

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Ekologická a evoluční biologie



Tony Andrejev

Fyziologické a růstové odpovědi borovicovitých jehličnanů na troposférický ozon v kombinaci s dalšími faktory klimatické změny

Physiological and growth responses of *Pinaceae* conifers to tropospheric ozone acting in combination with other factors of climate change

Bakalářská práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Zuzana Lhotáková, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

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

V Praze, dne: 3. 8. 2022

Podpis:

Poděkování:

Především bych chtěl poděkovat paní profesorce Albrechtové za takřka andělskou trpělivost a ochotu poradit, kterou jsem si zcela jistě nezasloužil. Dále bych nikdy nebyl dokázal tuto práci dokončit, nebýt mé matky, mého otce a mých bratrů, za což jim jsem ze srdce vděčný. Děkuji a omlouvám se.

Abstrakt:

Práce představuje možné důsledky zvyšujících se troposférických koncentrací ozonu na různé jehličnany čeledě borovicovitých; od chemických interakcí v buňkách, přes viditelné chlorózy na jehlicích, až po diskuzi dopadů na celé ekosystémy. Podrobně probírá dynamiku vzniku troposférického O₃, specifické mechanismy jeho působení skrze tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS), stručně přibližuje jeho zapojení do složitých signalizačních kaskád společně s fytohormony, uvádí množství konkrétních studií o vlivech ozonu na růst a sinky borovicovitých jehličnanů a poté je srozumitelně shrnuje do obecnějších tvrzení. Práce také rozebírá možné interakce mezi O₃ a dalšími faktory klimatické změny, jako jsou zvyšující se koncentrace CO₂ nebo sucho.

Klíčová slova: ozon, jehličnany, ROS, změna klimatu, fotosyntéza, chloróza, růst, fytohormony

Abstract:

This thesis presents the possible impacts of rising concentrations of tropospheric ozone on various *Pinaceae* conifers; from intracellular chemical interactions, to visible needle chlorosis, leading into a discussion of the consequences for whole ecosystems. The dynamics of the creation of tropospheric O₃ are discussed in detail, as are the mechanisms of its influence through reactive oxygen species (ROS); its participation in complicated phytohormonal signaling is briefly introduced; a great number of specialized studies of its effects on the growth and sinks of *Pinaceae* conifers is presented and subsequently summarized in more generalised statements. The thesis also mentions the possible interactions between O₃ and other factors of climate change, such as rising atmospheric concentrations of CO₂ or drought.

Keywords: ozone, conifers, ROS, climate change, photosynthesis, chlorosis, growth, phytohormones

Obsah

1.Úvod.....	1
1.1.Antropogenní znečištění a klimatická změna.....	1
1.2.Troposférický ozon.....	2
1.2.1.Vznik.....	3
1.2.2.Vývoj přízemních koncentrací.....	3
1.2.3.Účinek ozonu na živé organismy.....	4
2.Poškození rostlin ozonem.....	6
2.1.Poškození na buněčné úrovni.....	6
2.1.1.Reaktivní formy kyslíku.....	6
2.1.2.Oxidativní stres.....	7
2.1.3.Interakce s hořčíkem v LHC II.....	8
2.2.Poškození na úrovni listu.....	10
2.2.1.Degradace voskové kutikuly listu.....	10
2.2.2.Chlorózy.....	12
2.2.3.Změny v anatomii jehlice.....	14
2.2.4.Fytohormony.....	17
2.3.Poškození rostliny jako celku.....	19
2.3.1.Změny v celkovém ročním přírůstku biomasy.....	19
2.3.2.Jiné růstové změny.....	21
2.3.3.Dopad na mykorhizu.....	23
2.3.4.Poškození v důsledku zhoršení obrany vůči biotickým stresorům.....	24
2.4.Ozon a ekosystém.....	25
3.Závěr.....	28
4.Seznam použité literatury.....	30

Seznam použitých zkratk:

ABA – kyselina abscisová (abscisic acid)

AOX – alternativní oxidáza (alternative oxidase)

APX – askorbátperoxidáza (ascorbate peroxidase)

c jehlice – jehlice, vyrašivší letošní rok (*current year*)

c+n (*n* zde počet předešlých let) jehlice – jehlice, vyrašivší v předchozích letech

JA – kyselina jasmonová (jasmonic acid)

NDM – suchá váha jehlic (needle dry matter)

OEC – kyslík vyvíjející komplex (oxygen evolving complex)

PCD – plánovaná buněčná smrt (planned cell death)

ppbv – objemový podíl látky na miliardu celkových jednotek objemu (particles per billion by volume); pro ozon odpovídá při tlaku jedné atmosféry 2,0 µg/m³ pro 20°C a 2,1 µg/m³ pro 0°C

PRP – prolinem bohaté bílkoviny (prolin-rich peptides)

ROS – reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)

SA – kyselina salicylová

SOD – superoxididismutáza (superoxide dismutase)

UV-B – ultrafialové záření B

UV-C – ultrafialové záření C

VOC – těkavé organické látky (volatile organic compounds)

1. Úvod

Fotosyntetické organismy a zejména vyšší rostliny patří mezi nevlivnější obyvatele této planety: mění chemické složení atmosféry, určují ráz krajiny, regulují teplotní podmínky svých stanovišť, slouží ostatním organismům jako obydlí, potrava, zdroj materiálů. V dnešní době jsou však v podmínkách klimatické změny a silných antropogenních vlivů ve stále větší míře vystavovány celé řadě stresových faktorů, jako jsou sucho, zvyšující se koncentrace vzdušných polutantů, eutrofizace půd, častější výskyt extrémních výkyvů počasí a další. Tomu všemu musí rostliny kvůli své sesilitě, a nemožnosti změnám uniknout migrací, čelit rozličnými fyziologickými a růstovými adaptacemi.

Troposférický plynný polutant ozon mezi těmito stresovými faktory patří k těm nejvýznamnějším. Tvoří se ve zvláště velkých objemech za horkých letních dnů, kterých v souvislosti s klimatickou změnou přibývá, a jeho vzniku svědčí i vysoké koncentrace NO_2 v ovzduší. Vstupuje do rostlinných těl skrze průduchy a následně narušuje redoxní rovnováhu v buňkách cestou intenzivních reakcí a tvorby dalších reaktivních forem kyslíku, což vede k dalekosáhlým změnám metabolismu, k narušení fyziologických procesů, poškození membrán a buněčných struktur. Tyto dopady nezůstávají lokalizovány v bodě vzniku a skrze fytohormonální signalizační kaskády se jejich dopad šíří na celou rostlinu. Vlastnosti vzniku a rozšíření ozonu ve vzduchu také zaručují, že jeho vliv není nikdy omezen na jednotlivce a jsou mu vždy vystaveny celá společenství naráz.

Největší pozornost je ve vztahu k působení troposférického ozonu na rostliny z pochopitelných důvodů udělována jeho dopadům na zemědělskou úrodu, kde ohrožuje zdraví a výnosnost plodin od sóji až po tabák. Neméně důležité s hlediska boje s klimatickou změnou jsou však jeho vlivy na rostliny žijící v divoké přírodě a hospodářských lesích.

Práce si proto klade za cíl komplexně popsat nynější vědecké poznatky o účincích, které troposférický ozon má konkrétně na jehličnany čeledě borovicovitých, do které patří velké množství hospodářsky i ekologicky významných druhů.

1.1. Antropogenní znečištění a klimatická změna

Jevy schopné vychýlit energetickou rovnováhu Země se popisují jako nesoucí radiační působení, měřené v W/m^2 ; má-li tento údaj pozitivní hodnotu, jev způsobuje ohřev, má-li ji negativní, tak ochlazení. V současnosti převládají jevy ohřívající, jako jsou například stoupající koncentrace skleníkových plynů: atmosférického CO_2 , CH_4 , N_2O . Úhrnné radiační působení jen těchto tří se v roce 2019 oproti roku 1750—tedy od doby před industrializací a dramatickým zvýšením antropogenních vlivů—odhadovalo na $+2,9 \text{ W/m}^2$. Přirozené změny radiačního působení od roku 1750 jsou zanedbatelné v porovnání se změnami antropogenními (Gulev et al, 2021).

Jedním z těchto antropogenních skleníkových plynů, změna jehož radiačního působení oproti roku 1750 se odhaduje na $+0,5 \text{ W/m}^2$, je právě ozon (Marenco et al, 1994; Gulev et al, 2021). Nicméně, jak tato práce ukáže, významnější dopad na radiační bilanci Země než přímé radiační působení ozonu nese vliv, který má tento troposférický polutant na živé organismy.

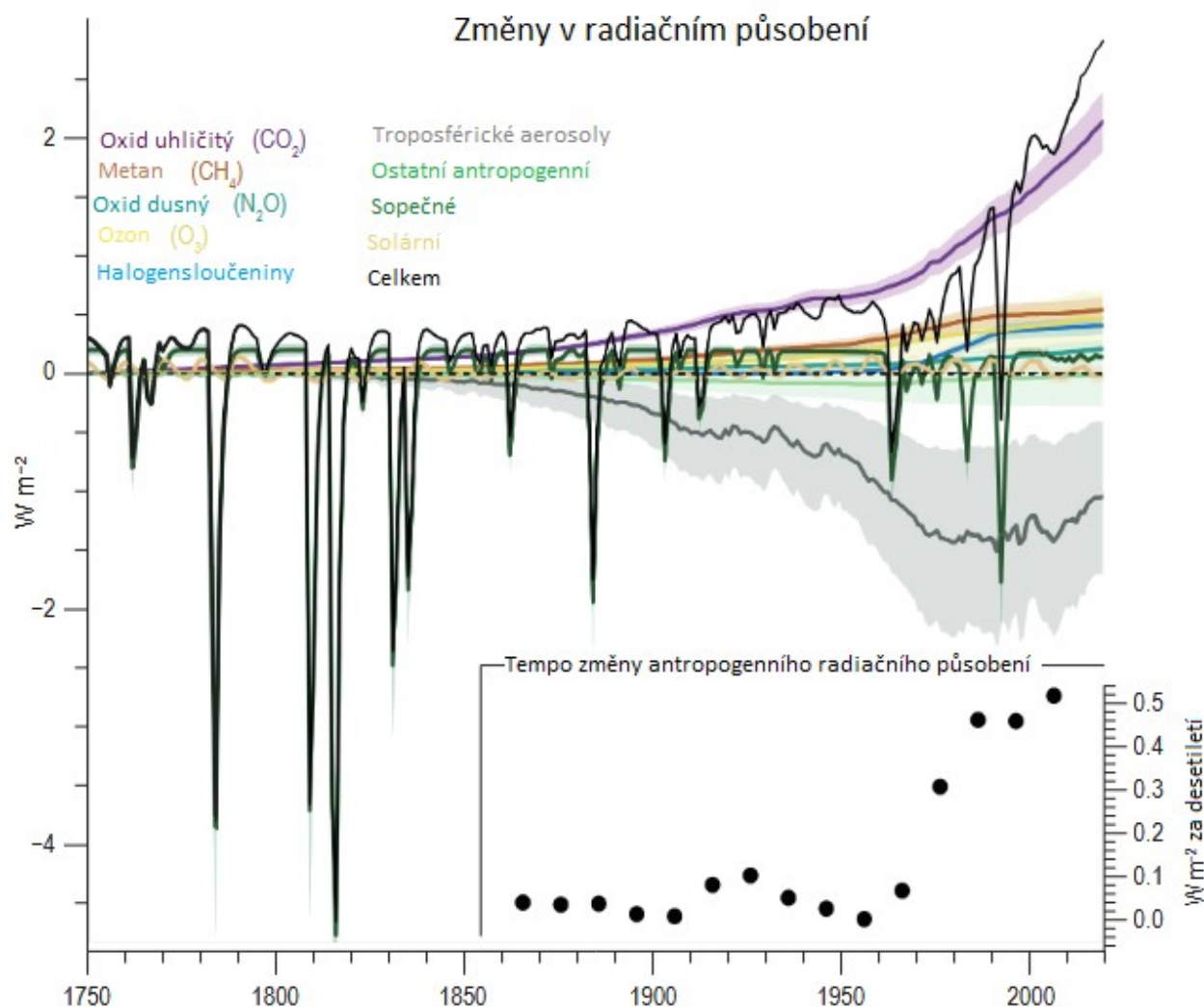


Schéma 1: Graf změn radiačního působení a jeho příčin. Široká pole kolem linií představují interval 95% jistoty. Převzato z (Gulev et al, 2021), upraveno.

