesozoic floras. *Review of Palaeobotany and Palynology* 208, 25–42.

Farmer, A.M. (1993). The effects of dust on vegetation—a review. *Environmental Pollution* 79, 63–75.

Gillies, S.L., and Vidaver, W. (1990). Resistance to photodamage in evergreen conifers. *Physiol Plant* 80, 148–153.

- Giorgi, F. (2005). Climate Change Prediction. *Climatic Change* 73, 239–265.
- Guerreiro, C.B.B., Foltescu, V., and de Leeuw, F. (2014). Air quality status and trends in Europe. *Atmospheric Environment* 98, 376–384.
- Günthardt-Goerg, M.S., and Vollenweider, P. (2007). Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: New diagnostic perspectives. *Environmental Pollution* 147, 467–488.
- Harvey, L.D.D. (1993). A guide to global warming potentials (GWPs). *Energy Policy* 21, 24–34.
- Heath, R.L. (1980). Initial Events in Injury to Plants by Air Pollutants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 31, 395–431.
- Holopainen, T., Anttonen, S., Wulff, A., Palomäki, V., and Kärenlampi, L. (1992). Comparative evaluation of the effects of gaseous pollutants, acidic deposition and mineral deficiencies: structural changes in the cells of forest plants. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 42, 365–398.
- Hu, Y.-S., and Yao, B.-J. (1981). Transfusion tissue in gymnosperm leaves. *Botanical Journal of the Linnean Society* 83, 263–272.
- Huete, A.R., and Mc Coll, J.G. (1984). Soil Cation Leaching by “Acid Rain” with Varying Nitrate-to-Sulfate Ratios. *J. Environ. Qual.* 13, 366–371.
- IPCC (2018). Impacts of 1.5°C global warming on natural and human systems (IPCC).
- Irving, D.B., Wijffels, S., and Church, J.A. (2019). Anthropogenic Aerosols, Greenhouse Gases, and the Uptake, Transport, and Storage of Excess Heat in the Climate System. *Geophys. Res. Lett.* 46, 4894–4903.
- Jolivet, Y., Bagard, M., Cabané, M., Vaultier, M.-N., Gandin, A., Afif, D., Dizengremel, P., and Le Thiec, D. (2016). Deciphering the ozone-induced changes in cellular processes: a prerequisite for ozone risk assessment at the tree and forest levels. *Annals of Forest Science* 73, 923–943.
- Kanakidou, M., Myriokefalitakis, S., Daskalakis, N., Fanourgakis, G., Nenes, A., Baker, A.R., Tsigaridis, K., and Mihalopoulos, N. (2016). Past, Present, and Future Atmospheric Nitrogen Deposition. *Journal of the Atmospheric Sciences* 73, 2039–2047.
- Kivimäenpää, M., Jönsson, A.M., Stjernquist, I., Selldén, G., and Sutinen, S. (2004). The use of light and electron microscopy to assess the impact of ozone on Norway spruce needles. *Environmental Pollution* 127, 441–453.
- Kivimäenpää, M., Selldén, G., and Sutinen, S. (2005). Ozone-induced changes in the chloroplast structure of conifer needles, and their use in ozone diagnostics. *Environmental Pollution* 137, 466–475.
- Kivimäenpää, M., Sutinen, S., Valolahti, H., Häikiö, E., Riikonen, J., Kasurinen, A., Ghimire, R.P., Holopainen, J.K., and Holopainen, T. (2017). Warming and elevated ozone differently modify needle anatomy of Norway spruce (*Picea abies*) and Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Can. J. For. Res.* 47, 488–499.
- Krupa, S.V., and Manning, W.J. (1988). Atmospheric ozone: Formation and effects on vegetation. *Environmental Pollution* 50, 101–137.
- Kubínová, Z., Janáček, J., Lhotáková, Z., Šprtová, M., Kubínová, L., and Albrechtová, J. (2018). Norway spruce needle size and cross section shape variability induced by irradiance on a macro- and microscale and CO₂ concentration. *Trees* 32, 231–244.
- Langebartels, C., Heller, W., Führer, G., Lippert, M., Simons, S., and Sandermann, H. (1998). Memory Effects in the Action of Ozone on Conifers. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41, 62–72.
- Lhotáková, Z., Urban, O., Dubánková, M., Cvikrová, M., Tomášková, I., Kubínová, L., Zvára, K., Marek, M.V., and Albrechtová, J. (2012). The impact of long-term CO₂ enrichment on sun and shade needles of Norway

spruce (*Picea abies*): Photosynthetic performance, needle anatomy and phenolics accumulation. *Plant Science* 188–189, 60–70.