1.2. Troposférický ozon

Ozon či trikyslík, O_3 , je trojatomová forma kyslíku, která je za běžných přírodních podmínek plynná, s mírným namodralým zabarvením a charakteristickým, štiplavým zápachem. Přirozeně se vyskytuje ve zvýšených koncentracích v takzvané ozonové vrstvě stratosféry 20-40 km n.m., kde se přítomný molekulární kyslík O_2 (dikyslík), budoucí vystaven ultrafialovému UV-C záření o vlnových délkách 100-200 nm, rozpadá na dva singletové kyslíky, které hned reagují s jinými molekulami dikyslíku právě za vzniku O_3 . Fotolytická reakce probíhá i opačně: O_3 absorbuje UV-C o zbývajících délkách (200-280 nm) a taktéž podstatnou část UV-B (280-315 nm), díky čemuž se rozkládá zpět na dikyslík a singletový kyslík $\cdot O$ (Matsumi & Kawasaki, 2003). Jelikož je ultrafialové záření, zvláště záření UV-C, životu nebezpečné, vděčí všechny suchozemské organismy za svoji existenci ozonové vrstvě, která právě UV-C absorbuje a zamezuje jeho průchodu do spodních pater atmosféry.

Za vhodných okolností však ozon vzniká i v troposféře.

1.2.1. Vznik

Jelikož je většina záření, schopného fotolyzovat ozon, absorbována již ve stratosféře, dynamika vzniku ozonu troposférického se od ozonu stratosférického liší: aby fotolýza molekulárního dikyslíku probíhala v nezanedbatelných objemech i za vlnových délek nad cca 310 nm, je potřebná přítomnost NO₂, se kterým dikyslík reaguje za vzniku NO a singletového kyslíku. V okamžiku vzniku $\cdot\text{O}$ hned, stejně jako ve stratosféře, reaguje s molekulami O₂ – a tedy v konečném důsledku vzniká O₃ (Haagen-Smit, 1952). Tato reakce však běží i opačně a v kontrolovaných podmínkách se časem poměry NO/NO₂ a O₂/O₃ vzájemně vyváží (Dodge, 1984).

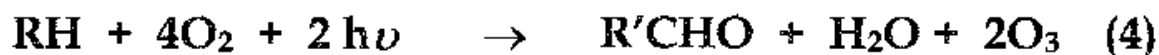


Schéma 2: Vznik ozonu v atmosféře. NO₂ – oxid dusný; NO – oxid dusnatý; CO – oxid uhelnatý; CO₂ – oxid uhličitý; CH₄ – methan; HCHO – formaldehyd; H₂O – voda; RH – obecně alkan; R'CHO – obecně aldehyd; „hν“ – světelné kvantum. Převzato z (Rao, M.V.; et al; 2000).

V případě, že je do reakce umožněno vstupovat větším objemům těkavých organických látek (VOC) nebo jiným uhlíkovým sloučeninám (například oxidu uhelnatému), se ale tato rovnováha vychyluje, což může vést k postupnému nárůstu koncentrací různých oxidových radikálů a jiných látek potenciálně nebezpečných živým organismům, a to za neustálé obnovy molekul O₃, jejichž koncentrace tedy tímto neklesají (Dodge, 1984).

Jelikož fotolytické reakce berou potřebnou energii ze Slunce, nepřekvapí, že k fotolýze O₂ dochází především během prosluněných dnů v létě. Dalším důvodem, proč pozorujeme nejvyšší koncentrace přízemního ozonu právě v letních měsících, je vysoká teplota: výzkumy z východu USA ukázaly, že hladina O₃ v ovzduší stoupá s rostoucí teplotou, nejspíše díky usnadnění chemických reakcí rychlejším pohybem molekul. Konkrétní číslo závisí od koncentrací NO_x a VOC v dané lokalitě, ale v průměru se jedná o cca 2,2 ppbv/°C (Bloomer et al, 2009). Vztah však není zcela lineární; za velmi vysokých teplot (~39 °C) se křivka růstu koncentrací O₃ vyrovnává či dokonce začíná klesat (Steiner et al, 2010).

Propojenost mezi zplodinami NO_x, vznikajícím ozonem a letními dny byla původně objevena již v polovině 20. století, v už tehdy výrazně znečištěném Los Angeles, kde vedla ke vzniku dráždivého fotochemického smogu (Haagen-Smit, 1952). Jelikož ale NO_x i VOC mohou vznikat bez jakéhokoliv přičinění člověka, k jejich dynamickému vzájemnému vyvažování přirozeně dochází taktéž v relativně neznečištěných přírodních oblastech (Crutzen, 1974).

1.2.2. Vývoj přízemních koncentrací

V důsledku globálního charakteru antropogenního znečištění má ale tato původně meziročně

stabilní dynamika vzniku a zániku ozonu do budoucna všechny předpoklady vést ke zvyšování atmosférických koncentrací O_3 po celé Zemi. Historicky tomu tak totiž bylo: srovnáme-li nejranější dostupná data z jihozápadní Francie a těch z konce 20. st., tak zjistíme, že přestože tyto koncentrace během prvních cca 20ti let pozorování na konci 19. st. nevykazovaly větší výkyvy a držely se kolem 10 ppbv, za následujících sto let se zvýšily 5krát (Marengo et al, 1994); u těchto raných dat je ovšem dobré mít na paměti jejich relativně vysokou chybovost. I přesnější nepřerušovaná pozorování napříč kontinenty, počínající 50tými lety 20. st. v Evropě, ale ukazují, že se koncentrace za toto půlstoletí vůči původním hodnotám příslušící danému místu zvýšily 2krát, bez ohledu na to, o jakou lokalizaci pozorování šlo (Parrish et al, 2012). Nynější troposférické koncentrace ozonu v měřeních většiny lokalit v průměru dosahují hodnot kolem 50 ppbv, ale ve zvláště znečištěných oblastech mohou krátkodobě přesahovat i 150ppbv (Staehelin et al, 2017).

Tento trend za posledních pár desetiletí zejména v Evropě zpomalil či dokonce obrátil (Parrish et al, 2012) a zvyšující se teploty také nemají s ozonem jednoznačně pozitivní vztah (Steiner et al, 2010), což komplikuje jednoznačné predikce budoucího vývoje. Nicméně, vzhledem k lineárnímu vztahu ozon/teplota pod $39^{\circ}C$ (Bloemer et al, 2009), k rostoucím emisím přírodních VOC v důsledku dopadů klimatické změny (Ghimire et al, 2017) a k silnému vlivu těchto VOC na vznik O_3 (Dodge, 1984), lze předpokládat, že další růst koncentrací troposférického ozonu je do budoucna minimálně možný, a bylo by vhodné počítat s jeho možnými následky.

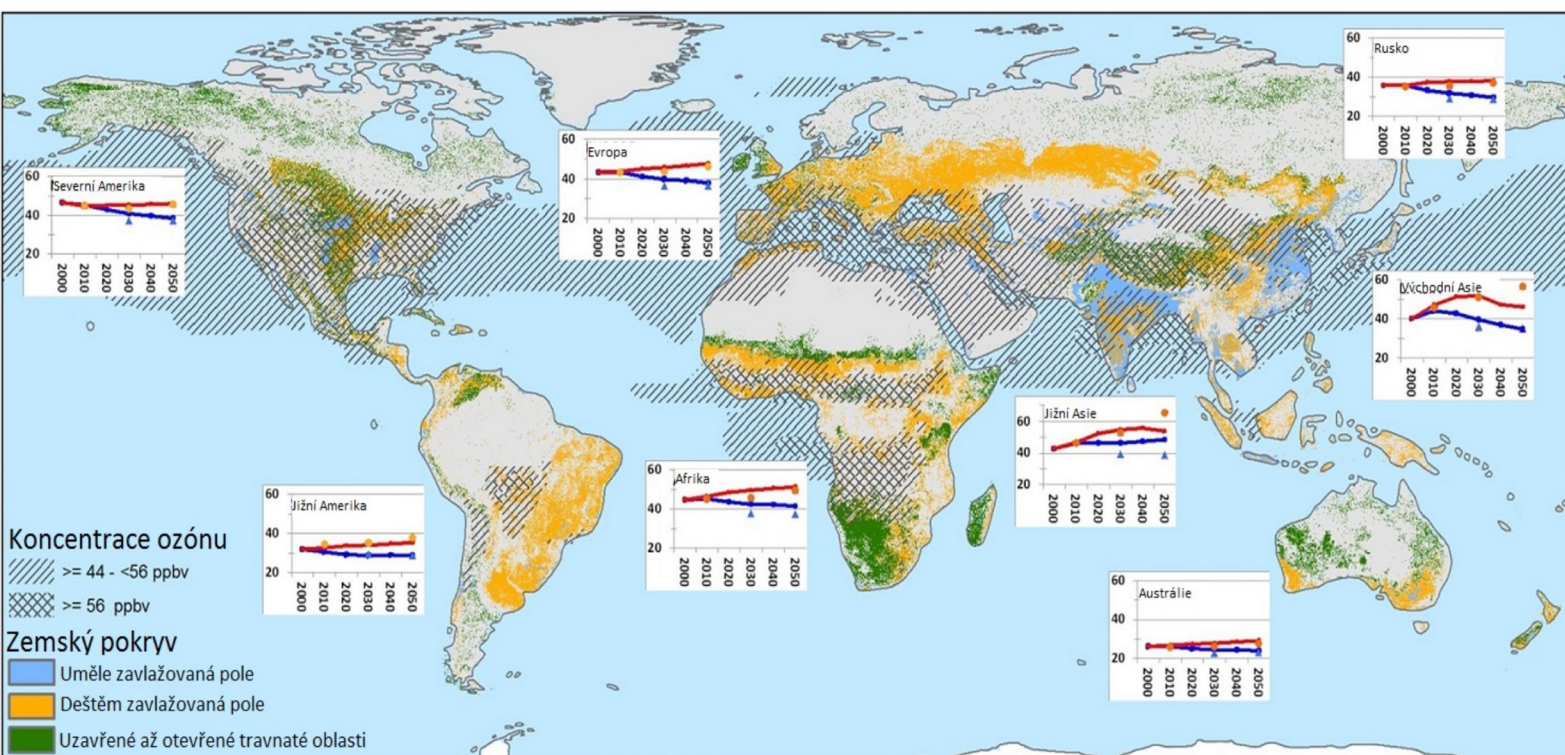


Schéma 3: Globální distribuce ozonových „hotspotů“ pro rok 2001. Grafy ukazují dvě různé predikce pro další vývoj koncentrací O_3 v každém jednotlivém regionu (modře RCP2.6, červeně RCP8.5.) až do roku 2050.

Převzato z (Emberson et al, 2018), upraveno.

1.2.3. Účinek ozonu na živé organismy

Jeden z hlavních důvodů, proč se fotochemický smog vůbec začal zkoumat, byl ten, že si obyvatelé Los Angeles stěžovali na silné dráždění očních sliznic během smogových dní a na škody

na úrodě; tyto účinky byly důsledkem právě zvýšených ozonových koncentrací (Haagen-Smit, 1952). Zvýšení průměrné koncentrace ozonu v ovzduší o 10 ppbv¹ bývá o týden později následováno nárůstem denní lidské mortality přibližně o 0,52% a konkrétně u úmrtí spojených s kardiovaskulárními a respiračními potížemi o 0,64% (Bell et al, 2004).

Zároveň je ozon díky svým silným cytotoxickým účinkům zkoumán pro jeho možné využití jako antimikrobiální agens například při čištění vod (Lezcano et al, 1999); taktéž je intenzivně studován jeho potenciál v medicíně, přičemž práce zaměřené na jeho aplikace v stomatologii se těší obzvlášť velké oblibě, a to i přes prozatím nanejvýš smíšené výsledky (Azarpazhooh & Limeback, 2008).

Ozon je tedy vysoce biologicky aktivní. Proto a vzhledem k výše uvedenému historickému nárůstu jeho troposférických koncentrací a k nejasným odhadům o budoucnosti tohoto trendu jej tedy lze považovat za významnou znečišťující látku, která si pro svoji důležitost zaslouží zvýšenou vědeckou pozornost.

1 Zde je vhodné poznamenat, že se koncentrace O₃ udávají v různých jednotkách, a zatímco převod z nmol/mol na ppb je jednoduchý, převod do µg/m³ je o dost komplikovanější. Tato práce vždy uvádí jednotky použité v původním textu a pro potřeby orientace při čtení stačí hrubé přiblížení 1 ppbv=2 µg/m³.

2. Poškození rostlin ozonem

Ozon se mezi plynnými polutanty řadí k nejvýznamnějším faktorům poškozujícím zemědělskou úrodu vůbec, kvůli čemuž je zkoumání jeho vlivu na rostliny nepřekvapivě již dlouhodobě věnováno nemálo úsilí (Heck et al, 1982; Emberson et al, 2018). Jak již bylo řečeno, už i samotný výzkum podstaty fotochemického smogu byl částečně motivován škodami na úrodě (Haagen-Smit, 1952). Snížení výnosnosti zemědělských plodin si lidstvo okamžitě všimá, ať už z důvodu finančních ztrát pro zemědělce, či jednoduše proto, že na nich přímo závisí naše přežití: globální potravinová bezpečnost se stává čím dál aktuálnějším tématem kvůli změně klimatu, rostoucí a stárnoucí populaci, pokračujícím ozbrojeným konfliktům, stále se zvyšující míře urbanizace a jiným faktorům ovlivňujícím přístup ke stravě. Adekvátní uživení lidstva tedy v současnosti představuje velkou výzvu (King et al, 2017).

Méně okamžitě nápadné jsou dopady, které ozonové znečištění může mít na divoce žijící rostliny například v lesích; vzhledem k vysoké provázanosti globálních energetických a geochemických toků se zdravím těchto ekosystémů (Sedjo, 1993) by ale bylo chybou ignorovat způsoby, kterými je může ozon ovlivňovat. Je například známo, že troposférický O_3 je schopen, skrze narušení schopnosti rostlin poutat uhlík do biomasy, dramaticky měnit složení půdy (Loya et al, 2003).

2.1. Poškození na buněčné úrovni

Ozon způsobuje na rostlinách výše uvedené velké škody, přestože on sám není schopen pronikat hluboko do rostlinných pletiv (Laisk et al, 1989). Po kontaktu s fenoly, alkeny, lipidy a jinými látkami, obsaženými v buněčné stěně, se totiž rozkládá na takzvané reaktivní formy kyslíku—a právě ony následně stojí za všemi fyziologickými a strukturálními důsledky, které přítomnost ozonu v ovzduší rostlině přináší (Heath, 1987). Jelikož se tyto reakce a jejich bezprostřední následky odehrávají na povrchu a uvnitř jednotlivých buněk, je třeba začít zkoumat dopady ozonu právě od buněčné úrovně.

2.1.1. Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (dále ROS) jsou molekulární kombinace atomů kyslíku (a případně dalších prvků), které jsou vysoce nestabilní a velmi ochotně se účastní chemických reakcí. Patří mezi ně například peroxid vodíku H_2O_2 , superoxid $\cdot O_2^-$, hydroxylový radikál $\cdot OH$, singletový kyslík $\cdot O$, či právě ozon. O_3 se ale mezi ROS někdy nepočítá; pro přehlednost bude v této práci termín ROS označovat pouze produkty reakce ozonu, nikoliv samotný O_3 . ROS tedy mohou vznikat jako produkty rozkladu ozonu, který po kontaktu s substrátem nastává rychle, jelikož ozon je, jak je již dlouho známo, velmi silným oxidačním činidlem (Crabtree & Kemp, 1946).

ROS jsou také normální součástí metabolismu rostlinné buňky a pouhá jejich přítomnost sama o sobě nesvědčí o žádném mimořádném poškození. H_2O_2 může například spontánně vznikat na osvětlené thylakoidální membráně na OEC (Mehler, 1951) jakožto jeden z možných výsledků (tím druhým je O_2) reakcí primárního produktu fotosyntézy, kterým je jiný ROS, $\cdot O_2^-$ (Asada et al, 1974). Za běžných podmínek jsou ovšem ROS brzy po vzniku sériově zneškodňovány za tímto účelem vyvinutými mechanismy, specializovanými každý na jiný ROS. Tyto antioxidanty se mohou

být neenzymatické, jako jsou cukerné alkoholy (Nishizawa-Yokoi et al, 2008), nebo enzymatické, jako jsou AOX (Bendall & Bonner, 1971), APX (Grodén & Beck, 1979), katalázy (Loew, 1900), nebo SOD (McCord & Fridovich, 1969). Obvykle tedy ROS pro buňku nepředstavují větší nebezpečí.

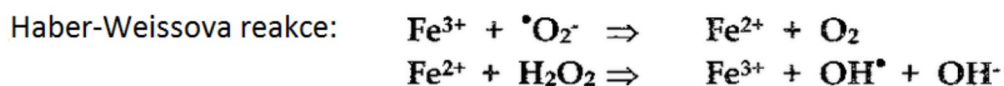
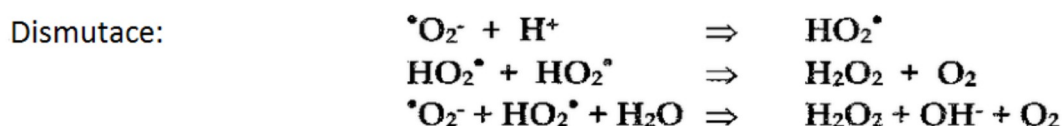


Schéma 4: Rozličné reakce ozonu uvnitř buňky. Převzato z (Rao et al, 2000), upraveno.

2.1.2. Oxidativní stres

Pod pojmem „oxidativní stres“ se rozumí jakýkoliv stav, když buněčné mechanismy, které za optimálních podmínek regulují redoxní homeostázu tak, aby nedocházelo k řetězovým reakcím a nekontrolovanému vzniku ROS, přestávají „stíhat“ a ROS se začínají hromadit (Asada, 1994). Takový vývoj je pro buňku potenciálně nebezpečný, protože intracelulární přítomnost čehokoliv, co je vysoce reaktivní, může ohrozit její životaschopnost a ROS nejsou výjimkou: makromolekuly mohou po reakci s ROS pozbyť funkčnost zčásti či zcela, a to v závislosti na konkrétním ROS a proteinu buď cestou fragmentace bílkovin na části či naopak jejich agregace do větších, taktéž nepoužitelných celků (Davies, 1987); jelikož takto znehodnocené makromolekuly nemůže buňka dále využít za jejich původním účelem, nezbyvá jí než je rozložit zpět na aminokyseliny, čímž tedy investice, která byla buňkou vložena do stavění tohoto proteinu, přichází vniveč, a toto mrhání zdroji může buňku časem zcela vyčerpat a ve svém konečném důsledku přivést k buněčné smrti (Davies, 1987). Ještě bezprostředněji nežli dlouhodobým plýtváním energie mohou ROS buňku ohrozit například oxidací DNA, kterou mohou přímo způsobit zlomy ve vláknech nukleové kyseliny, případně naštěpit samotné její molekuly, což je neslučitelné s dlouhodobějším přežitím buňky (Hagar et al, 1996).

Zvýšení hladiny určitého ROS nad „backgroundovou“ hodnotu a přechod do oxidativního stresu ale ještě pořád nemusí nutně být předznamenáním ničeho závažného. ROS–zejména H_2O_2 , který je na rozdíl od $\cdot\text{O}_2^-$ díky absenci náboje ve své molekule schopen v omezené míře (Antunes & Cadenas, 2000) pronikat přes fosfolipidovou dvojvrstvu i prostou difuzí–totiž v rozličných stresových situacích kvůli rozhození křehké redoxní rovnováhy nejen vznikají, ale taktéž se aktivně zapojují do signalizačních kaskád, kterými se buňka snaží stresoru bránit. Některé z těchto kaskád se zdají být zacílené primárně na snížení hladiny dotyčného ROS, ale jejich dopady mohou být

mnohem dalekosáhlejší: H_2O_2 například stimuluje tvorbu peroxisomů (Lopez-Huertas et al, 2000), nositelů enzymu katalázy, které přebytečný peroxid rychle likvidují, zároveň však zastávají i jiné významné role v buněčném metabolismu (β -oxidace mastných kyselin, glyoxylátový cyklus...), takže zvýšení jejich počtu má za následek celkovou stimulaci buněčného metabolismu (hormeze, pozitivní odpověď organismu na mírnou úroveň stresu, přestože velká dávka by jeho „výkon“ zhoršila). To vše dodává novou perspektivu na význam tvorby H_2O_2 buňkou při stresu osmotickém (Guan et al, 2000), mrazovém (Prasad et al, 1994), ze sucha (Pei et al, 2000), z přesvícení (Karpinski et al, 1999), nebo po zranění a útoku patogenu (Lopez-Huertas et al, 2000) či jiném silném mechanickém stimulu (Yahraus et al, 1995). ROS se mohou pozitivně podílet na buněčné fyziologii také přímo, bez zapojení do signalizačních kaskád: při houbovém napadení buňka do své stěny vypouští H_2O_2 , který zde iniciuje cross-linking přítomných PRP, čímž stěnu—a evidentně i celou rostlinu—zpevňuje a pomáhá jí se před houbou lépe bránit (Bradley et al, 1992). Význam ROS ve stresové signalizaci sebou činí objekt intenzivního zájmu badatelů a rozhodně lze v blízké budoucnosti očekávat nové objevy v této oblasti.

Při příliš silném signálu se ale oxidativní stres vymyká zpětnovazebné regulaci a nastává řetězová oxidace k životu buňky nezbytných látek (Davies, 1987; Hagar et al, 1996). Vystavení rostliny plynnému ozonu vede v apoplastu jejích listů k disociaci O_3 ve vodnatém roztoku za pomoci všudypřítomného hydroxylového aniontu OH^- (Weiss, 1935), poté se v samotném apoplastu a i uvnitř buněk začíná tvořit a hromadit velké množství H_2O_2 , zatímco $\cdot O_2^-$ je následně generován složitou reakcí ozonu s buněčnými lipidy za vzniku aldehydů a právě H_2O_2 (ozonolýza); tyto ROS zase reagují s přechodnými kovy za vzniku $\cdot O$ a $\cdot OH$ (Weiss, 1935; Wohlgenuth et al, 2002). Není-li tato kaskáda zastavena včas, přechází tento intracelulární „oxidativní výbuch“ (*oxidative burst*) do nekontrolovatelného dominového efektu hypersenzitivní reakce, který může rychle vést ke smrti buňky. Pokud se ROS přes apoplast šíří dál do okolí, mohou postihnout další tkáně, kterážto případná masová umrtí mohou následně tvořit i pouhým okem viditelné léze na povrchu listů (Wohlgenuth et al, 2002), kterým se obvykle říká nekrotické, přestože hypersenzitivní reakce je druhem plánované smrti (více v podkapitole 2.2.2.).

ROS se tedy také mohou chovat jako mezibuněčné signální molekuly. Tam ovšem vstupují do složitých interakcí s fytohormony, proto se na tuto část jejich funkcí práce více zaměří v podkapitole 2.2.4., věnované právě fytohormonům.

2.1.3. Interakce s hořčíkem v LHC II

Klíčovým prvkem fotosyntézy je chlorofyl, obsahující hořčík. Chlorofyl se jeví jako zelený pigment, protože absorbuje modré a červené části viditelného spektra světla a zelené odráží; při ztrátě absorpční funkce se mění složení odraženého světla a tím i barva pigmentu. Při dlouhodobém nedostatku Mg v organismu není například smrk ztepilý (*Picea abies*) schopen dostatečně rychle syntetizovat nové molekuly konkrétně chlorofylu *a*, což vede k postupnému snižování koncentrací pigmentu v buňkách a v důsledku k pomalému a pozvolnému žloutnutí jeho jehlic (chloróza, podrobněji v podkapitole 2.2.2.). Proces není doprovázen žádným zvláštním rozkladem existujících molekul; ten probíhá jako za normálních okolností a pouze se vysloužilé molekuly nenahrazují včas (Siefermann-Harms et al, 2005).