Lhotáková, Z., Lukáš, B., Lucie, K., Veronika, K., Markéta, P., Jan, M., Aleš, K., Monika, K., and Jana, A. (2013). Detection of multiple stresses in Scots pine growing at post-mining sites using visible to near-infrared spectroscopy. *Environ. Sci.: Processes Impacts* 15, 2004.

Lichtenthaler, H.K. (1996). Vegetation Stress: an Introduction to the Stress Concept in Plants. *Journal of Plant Physiology* 148, 4–14.

Likens, G.E., Wright, R.F., Galloway, J.N., and Butler, T.J. (1979). Acid Rain. *Scientific American* 241, 43–51.

Lukjanova, A., Mandre, M., and Saarman, G. (2013). Impact of Alkalisiation of the Soil on the Anatomy of Norway Spruce (*Picea abies*) Needles. *Water Air Soil Pollut* 224, 1620.

Lux, A., Baláž, M., Kummerová, M., Votrubová, O., Soukup, A., Morita, S., Rost, T., and Abe, J. (2019). Visual guide to plant anatomy (Academia Praha).

Manninen, S., and Huttunen, S. (2000). Response of needle sulphur and nitrogen concentrations of Scots pine versus Norway spruce to SO₂ and NO₂. *Environmental Pollution* 107, 421–436.

Matyssek, R., Sandermann, H., Wieser, G., Booker, F., Cieslik, S., Musselman, R., and Ernst, D. (2008). The challenge of making ozone risk assessment for forest trees more mechanistic. *Environmental Pollution* 156, 567–582.

Mehlhorn, H., Seufert, G., Schmidt, A., and Kunert, K.J. (1986). Effect of SO₂ and O₃ on Production of Antioxidants in Conifers'. 82, 336–338.

Meng, F.-R., Bourque, C.P.-A., Belczewski, R.F., Whitney, N.J., and Arp, P.A. (1995). Foliage responses of spruce trees to long-term low-grade sulfur dioxide deposition. *Environmental Pollution* 90, 143–152.

Meng, J., Chen, X., Huang, Y., Wang, L., Xing, F., and Li, Y. (2019). Environmental contribution to needle variation among natural populations of *Pinus tabulaeformis*. *J. For. Res.* 30, 1311–1322.

Miller, P.R., Stolte, K.W., Duriscoe, D.M., and Pronos, J. (1996). Evaluating ozone air pollution effects on pines in the western United States (Albany, CA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Southwest Research Station).

Molina, M.J., and Molina, L.T. (2004). Megacities and Atmospheric Pollution. *Journal of the Air & Waste Management Association* 54, 644–680.

Nikolić, M.B., Stefanović, A.M., Veselinović, M.M., Milanović, D.S., Mladenović, D.K., Mitrović, Ž.S., Eremija, M.S., and Rakonjac, B.L. (2019). Needle morpo-anatomy and pollen morphophysiology of selected conifers in urban conditions. *Appl. Ecol. Env. Res.* 17, 2831–2848.

Ottar, B. (1977). International Agreement Needed to Reduce Long-Range Transport of Air Pollutants in Europe. 9.

Ovsyannikov, A.Yu., and Koteyeva, N.K. (2020). Seasonal movement of chloroplasts in mesophyll cells of two *Picea* species. *Protoplasma* 257, 183–195.

Paoletti, E., Schaub, M., Matyssek, R., Wieser, G., Augustaitis, A., Bastrup-Birk, A.M., Bytnerowicz, A., Günthardt-Goerg, M.S., Müller-Starck, G., and Serengil, Y. (2010). Advances of air pollution science: From forest decline to multiple-stress effects on forest ecosystem services. *Environmental Pollution* 158, 1986–1989.

Pellegrini, E. (2014). PSII photochemistry is the primary target of oxidative stress imposed by ozone in *Tilia americana*. *Urban Forestry & Urban Greening* 13, 94–102.