Bylo ovšem zjištěno, že při kombinaci silného nedostatku Mg–optimum je kolem 9 až 1,7 mg hořčíku na g⁻¹ suché váhy jehlic (Ingestad, 1959), zde naměřeno 0,27 mg/g NDM–se zvýšenými hladinami troposférického ozonu (z denních hodnot 18-22 na 88-130 nebo i až 135-190 µg/m³; v noci byly hladiny o 10% nižší) se u smrku tyto chlorózy objevují mnohem rychleji a jsou doprovázeny destabilizací light-harvesting komplexů II (LHC II) kvůli silně oxidačnímu prostředí uvnitř buněk způsobenému ROS. Je pozoruhodné, že ani nedostatek Mg, ani zvýšené hodnoty ozonu po dobu dvou vegetačních období v tomto pokusu samostatně nevyvolaly takovouto masivní odpověď. Pravda, když se během druhého léta koncentrace O₃ po dobu 90 minut zvýšila na závratných 650-850 µg/m³, tak následovalo zesílení chlorózy i destabilizace LHC II u všech studovaných jedinců, ale u smrků lépe zásobených Mg bylo obojí méně výrazné, nežli u „hladovějících“; nutno ovšem dodat, že v této studii byly i „dobře zásobené“ smrky v porovnání s optimem „podvyživené“, což víme jednak proto, že u nich byly nalezeny hodnoty Mg suboptimální, kolem 0,53 mg/g NDM, a jednak protože se na jaře po první zimě u všech jedinců objevilo reverzibilní žloutnutí jehlic, kterého se autoři zbavili dodatečným přísunem Mg; u skutečně dobře živěných smrků by tedy mohly odpovědi vypadat jinak. Převezmeme-li tyto výsledky jako přesné, tak z nich vyplývá, že vnitřní mechanismy pro zvládání těchto stresů přestávají „stíhat“ pouze tehdy, pokud jim smrk musí čelit současně (Siefermann-Harms et al, 2005).

Zvládání oxidativního stresu způsobeného nedostatkem Mg je u smrku ztepilého dle všeho limitováno SOD (Polle et al, 1994). Mohla-li nedostatečná aktivita SOD při odbourávání ·O₂· za katastrofické zhoršení chlorózy i v tomto případě, či zde naopak selhaly jiné antioxidanty–jako například APX přítomné v chloroplastech (Grodén & Beck, 1979), které jsou jinak jak za normálních okolností, tak za nedostatku Mg (Polle et al, 1994) velmi efektivní při zvládání H₂O₂–bude ale ještě potřeba do budoucna lépe prozkoumat. Taktéž zatím chybí práce, které by tyto mechanismy popisovaly u jiných rodů, nežli jenom u smrku; existují nicméně doklady (Lucas et al, 1993) o postupném snižování koncentrací chlorofylu *a* v jehlicích ve spojitosti s dlouhodobým působením ozonu u smrku sítká (*Picea sitchensis*). V této práci, na rozdíl od (Siefermann-Harms et al, 2005), byly zdravé smrky s dostatečným přísunem Mg vystaveny ozonu po tři, nikoliv dvě, vegetační období, a chlorózy se sice nakonec objevily, ale až na příští jaro po třetím roce. Je možné, že v případě delšího pozorování by k podobnému výsledku došlo i u původně nepoškozených „dobře zásobených“ smrků v práci (Siefermann-Harms et al, 2005). Jehličnany si svoji předchozí ozonovou historii koneckonců zapamatovávají („*memory effects*“) skrze stresové metabolity (katechin, stilben), které se v jejich jehlicích pod vlivem dlouhodobého stresu akumulují a následně zůstávají v jehlicích třeba i rok poté, což objasňuje výše popsané „opožděné“ reakce (Langebartels et al, 1998).

To, že práce sledovala odpovědi smrku ztepilého a modřínu opadavého (*Larix decidua*) pouze po dvě vegetační období místo tří, by mohlo také částečně vysvětlovat výsledky u (Wieser & Havranek, 1996), kde dospělí jedinci ani jednoho ani druhého jehličnanu *in situ* nevykazovaly žádné větší odpovědi na dlouhodobě zvýšené, avšak stále realistické, atmosférické koncentrace ozonu (<90 ppb); vědeckou podporu pro jejich úsudek, že starší stromy jsou vůči O₃ méně citlivé, nežli stromky mladé, se jim daří najít již o rok později v práci téhož hlavního autora (Wieser, 1997). Zároveň by ale mohlo jít o to, že byly v této práci ozonu vystaveny vždy pouze některé větve,

zatímco zbytek stromu mu čelit nemusel; jakékoliv ztráty Mg v poškozených jehlicích by tedy mohly být doplňovány relokací z jiných, nestresovaných, částí stromu. Při omezení fumigace na pár větví se doporučuje provádět pouze krátkodobé pokusy a—jelikož minimálně pro uhlík platí, že jsou na jeho importu jehlice nejvíce závislé během otevírání pupenů—nejlépe mimo období jara (Sprugel et al, 1991). V tomto případě nebylo naplněno ani jedno z těchto doporučení, a bohužel tedy zvýšené přemísťování Mg z nezasazených jehlic do těch poškozených nelze vyloučit.

2.2. Poškození na úrovni listu

Předchozí podkapitola se věnovala především procesům, ke kterým dochází v buňkách listu, jelikož právě ony jsou ty, které jsou vystaveny ozonu přímo, zatímco zbytek rostliny pociťuje zvýšení jeho hladiny zprostředkovaně, skrze hormonální a jinou signalizaci; je tomu tak, protože flux ozonu dovnitř buněk, kam se musí dostat, aby v nich mohl cokoli zapříčinit, je pevně navázán na konduktanci průduchů (Laisk et al, 1989), které se ve větších objemech vykytují právě na listech. Tato vlastnost znamená, že listy jsou prvním rostlinným orgánem, na kterém lze účinky ozonu pozorovat.

2.2.1. Degradace voskové kutikuly listu

Začínaje od povrchu, ozon se do buněk mezofylu dostává skrze průduchy proto, že není schopen penetrovat v žádných významných objemech voskovou kutikulu, která zdravý list či jehlici pokrývá (Laisk et al, 1989). Tato kutikula slouží jako bariéra, chránící list před ztrátami vody, vymýváním živin deštěm, mrazovým poškozením, radioaktivním a UV zářením, fyzickým zraněním, vniknutím biotických stresorů (plísňe, hmyz, bakterie, viry) a před jinými potenciálně nebezpečnými vlivy (Ahmad et al, 2015), například právě ozonem.

Nicméně dlouhodobé působení zvýšených koncentrací tohoto plynu na tuto ochrannou vrstvu minimálně u smrku ztepilého výrazně zrychluje její degradaci (Barnes et al, 1988). Jelikož byl efekt

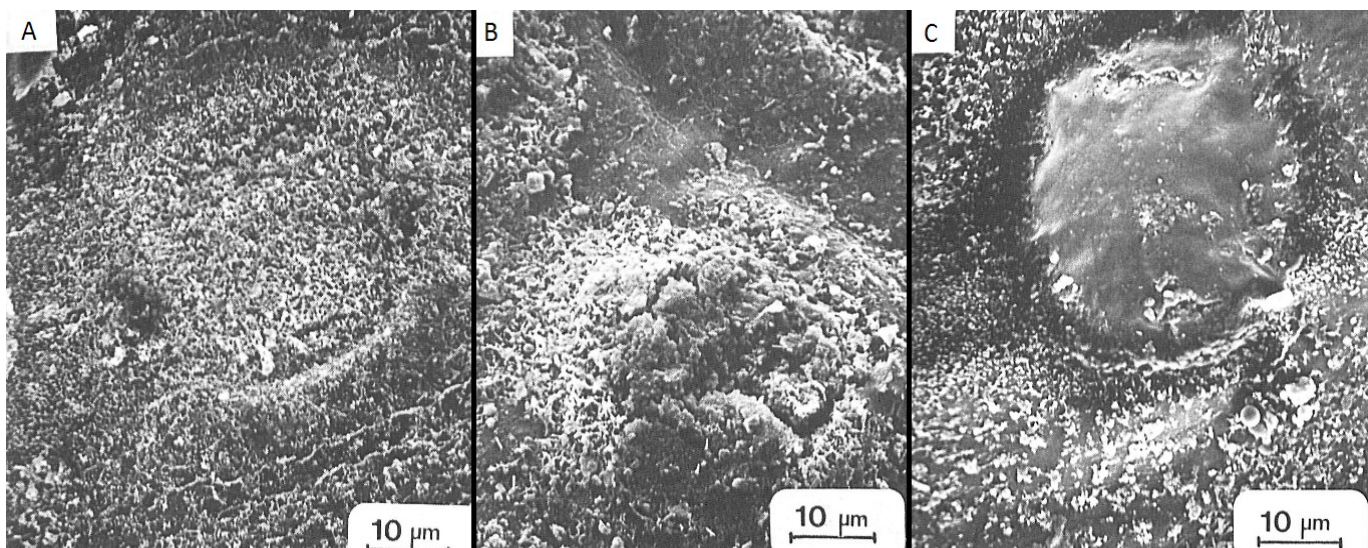


Schéma 5: (A) Před ošetřením ozonem má vosková kutikula v okolí průduchu smrku ztepilého jemnou strukturu. (B) Přibližně polovina průduchu zalepena degradovaným voskem. (C) Průduch zcela ucpán amorfni voskovou masou. Převzato z (Barnes et al, 1988), upraveno.

pozorován pouze na povrchu kutikuly, zatímco její spodní vrstvy zůstávaly nedotčeny, lze předpokládat, že zde atmosférický ozon reaguje přímo s voskem, bez zasahování do procesu jeho syntézy, a v případě smrku konkrétně s nenasycenými mastnými kyselinami v něm (Barnes et al, 1988). Jedná se tedy o zrychlené zvětvávání, podobné tomu, které zapříčiňuje takzvaný „*ozone cracking*“, předčasné tvrdnutí a praskání gumy po vystavení zvýšeným hladinám atmosférického ozonu v důsledku oxidace jejích dvojných vazeb (Haagen-Smit, 1952).

U těch druhů rostlin, které své listoví každoročně shazují a obměňují—mezi borovicovitými jehličnany (*Pinaceae*) tedy u všech druhů z rodu modřín (*Larix sp.*) a u pamodřínu líbezného (*Pseudolarix amabilis*)—je působení ozonu na jejich kutikulu časově omezeno maximálně na dobu několika pár měsíců vegetačního období, a tak zkoumat „dlouhodobé“ dopady tohoto vlivu, jako například právě zrychlení degradace voskové kutikuly, nemá moc velký smysl, protože se u uvedených druhů místo toho aktivně studují buď ozonem způsobená akutní poškození, nebo, u dlouhodobějších studií, dopady přítomnosti ozonu na celkové zdraví stromu; tomu druhému se práce více věnuje v podkapitole 2.3..

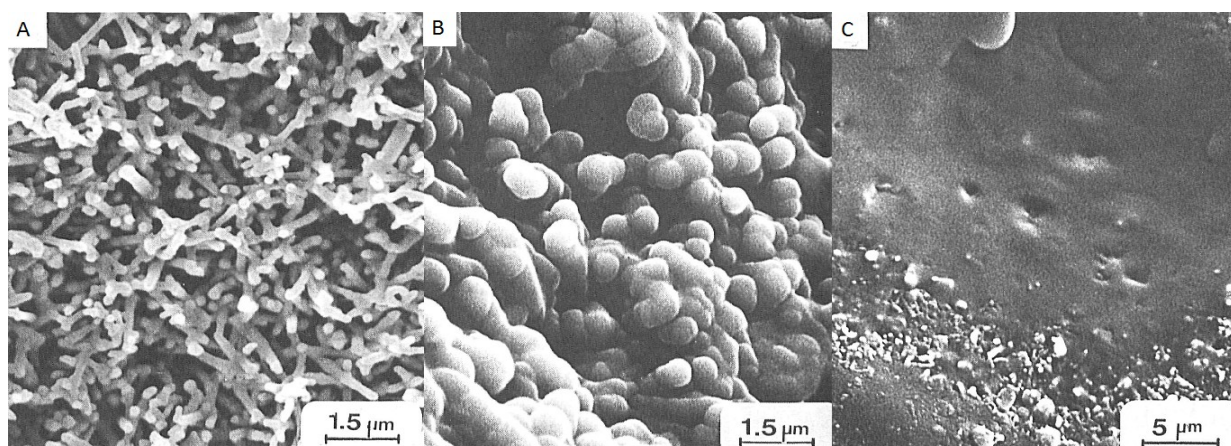


Schéma 6: Stejně vzorky jako v Schématu 5, větší zvětšení. (A) Tenké voskové krystalky. (B) Roztátý vosk se začíná shlukovat do větších celků. (C) Jednorodá masa. Převzato z (Barnes et al, 1988), upraveno.

Pro druhy stálezelené, které si své jehlice ponechávají roky (tedy všechny ostatní druhy z čeledi borovicovitých), má logicky dlouhodobá přítomnost ozonu na povrch jehlic výrazně viditelnější dopad. U těchto je vhodné rozlišovat mezi staršími jehlicemi z předešlých let a jehlicemi novými—běžné je označení *c* (pro *current year*, letošní rok) a *c+n* (*n* zde počet předešlých let)—jelikož se u starších jehlic degradační účinky ozonu jednak kumulují, jednak přidávají k přirozeným procesům spojeným se stárnutím. Zmíněná degradace má podobu rozkladu této voskové vrstvy z její původní podoby, sítě tenkých krystalků, do amorfni roztavené masy bez jakékoliv viditelné struktury (Barnes et al, 1988). Toto vede ke dvěma rozličným následkům. Prvním je ztráta hydrofobních vlastností kutikuly—vypočítatelné skrze úhel, který zaujímá kapka vody vůči povrchu jehlice—a tedy i její schopnosti odolávat škůdcům či vymývání živin deštěm, i když tedy nevypadá, že by zrovna toto pro jehličnany, na rozdíl od širokolistých rostlin, představovalo statisticky významný problém (Lucas et al, 1993; Schreuder et al, 2001). Druhým, pravděpodobně vážnějším, následkem je postupná okluze průduchů nahromaděním vosku v jejich předstomatálních komorách (Barnes et al, 1988).

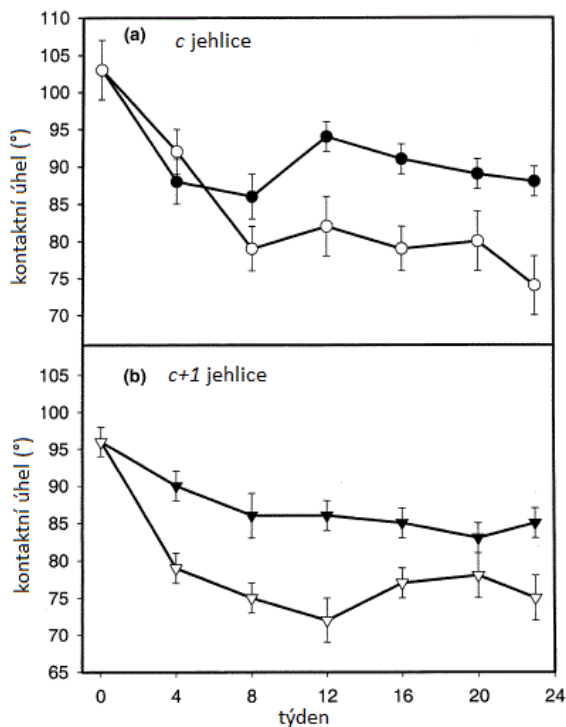


Schéma 7: Změny hydrofobních vlastností jehlic douglasky tisolisté v čase v průběhu ošetření ozonem. Černé symboly představují kontrolu, bílé ošetřeny O₃. Převzato z (Schreuder et al, 2001), upraveno.

U jehlic počínaje *c+2* a starších jsou tyto dopady zanedbatelné, jelikož ty už mají tuto vrstvu degradovanou přirozenými procesy, ale u *c* jehlic a zejména *c+1* vedou k jejich předčasnému znehodnocení (Barnes et al, 1988), což nese jisté důsledky na celkové zdraví stromu, více viz kapitola 2.3..

2.2.2. Chlorózy

Zevně nejviditelnější projevy působení ozonu jsou chlorózy, nepřírodně žluté oblasti jehlic. Žluté zabarvení je způsobené oxidací hořčíku obsaženého v chlorofylu a tedy jeho znehodnocením (viz podkapitola 2.1.3.). Časem chlorózy mohou přecházet až do nekrotických úseků zbylých po odumření buněk. Kvůli své vysoké nestabilitě O₃ neproniká hluboko do rostlinných pletiv a přímé důsledky jeho přítomnosti jsou omezeny na nejbližší okolí průduchů, kterými se dostal do rostliny, a tedy nejčastěji na svěrací buňky; vznikají-li chlorózy či nekrózy pouze tam, říkáme jim bodové. V závislosti na konkrétním druhu rostliny a jeho citlivosti na O₃ ale může ozonem navozená chloróza postihovat i celý povrch jehlice; v takovém případě se



Schéma 8: (A, B) Chlorotické jehlice sazenic smrku ztepilého po ošetření ozonem. (C) Zdravé jehlice. Převzato z (Langebartels et al, 1998).

žloutnutí nejčastěji, ovšem ne vždy, šíří od koncečku jehlice (apexu) k bázi (Richards et al, 1968; Wulff et al, 1996).

To, že zvýšené koncentrace troposférického ozonu zapříčiňují u jehlic jehličnanů vznik chloróz, ať už bodových či plošných, bylo poprvé pozorováno na borovici těžké/žluté (*Pinus ponderosa*) již v šedesátých letech minulého století (Miller et al, 1963) a následně u borovice vejmutovky (*Pinus strobus*) pro zvlášť zvýšenou citlivost těchto dvou druhů vůči O₃ (Linzon, 1966; Richards et al, 1968). Časem se začaly množit doklady o podobných reakcích i u o něco méně citlivých jehličnanů, například u borovice lesní (Mortensen, 1994; Kivimäenpää et al, 2010) nebo u dřevin rodu smrku (Lucas et al, 1993), zejména u smrku ztepilého (Mortensen, 1994; Siefermann-Harms et al, 2005). Dnes je většina vědeckých prací o odpovědích borovicovitých jehličnanů na ozon zaměřena právě na smrk.



Schéma 9: Vpravo sazenice borovice lesní ztrativší všechny c+1 jehlice po ošetřením ozonem. Vlevo zdravé kontroly. Převzato z (Langebartels et al, 1998).

V jedné studii (Mortensen, 1994), sledovavší sazenice devíti různých druhů borovicovitých jehličnanů od vyklíčení, se zvýšená chloróza vyskytla u všech druhů, s jednou výjimkou. Pokusu byl proveden na: smrku ztepilém (*Picea abies*) původem ze tří různých stanovišť, smrku sivém (*Picea glauca*), smrku sitka (*Picea sitchensis*), borovici lesní (*Pinus sylvestris*) taktéž ze tří různých stanovišť, borovici pokroucené (*Pinus contorta*), borovici kleč (*Pinus mugo*), modřínu japonském (*Larix leptolepis/kaempferi*), modřínu sibiřském (*Larix sibirica*), a douglasce tisolisté (*Pseudotsuga menziesii*); právě u douglasky se jako jediné žádné chlorózy neobjevily. Takto konzistentní chlorózy byly o to nápadnější, že ostatní odpovědi těchto druhů na zvýšenou koncentraci ozonu a zejména na zvýšenou koncentraci oxidu uhličitého v téže studii se značně lišily: změny v přírůstku biomasy, ve větvení, v poměru shoot/root (nadzemní část ku kořenovému systému), v poměru

jehlice/stonek. Chlorózy se u těchto sazenic objevily už po 81-116 dnech strávených ve skleníku s ovzduším o koncentraci ozonu kolem 70 nmol/mol (u kontrol: pod 15 nmol/mol), tedy mnohem rychleji, než bylo pozorováno u pár let starých stromků (Lucas et al, 1993) nebo dospělých stromů, u kterých se chlorózy nemusí objevit vůbec (Wieser & Havranek, 1996). Sazenice, juvenilní jedinci, jsou tedy dle všeho zvláště náchylné k poškození ozonem, zejména v porovnání s dospělými jedinci u odolnějších druhů, jako je smrk ztepilý (Wieser & Havranek, 1996; Siefermann-Harms et al, 2005).

V jiné studii, zaměřené na dospělé jedince borovice halepské (*Pinus halepensis*), žijících v přírodních podmínkách a vystavených dlouhodobému působení ozonu o průměrných hodnotách kolem 35-56 ppb, bylo zjištěno, že chlorózy vznikající u těchto stromů jsou statisticky významně svázány s koncentrací ozonu na daném stanovišti, a opravdu se nejedná o pouhý doprovodný jev přirozené senescence, přestože zde chloróza primárně postihovala *c+I* jehlice, nikoliv *c* jehlice (Kivimäenpää et al, 2010).

Jak už bylo zmíněno (Mortensen, 1994), jednou nápadnou výjimkou z univerzality chlorotické odpovědi u jehličnanů se zdá být douglaska tisolista, která vůči O₃ sice není zcela imunní (podrobněji v podkapitole 2.3.1.), ale chlorózy se u ní v reakci na něj neobjevují. Není zřejmé, zdali je nedostatek prací zkoumajících možný vnik chloróz u ní důsledek její odolnosti v tomto ohledu, nebo máme mylnou představu o její odolnosti právě kvůli nedostatku prací. Co ovšem zřejmé je, je fakt, že z jiných příčin chlorózy u douglasky vznikat mohou, například nepřekvapivě z nedostatku hořčíku (Harrison et al, 1994), nebo po akutní otravě plynným Cl₂ (Schreuder & Brewer, 2001), takže by rozhodně měl smysl výzkum zaměřený na faktory pomáhající jí zvládat oxidativní stres způsobovaný konkrétně ozonem a kde a jak tyto faktory selhávají při stresech jiných.

Při zvláště vysokých koncentracích ozonu či u výjimečně citlivých jehličnanů mohou tato bodová chlorotická poškození eskalovat do odumírání buněk skrze mechanismy podrobněji popsané v podkapitolách 2.1.2. a 2.2.4., tedy přechod oxidativního výbuchu do hypersenzitivní reakce.

2.2.3. Změny v anatomii jehlice

Podobně jako u dopadů fyziologických, i na anatomické úrovni se většina nejdramatičtějších odpovědí jehličnanů na ozon odehrává bezprostředně blízko přímého vstupu ozonu do rostlinného těla, tedy v buňkách mezofylu nedaleko průduchů.

Tak například v práci (Zapletal et al, 2018) se uvádí vztah mezi dávkou O₃, získanou dospělými jedinci smrku ztepilého, a zvětšením mezibuněčných prostor v mezofylu. Avšak se nejedná o efekt specifický pouze pro zranění ozonem: většina zaznamenaných makroskopických anatomických rozdílů (právě větší mezibuněčné prostory, tlustší jehlice, užší cévní svazky, apod.) mezi jehlicemi dospělých borovic halepských, rostoucích na rozličných stanovištích studovanými v práci (Kivimäenpää et al, 2010), se lépe vysvětlovala nedostatečným přísunem vody, nežli působením O₃. Ozon naopak mohl za rozdíly mikroskopické uvnitř buněk mezofylu (vysoké počty mitochondrií a peroxizomů, malé chloroplasty, menší část buněk zabraná chloroplasty, apod.).

Podobně, klony borovice těžké, vystavené po 2-3 týdny denním (trvání cca 12 hodin) koncentracím O₃ kolem 450 ppb (Evans & Miller, 1972), sice zevně viditelné chlorózy vykazovaly

teprve na konci tohoto období, ale známky vnitřního poškození v buňkách mezofylu již během prvních pár dnů pokusu: konkrétně v nich po pouhých třech dnech došlo ke sražení disulfidových bílkovin, po pěti dnech se zcela vytratily jakékoliv barvitelné sacharidy, a po šesti dnech zmizelo rovnoměrné rozdělení chloroplastů; následně v některých buňkách zcela přestala být zaznamenatelná i cytoplazma, cytologické poškození, které už bylo neslučitelné se životem. Žádné viditelné nekrózy nicméně dle autorů nebyly pozorovány, pravděpodobně protože u většiny buněk nedošlo ke kolapsu buněčných stěn a i takto rychlá smrt buněk byla pořád ještě PCD.