- Percy, K.E., Jensen, K.F., and McQUATTIE, C.J. (1992). Effects of ozone and acidic fog on red spruce needle epicuticular wax production, chemical composition, cuticular membrane ultrastructure and needle wettability. *New Phytol* *122*, 71–80.
- Pfanz, H., and Heber, U. (1986). Buffer Capacities of Leaves, Leaf Cells, and Leaf Cell Organelles in Relation to Fluxes of Potentially Acidic Gases. *Plant Physiol.* *81*, 597–602.
- Polák, T., Cudlín, P., Moravec, I., and Albrechtová, J. (2006). Macroscopic indicators for the retrospective assessment of Norway spruce crown response to stress in the Krkonoše Mountains. *Trees* *21*, 23–35.
- Reich, P.B., Oleksyn, J., Modrzyński, J., and Tjoelker, M.G. (1996). Evidence that longer needle retention of spruce and pine populations at high elevations and high latitudes is largely a phenotypic response. *Tree Physiology* *16*, 643–647.
- Ritchie, A., Stavrakaki, A., Cohen, A., Grebot, B., Hugli, C., and Wilson, K. (2006). Development of a methodology to assess population exposed to high levels of noise and air pollution close to major transport infrastructure (European Commission).
- Robinson, E., and Robbins, R.C. (1970). Gaseous Nitrogen Compound Pollutants from Urban and Natural Sources. *Journal of the Air Pollution Control Association* *20*, 303–306.
- Shen, S. -z., Crowley, J.L., Wang, Y., Bowring, S.A., Erwin, D.H., Sadler, P.M., Cao, C. -q., Rothman, D.H., Henderson, C.M., Ramezani, J., et al. (2011). Calibrating the End-Permian Mass Extinction. *Science* *334*, 1367–1372.
- Shepherd, T., and Wynne Griffiths, D. (2006). The effects of stress on plant cuticular waxes: Tansley review. *New Phytologist* *171*, 469–499.
- Siefermann-Harms, D., Payer, H.D., Schramel, P., and Lütz, C. (2005). The effect of ozone on the yellowing process of magnesium-deficient clonal Norway spruce grown under defined conditions. *Journal of Plant Physiology* *162*, 195–206.
- Slovik, S., Siegmund, A., Fuhrer, H.-W., and Heber, U. (1996). Stomatal uptake of SO₂, NO_x and O₃ by spruce crowns (*Picea abies*) and canopy damage in Central Europe. *New Phytol* *132*, 661–676.
- Soikkeli, S. (1981). Comparison of cytological injuries in conifer needles from several polluted industrial environments in Finland. *18*, 47–61.
- Soikkeli, S., and Tuovinen, T. (1979). Damage in mesophyll ultrastructure of needles of Norway spruce in two industrial environments in central Finland. *16*, 50–64.
- Soukupová, J., Cvikrová, M., Albrechtová, J., Rock, B.N., and Eder, J. (2000). Histochemical and biochemical approaches to the study of phenolic compounds and peroxidases in needles of Norway spruce (*Picea abies*): RESEARCH Phenolics, peroxidases and pigments in spruce. *New Phytologist* *146*, 403–414.
- Soukupová, J., Rock, B.N., and Albrechtová, J. (2001). Comparative BlackwellScienceLtd study of two spruce species in a polluted mountainous region. *New Phytologist* *150*, 133–145.
- Šrámek, V., Novotný, R., and Uhlí, H. (2007). Vliv ozonu na lesní porosty - mechanismus působení, vliv na dřeviny, ukazatele poškození. *52*, 138–147.
- Sutinen, S., Skarby, L., Wallin, G., and Sellden, G. (1990). Long-term exposure of Norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst., to ozone in open top chambers. II. Effects on the ultrastructure of needles. *New Phytol* *115*, 345–355.
- Turunen, M., and Huttunen, S. (1990). A Review of the Response of Epicuticular Wax of Conifer Needles to Air Pollution. *J. Environ. Qual.* *19*, 35–45.
- Viskari, E.-L. (2000). Epicuticular Wax of Norway Spruce Needles as Indicator of Traffic Pollutant Deposition. *Water, Air, and Soil Pollution* *121*, 327–337.

Vollenweider, P., Ottiger, M., and Günthardt-Goerg, M.S. (2003). Validation of leaf ozone symptoms in natural vegetation using microscopical methods. *Environmental Pollution* 124, 101–118.

Vollenweider, P., Fenn, M.E., Menard, T., Günthardt-Goerg, M., and Bytnerowicz, A. (2013). Structural injury underlying mottling in ponderosa pine needles exposed to ambient ozone concentrations in the San Bernardino Mountains near Los Angeles, California. *Trees* 27, 895–911.

Whitlow, T.H., Bassuk, N.L., and Reichert, D.L. (1992). A 3-Year Study of Water Relations of Urban Street Trees. *The Journal of Applied Ecology* 29, 436.

Wieser, G. (2000). Role of climate, crown position, tree age and altitude in calculated ozone flux into needles of *Picea abies* and *Pinus cembra*: a synthesis. *Elsevier* 109, 415–422.

Wu, H., and Hu, Z. (1996). Comparative anatomy of resin ducts of the Pinaceae. *11*, 135–143.

7.2 Internetové zdroje

č. 1: http://portalzp.praha.eu/jnp/cz/ovzdusi/o_smogu/druhy_smogu/index.xhtml

č. 2: <https://www.carboncyclescience.us/what-is-carbon-cycle>