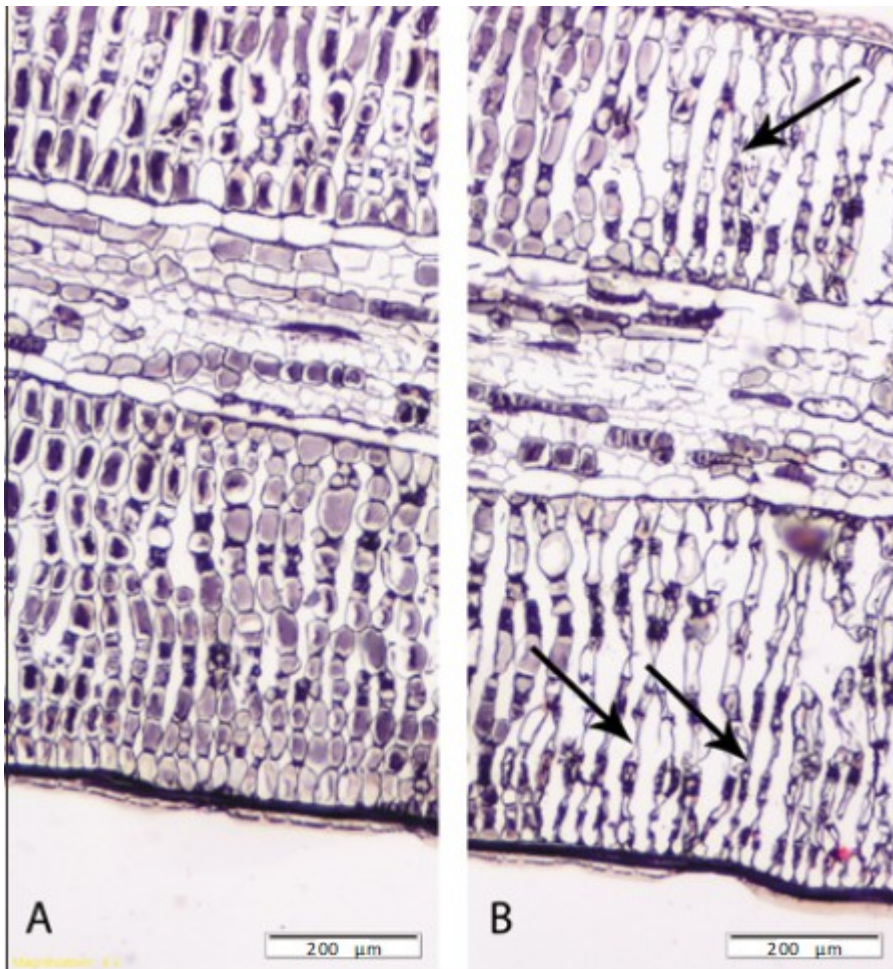


Schéma 10: (A) Zdravé kontroly. Buňky mezofylu smrku ztepilého. (B) Šipky ukazují zvětšené mezibuněčné prostory v mezofylu ozonem ošetřených jehlic. Převzato z (Zapletal et al, 2018).

především tím, že je její rozsah přesně lokalizován v místě poškození a kontrolován tak, aby neohrozil život celého organismu. Je-li ale rostlina oslabena, nebo z nějakého jiného důvodu nedokáže vycítit přítomnost škůdce včas, může se zpustit takzvaná systémová hypersenzitivní reakce, postihující velké části rostliny (pro review, viz: Künstler et al, 2016).

Ozon biotrofním patogenem není. Hypersenzitivní reakce nemá při konfrontaci ozonu rostlinou žádnou očividnou funkci; odumření průduchů sice zabrání dalšímu vnikání O_3 do rostliny, ale za cenu ztráty schopnosti výměny plynů. Lze proto prozatím předpokládat, že se nejedná o evoluční adaptaci na ozon, a že jde o patologickou reakci.

PCD v reakci na ozon může nabírat v zásadě dvou podob: předčasnou senescenci, pomalé žloutnutí listů od apexu po bázi následované opadem jehlice (Linzon, 1966; Lucas et al, 1993; Mortensen, 1994; Wulff et al, 1996; Morris et al, 2000; Siefertmann-Harms et al, 2005; Kivimäenpää et al, 2010), a hypersenzitivní reakci, pro kterou jsou typické bodové léze tvořené z odumřelých buněk uprostřed jinak živé jehlice (Richards et al, 1968; Harrison et al, 1994; Schreuder & Brewer, 2001).

Primární funkcí hypersenzitivní reakce je ochrana před biotrofním škůdcem: vycítí-li buňka přítomnost patogenu, rychle spustí svou vlastní PCD a tím zabrání útočnickovi v napadení živé tkáně (mechanismus zpuštění PCD podrobněji popsán v podkapitole 2.2.4.). Hypersenzitivní reakce se liší od skutečné nekrózy, nekontrolované smrti buněk,

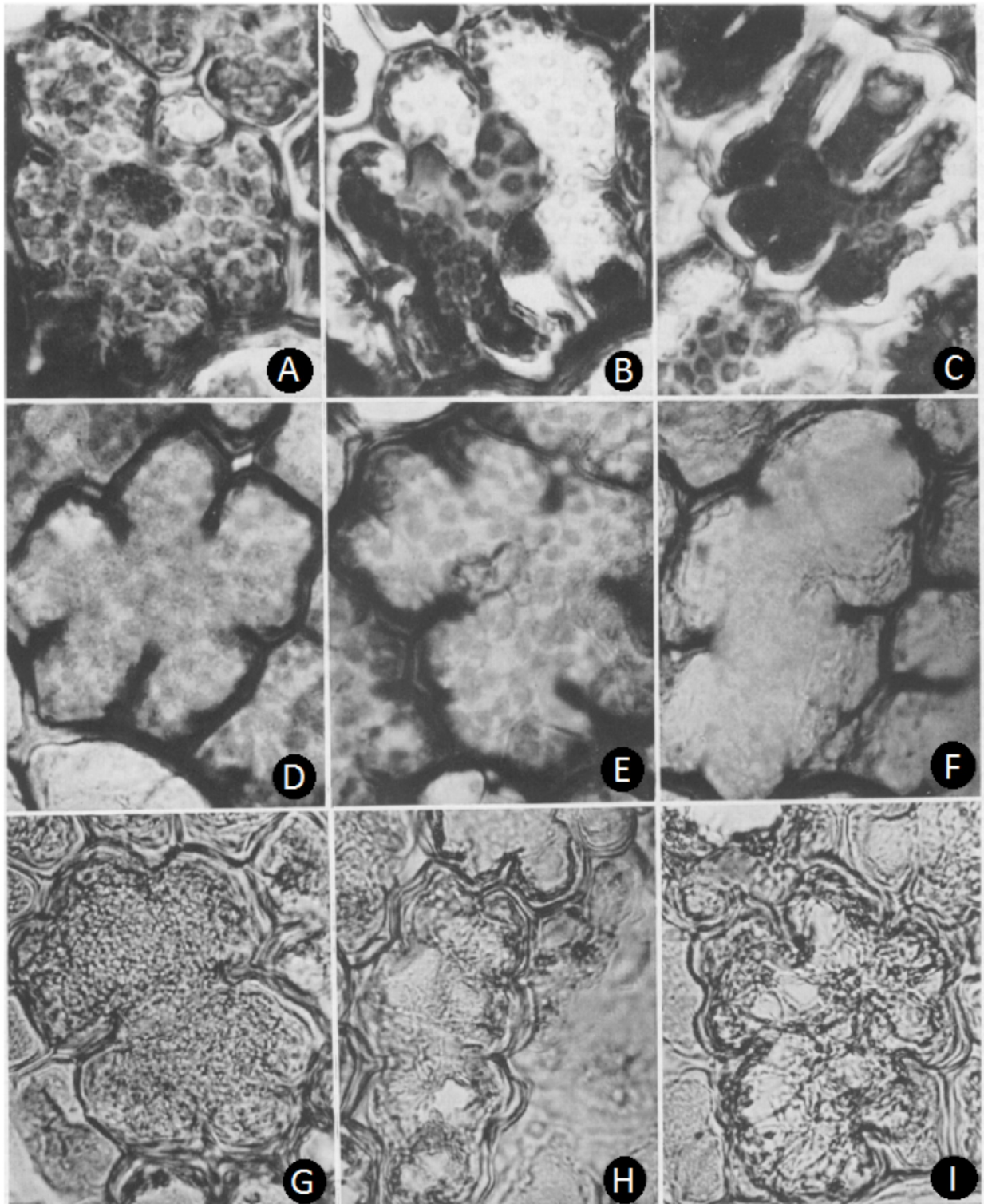


Schéma 11: (A) Ozonu nevystavené fixované buňky mezofylu borovice těžké. Lze rozeznat rovnoměrně rozmístěné chloroplasty. (B) 3 dny ozonace. Chloroplasty se přemísťují k buněčným periferiím. (C) 6 dní ozonace. Cytoplazmatický obsah v buněčných periferiích. Chloroplasty nerozeznatelné. (D) Ozonu nevystavené buňky. Zbarvené sacharidy, viditelné chloroplasty. (E) 2 dny ozonace. Méně rovnoměrné rozmístění chloroplastů. (F) 5 dní ozonace. Sacharidy se již nezbarvují. (G) Ozonu nevystavené buňky. Stejnorodé zbarvení disulfidů. (H) 2 dny ozonace. Počátky srážení disulfidů. (I) Zcela vysrážené disulfidy. Převzato z (Evans & Miller, 1972), upraveno.

2.2.4. Fytohormony

Od listové úrovně je také dobré začít mluvit o interakcích ozonu, ROS a oxidativního stresu s fytohormony. Tyto fyziologicky aktivní látky vznikají na úrovni buněčné, avšak následně jsou přes apoplast vyplavovány ven, kterak ovlivňují celou rostlinu; jejich účinky se navíc silně liší v závislosti na konkrétním typu buňky, do které jsou dopraveny. Bohužel jenom velmi málo prací se soustředí na aktivitu fytohormonů konkrétně u jehličnanů, proto tato podkapitola primárně čerpá informace z výzkumu jiných rostlin.

Jedním z nejdůležitějších fytohormonů ve stresové signalizaci je kyselina abscisová. Pravděpodobně hlavní rolí ABA je otevírání Ca^{2+} kanálů aktivovaných přítomností ROS—konkrétně H_2O_2 —a vyplavování vápenatých kationtů do cytoplazmy svěřacích buněk průduchů v listech v reakci na sucho, což pomáhá rostlině zadržovat vodu a neztrácet ji skrze průduchy (Pei et al, 2000). ABA se tedy aktivuje v reakci na oxidativní stres (protože jak již bylo zmíněno, ROS vznikají i v odpovědi na sucho) a následně vyrábí další ROS (aby se otevřely Ca^{2+} kanály) v pozitivní zpětné vazbě. Jak již ovšem bylo řečeno v podkapitole 2.1.2., ROS vznikají při mnohých druzích stresu, nejen kvůli suchu, a také tedy při náhlém zvýšení hladiny ozonu v ovzduší; bylo dokonce zjištěno, že H_2O_2 možná není pouze signálem pro syntetizaci ABA, ale že ABA je díky H_2O_2 přímo „vyráběna“ skrze oxidaci jejích prekurzorů (McAdam et al, 2017). Výsledná zvýšená přítomnost ABA ve svěřacích buňkách—které musí nutně čelit zvýšeným ozonovým koncentracím v ovzduší jakožto první (Laisk et al, 1989)—poté následně vede k uzavření průduchů. Tímto je zabráněno dalšímu pronikání ozonu dovnitř listu.

Tato rychlá odpověď má však pouze dočasný účinek a nejedná se o přizpůsobení na dlouhodobější přítomnost ozonu, což je logické, neboť permanentní uzavření průduchů by vedlo k neschopnosti rostliny provádět jakoukoliv výměnu plynů. Pomineme-li druhovou specifitu už samotného uzavírání průduchů v reakci na O_3 —některé rostlinné druhy, jako například orlíček obecný (*Aquilegia vulgaris*), své průduchy nezavírají ani při koncentracích tak závažných, jako 1000 ppbv, nejspíše kvůli absenci jakéhokoliv zintenzivnění výroby ABA (McAdam et al, 2017)—v rámci stabilizačních negativních zpětných vazeb se po prvotní odpovědi pravděpodobně rychle syntetizují ABA-katabolizující enzymy, které v buňce setrvávají po delší dobu a snižují koncentrace ABA pod úroveň předcházející ozonovému pulzu; lze proto předpokládat, že případné znovunavýšení hladiny H_2O_2 na stejnou „pulzní“ úroveň by k opětovnému uzavření průduchů nestačilo (McAdam et al, 2017). Praktický přínos tohoto mechanismu pro rostlinu tedy nejspíš spočívá především v případě, že se přes ní převalí malý oblak zvýšeného ozonu (například během obzvláště prosluněného letního dne), který následně zase odvane, a rostlina se poté potřebuje nějak dostat ven z ABA- H_2O_2 zpětnovazebné smyčky.

Naopak pro rostlinu negativním důsledkem takovéto aklimace k H_2O_2 může být snížená schopnost regulace průduchů za stavu sucha, které budou v budoucnu v souvislosti s klimatickou změnou nejspíše nastávat častěji; normální reakcí na nedostatek vody je přece právě vyplavování ABA v odpovědi na H_2O_2 . Potvrzením tohoto podezření se zdá být nález (Schreuder et al, 2001), že přestože se odříznuté jehlice sazenic douglasky tisolisté vystavené zlehka zvýšenému O_3 (až 45 ppbv) po dobu 23 týdnů nezdály být náchylnější k silnějšímu vysychání nežli sazenice

prakticky bez ozonu (~1 ppbv), listy dvou druhů topolu, které byly taktéž součástí pokusu, vykazovaly velké rozdíly v závislosti na předchozích ozonových koncentracích; co je důležitější, všechny případy silnějšího vysychání (jak u topolů, tak u douglasky) se shodovaly s případy většího vysychání konkrétně během prvních 60 minut schnutí, po uběhnutí kterých bylo 99% všech průduchů uzavřeno (před odříznutím to nebylo více než 60%, a někdy i 0%). U topolů byla pozorována vysoká míra korelace mezi hladinou O₃ v ovzduší a následným větším vysycháním, což naznačuje, že zvýšené koncentrace ozonu přímo přivodily pomalejší zavírání průduchů ve srovnání s kontrolami. U douglasek takováta spojitost zde nebyla pozorována, ale vzhledem k tomu, že u jejích *c+1* jehlic byly ztráty vody větší, nežli u *c* jehlic, a také k tomu, že O₃ zrychluje senescenci, tak lze předpokládat, že v dlouhodobějším horizontu by podobný efekt nastal i u ní; tím spíše, že u jiného borovicovitého jehličnanu–smrku ztepilého–větší náchylnost k vysychání způsobená pomalejším zavíráním průduchů po dlouhodobém (tři léta) ošetření ozonem pozorována byla (Barnes et al, 1990). V budoucnu by tedy ozon pravděpodobně mohl zhoršovat schopnosti jehličnanů odolávat suchu.

Dalšími z hlediska ROS důležitými fytohormony jsou kyselina salicylová, kyselina jasmonová a ethen. Všechny tři hrají v rostlinách mnoho rozličných rolí, ovšem s ohledem na O₃ jsou nejrelevantnější jejich vzájemné interakce v regulaci plánované buněčné smrti. Zjednodušeně řečeno, v reakci na ozónem-produkovaná ROS v apoplastu rostlina vchází do prvotních stádií PCD a začíná produkovat větší množství ethenu a SA (Langebartels et al, 1998; Overmyer et al, 2000; pro review, viz: Overmyer et al, 2003). Není ovšem zatím zcela objasněno, jakým způsobem je buňka schopna tyto extracelulární ROS rozpoznat (Choi et al, 2017). Bylo také navrženo, že to, co pozorujeme jako zvýšenou produkci ethenu u symptomatických stromů v reakci na O₃, je ve skutečnosti přirozeně zvýšenou hladinou výroby ethenu některých stromů, které poté reagují na ozon citlivěji (Telewski, 1992); pozor, tato práce obsahuje četné pravopisné chyby, včetně záměny znamének „<“ a „>“, přestože samotný předložený výzkum borovic těžkých a borovic Jeffreyových se zdá být kvalitní. SA je každopádně velmi aktivní také v iniciaci PCD nastávající ke konci senescence, což víme z pokusů na mutantech *Arabidopsis thaliana* s poškozenou SA signalizací; žloutnutí i odumírání buněk u těchto mutantů nastávalo opožděně a celkově méně (Morris et al, 2000).

Signalizace ethenem a SA poté vede k aktivaci NADPH oxidáz RBOHD na buněčné membráně, které následně začínají produkovat další ROS (konkrétně ·O₂). PCD však zároveň vede k produkci JA; ta ale v této odsouzené buňce není schopna nic učinit, neboť ji SA a ethen inhibují. JA je tedy vyplavována do sousedních buněk a s předstihem v nich inhibuje produkci SA a ethenu; zároveň však do nich putují i ethen s SA již vyprodukované v původní buňce. SA a ethen v těchto buňkách aktivují místní NADPH oxidázy, které tímto začínají vyrábět další ROS; takto pokračující replikace signálních ROS přes rostlinné tělo se nazývá ROS vlna (*ROS wave*). Převládá-li v této sousední buňce SA a ethen, započne PCD i v ní, převládne-li naopak JA, PCD je zastavena a s ní i další šíření signálu. Tímto se kontroluje rozsah odumření v reakci na poškození (Overmyer et al, 2000; pro review, viz: Overmyer et al, 2003).

Kromě inhibice JA ale SA, nikoliv však ethen či sama JA, zdánlivě také funguje jakožto antagonist šíření ·O₂· přes apoplast v ROS vlně. Předpokládá se, že by taková inhibice mohla hrát

roli při určování obranných priorit rostliny: čelí-li již její určitá část například útoku patogenu (je-li tedy v této oblasti již zvýšená hladina SA), tak poplašný signál ROS vlny pro ni představuje rušivý element, a SA ho proto tlumí (Xu & Brosché, 2014). Nicméně s jistotou toho o fytohormonech pořád ještě víme málo, a o jejich fungování konkrétně v jehličnanech o to méně, bude proto potřeba do budoucna pokračovat v jejich aktivním výzkumu.

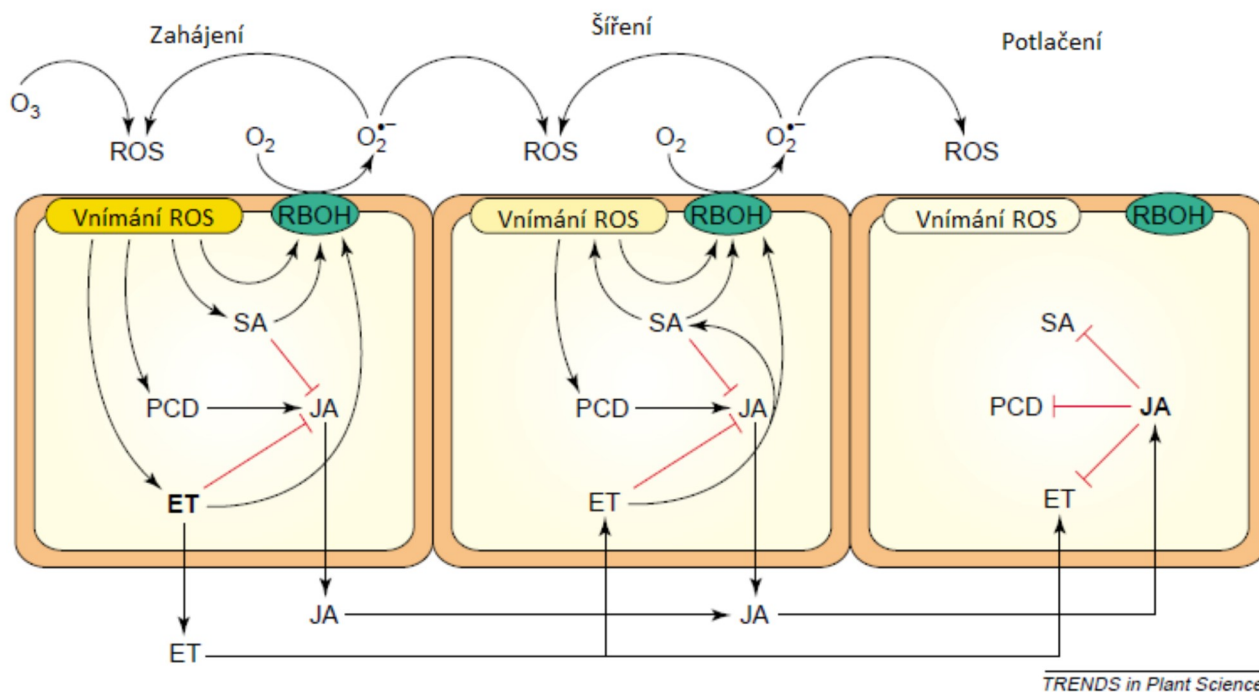


Schéma 12: Souhrnné zjednodušené schéma fungování ROS vlny. „ET“ zde ethen. Převzato z (Overmyer et al, 2000), upraveno.

2.3. Poškození rostliny jako celku

Potřeba rostliny bránit se negativním vlivům ozonu nutně znamená dramatické změny v celkové vitalitě rostliny. Energií, kterou by jinak vynakládala na vlastní růst nebo do potomstva, totiž musí „plýtvat“ na syntézu dodatečných ochranných enzymů a na obnovu poškozených částí. To ale není vše: sama zacílenost největšího způsobovaného poškození na průduchy a chlorofyl následované ochromením jejich funkce přímo vede k poruchám rostlinného růstu a vývoje.

Ne u každého jehličnanu třeba i stejného druhu je však růst ochromen do stejné míry: na celkový stav starších smrků ztepilých, jejichž organism je adaptován na vyšší poměr $c+2$ a starších jehlic–které již nejsou tak fotosynteticky efektivní jako jehlice mladší–vůči c a $c+1$ jehlicím, má například okluze průduchů způsobená degradací voskové kutikuly (popsáno v podkapitole 2.2.1.) menší dopad, nežli u smrků mladších; a aby toho nebylo málo, zvýšená okluze sice má silný dopad na flux CO_2 do buněk jehlic, zároveň ale také snižuje i flux O_3 tamtéž, což vede k menším poškozením vnitřního metabolismu starších stromů, nežli stromů mladších (Wieser, 1997).

2.3.1. Změny v celkovém ročním přírůstku biomasy

Uzavření průduchů, první reakce na přítomnost O_3 (blíže popsáno v podkapitole 2.2.4.), nutně vede ke snížení rychlosti výměny plynů. To je ostatně cílem tohoto obranného manévru–méně ozonu se dostane dovnitř, čímž se předejde většině jeho negativních vlivů. V důsledku však tento

krok také vede ke snížení rychlosti fotosyntézy, což znamená méně ze slunce vytěžené energie, méně vyprodukovaných sacharidů, včetně celulózy, méně zásob škrobu na překonání těžkých období, méně možností investovat do potomstva—celkový objem primární produkce jedince je snížen (Smeulders et al, 1995). Proto po čase rostlina průduchy raději znovu přiotevírá, i za cenu vystavení se ozonu—což má následně další negativní vliv na fixaci uhlíku, neboť jak již bylo zmíněno, ROS vznikající z ozonu taktéž napomáhají degradovat molekuly chlorofylu (Lucas et al, 1993; Siefermann-Harms et al, 2005). Oba tyto faktory se tedy kumulují a ve výsledku rostlina roste pomaleji.

Dobrým příkladem zde může sloužit douglaska tisolistá. Z toho, co je zatím známo, to vypadá, že tento jehličnan zvládá zvýšený O₃ bez vzniku chloróz, avšak v jedné studii (Smeulders et al, 1995) s dospělými douglaskami, vystaveným vzdušné koncentraci O₃ 400 µg/m³ po dobu devíti dnů během měsíce října, se jejich celková fixace značeného ¹⁴C oproti kontrolám nevystaveným žádnému O₃ snížila o 39% (z 272,1 kBq/g na 164,8 kBq/g); práce taktéž mimo jiné sledovala odpovědi dospělých douglasek na devět dnů v 200 µg/m³ a v období jara po puknutí nových pupenů (tedy na přelomu duben/květen) se u nich celková fixace ¹⁴C snížila o 43% (z 141,5 kBq/g na 80,4 kBq/g). V jiné studii (Mortensen, 1994) byl celkový přírůstek suché biomasy sazenic douglasky vystavených hodnotám ozonu kolem 70 nmol/mol po dobu 116 dní zaznamenán jakožto o 18% nižší v porovnání se sazenicemi vystavenými hodnotám pod 15 nmol/mol.

V téže práci (Mortensen, 1994) byla ostatně podobná odpověď pozorována taktéž u smrku sitka, růst sazenic kteréhož se po 115 dnech zpomalil o 13%, a jednoho ze tří podtypů sazenic borovice lesní, u kterého po 111 dnech nastal pokles přírůstku suché hmotnosti o 23%. Nutno ale dodat, že u ostatních šesti druhů jehličnanů zkoumaných v této práci k žádnému zpomalení růstu celého stromku nedošlo; jde tedy o druhově specifickou odpověď.

Z dalších dokladů o druzích, u kterých k tomuto jevu dochází, lze uvést pozorování (Peterson et al, 1987), že dospělí jedinci borovice Jeffreyovy (*Pinus jeffreyi*) rostoucí v oblastech s vyššími troposférickými koncentracemi O₃ vykazovaly zhruba po roce 1965 v porovnání s borovicemi rostoucími v oblastech méně znečištěných zpomalení laterálního růstu kmene o 11%, přičemž u borovic starších než 100 let bylo snížení dokonce 14,9%.

Na druhou stranu existují doklady (Sugai et al, 2018) o ozonem způsobené hormezi u modřínu japonského (*Larix kaempferi*) a u jeho hybridu s modřínem dahurským (*Larix gmelinii* var. *japonica* × *Larix kaempferi*) vystavených koncentracím O₃ 10 nmol/mol až 40 nmol/mol přes dvě léta; u obou druhů bylo pozorováno malé snížení celkové biomasy, ale jejich rychlost fotosyntézy se nápadně zvýšila. Naopak při 60 nmol/mol O₃ se rychlost fixace uhlíku obou druhů zpomalila natolik, že již pravděpodobně nebyla schopna kompenzovat energetické výdaje na antioxidaci ROS a významně se zpomalil i jejich celkový růst. Obecným pravidlem je, že stálezelené dřeviny odolávají ozonu lépe, nežli ty opadavé (Calatayud et al, 2010; Sugai et al, 2019), ale porovnáme-li odpovědi modřínu v této i v jiných pracích (Mortensen, 1994; Wieser & Havranek, 1996) s jinými jehličnany—na jedné straně s borovicí těžkou a na straně druhé s douglaskou tisolistou—tak se nezdá, že by zde modříny výjimečně vybočovaly. Lze proto předpokládat, že hormezi ozon může vyvolávat i u některých jiných druhů jehličnanů. Téma bude třeba lépe prostudovat.

Je známo, že vyšší hladiny CO₂ v ovzduší mají na rostliny, zejména zpočátku, opačný dopad nežli O₃ a přírůstky biomasy obvykle nejprve zvětšují. Podobně jako s ozonem jsou však i tyto účinky velmi druhově specifické, a aby toho nebylo málo, tak v případě limitace N se rostliny k CO₂ rychle aklimatizují, přivírají průduchy a vracejí fotosyntézu na původní úroveň (Kytöviita et al, 2001; pro review, viz: Ainsworth & Long, 2005). Jako jeden konkrétní příklad za všechny lze uvést výše opakovaně zmíněný výzkum (Mortensen, 1994). Z devíti sledovaných druhů jehličnanů, strávivších 81-116 dní v ovzduší o 730 μmol/mol CO₂, se celková suchá hmotnost v porovnání s kontrolními sazenicemi (355 μmol/mol CO₂) zvětšila u sazenic modřínu japonského (o 33%), u modřínu sibiřského (o 38%), u smrku sivého (o 47%), a u smrku sitka (o 16%). U ostatních pozorovaných druhů (smrk ztepilý, borovice lesní, borovice pokroucená, borovice kleč, douglaska tisolistá) však nedošlo k statisticky významným rozdílům. V druhé části téhož pokusu došlo po dvou letech s vyššími hladinami CO₂ k nárůstu suché biomasy ve srovnání s kontrolami u obou pozorovaných druhů, tedy u smrku ztepilého (o 35%) a borovice lesní (o 36%).

Mohlo by se proto zdát, že by se snad účinky zvýšených koncentrací O₃ a CO₂ mohly navzájem neutralizovat a k žádným změnám v celkových přírůstcích biomasy jehličnanů nedojde. Jenže, jelikož zvýšené koncentrace O₃ v troposféře přivozují přivření průduchů, nejenže se tlumí intracelulární dopad ozonu, ale zmenšuje se i tok CO₂ tamtéž, což znemožňuje naplno využít tohoto většího množství uhlíku, podobně jako při limitaci N. Oslabení uhlíkového sinku by vedlo k méně CO₂ odstraňovaného z troposféry a v důsledku ke zhoršení jeho i tak vzestupných trendů, a nakonec k zesílení skleníkového efektu. Jak se uvádí v diskuzi práce (Mortensen, 1994), není možné odhadovat dopady kombinovaných CO₂ a O₃ z jejich dopadů zvlášť. Také nesmíme zapomenout na druhovou specifitu odpovědí: i kdyby se snad u některých druhů účinky navzájem zrušily, u jiných by k tomutož vůbec nemuselo dojít.

2.3.2. Jiné růstové změny

Kromě menších celkových přírůstků biomasy se u mnohých borovicovitých jehličnanů v odpovědi na ozon taktéž v průběhu růstu zvětšují poměry shoot/root (dále S/R) a jehlice/stonek (dále J/S) z důvodu změn v prioritizaci sinků pro fixovaný uhlík; tento typ reakcí je však také vysoce rodově, druhově a geograficky specifický.

Tak, v jedné práci (Mortensen, 1994) byl u sazenic smrku ztepilého po jejich vystavení koncentracím O₃ kolem 70 nmol/mol po dobu 110-111 dní v porovnání se sazenicemi vystavenými hodnotám pod 15 nmol/mol pozorován nárůst J/S, v závislosti na původu stromku, z 2,6 na 3,1, z 2,3 na 2,9, a z 1,7 na 2,3; k statisticky významnému nárůstu S/R však došlo pouze u jednoho ze tří původů, a to sice z 2,5 na 2,8. U sazenic borovice lesní v téže práci byly mezitím po 111-112 dnech nárůsty S/R statisticky významné u všech tří původů (z 3,0 na 3,6; z 3,0 na 3,3; z 3,0 na 3,9), zatímco nárůst J/S jen u dvou z nich (z 6,4 na 7,3; z 6,2 na 7,6). Významné nárůsty S/R byly tamtéž pozorovány ze sedmi dalších druhů pouze u jednoho: po 112 dnech u borovice pokroucené (z 2,6 na 3,6), u které byl signifikantní i nárůst J/S (z 10,7 na 11,6). U ostatních druhů nebyl nárůst J/S významný pouze u smrku sivého po 115 dnech; zbylých pět byly modřín japonský (81 den, z 2,6 na 2,9), smrk sitka (115 dní, z 3,4 na 4,0), borovice kleč (112 dní, z 7,9 na 10,0), modřín sibiřský (82 dní, z 1,6 na 1,9), douglaska tisolistá (116 dní, z 4,6 na 5,2).

V jiné práci (Smeulders et al, 1995) se u dospělých jedinců douglasky tisolisté po devíti říjnových dnech s $400 \mu\text{g}/\text{m}^3 \text{O}_3$ v ovzduší sice v porovnání s kontrolami snížil celkový přísun značeného ^{14}C , a tedy jak konkrétně do jehlic, tak do větví, ale stalo se tak o nápadně rozličná procenta: do jehlic putovalo o 38% méně uhlíku (z $255,6 \text{ kBq}/\text{g}$ na $159,1 \text{ kBq}/\text{g}$), ale do zbytku rostliny až o 65% méně (z $16,5 \text{ kBq}/\text{g}$ na $5,7 \text{ kBq}/\text{g}$). V důsledku se změnil poměr alokace uhlíku J/S z 94,1% vůči 5,9% na 96,7% vůči 3,3%. Ještě výrazněji vypadaly výsledky téže práce u dospělých douglasek v $200 \mu\text{g}/\text{m}^3 \text{O}_3$ (také po devíti dnech a taktéž v říjnu), kde byl pozorován pokles ^{14}C dopravovaného do jehlic o 13% (z $255,6 \text{ kBq}/\text{g}$ na $222,3 \text{ kBq}/\text{g}$), ale do zbytku rostliny o 50% (z $16,5 \text{ kBq}/\text{g}$ na $8,3 \text{ kBq}/\text{g}$), měnil poměr alokace J/S z 94,1% vůči 5,9% na 96,6% vůči 3,4%. Nutno podotknout, že kromě říjnových reakcí práce sledovala i odpovědi během jara, a ke zvětšení poměru alokace uhlíku do J/S došlo i u douglasek v $200 \mu\text{g}/\text{m}^3 \text{O}_3$ před puknutím pupenů (duben) a v $400 \mu\text{g}/\text{m}^3 \text{O}_3$ jak před, tak i po puknutí pupenů (přelom duben/květen); ne vždy ale tyto změny byly statisticky významné. Zajímavý ve smyslu shody s dospělými jedinci výsledek v téže studii nastal také u sazenic douglasky (lze tedy předpokládat, že poznatky získané studiem sazenic bude možné do jisté míry aplikovat k dospělým jehličnanům): zvýšilo se u nich procento alokace ^{14}C do jehlic z 31,9% na 42,2%. Logicky toto navýšení muselo být na úkor stonku (což bylo pozorováno: z 27,4% na 21,9%) a kořenů (z 35,2% na 30,8%), tam ovšem změny nebyly samostatně statisticky významné.

Jinde (Kytöviita et al, 2001) zase bylo pozorováno, že po 79 dnech v ovzduší s $200 \text{ nmol}/\text{mol} \text{O}_3$ nenastalo u sazenic borovice halepské, v porovnání s kontrolami v ovzduší s běžnými ozonovými koncentracemi, žádné statisticky významné snížení celkové suché biomasy, ale suchá hmotnost jejich kořenů se výrazně snížila (z 238 mg suché váhy na 178 mg, změna o 25%), a tedy i jejich S/R poměr (z 0,950 na 0,699). Nebyly pozorovány statisticky významné změny ani v biomase jehlic, ani v J/S poměru.

Ze všeho výše uvedeného vyplývá, že nejčastější změnou v alokaci uhlíku do rostlinných tkání u jehličnanů je prioritizace jehlic nad zbytkem rostliny a nadzemní části rostlinného těla nad kořeny. Tento jev není příliš konzistentní a spíše slabý, ale v měřítku ekosystému se každé procento počítá. Zvýšené investice do jehlic mohou být způsobeny nutností kompenzovat vyšší energetické náklady při zvládnání vyšších hladin ROS a potřebou nahrazovat poškozené či předčasně senescentní fotosynteticky aktivní části rostliny (viz kapitola 2.2.). Poměrně očividným dopadem do budoucna slaběji rozvinutých kořenových systémů by mohly být problémy se získáváním vody v případě častějšího sucha či menší stability stromu při extrémních větrných událostech; očekává se, že k obojímu bude docházet častěji v souvislosti s klimatickou změnou (Gulev et al, 2021).

Vrátíme-li se zpět k CO_2 , uvidíme, že jeho dopady pokračují být vysoce druhově specifické. Z devíti druhů jehličnanů účastnivších se pokusu (Mortensen, 1994), a strávivších 81-116 dní v ovzduší o $730 \mu\text{mol}/\text{mol} \text{CO}_2$, se v porovnání s kontrolními sazenicemi ($355 \mu\text{mol}/\text{mol} \text{CO}_2$) poměry J/S a S/R nijak nezměnily u osmi z nich; pouze u modřínu japonského se velmi zlehka snížilo S/R (tedy biomasa se přeskupila ve prospěch kořenů, přímý opak účinků O_3). Dále o něco ztěžkly větve–jak v absolutních číslech, tak v poměru k délce–právě u modřínu japonského, modřínu sibiřského a smrku sivého. Nakonec, u smrku sivého a smrku sitka se více prodloužily nadzemní části. U zbylých pěti druhů–smrk ztepilý, borovice lesní, borovice pokroucená, borovice

kleč, douglaska tisolistá—nebyly pozorovány žádné statisticky významné odpovědi na zvýšený CO₂. Srovnáme-li souhrn těchto dat s tím, jak ty samé druhy reagovaly na ozon, opět se nám může zdát, že by zde mohlo dojít ke vzájemné neutralizaci opačně působících sil. Jak však bylo vidět, poměrné změny sinků nebyly vůbec konzistentní ani napříč druhy, ani napříč ošetřeními, a tedy místo vzájemné neutralizace by při současném zvýšení O₃ a CO₂ spíše došlo k většímu rozhození amplitud růstu v závislosti na konkrétním druhu v populaci.

2.3.3. Dopad na mykorhizu

V důsledku změn v prioritizaci alokace živin do různých částí rostliny by mohlo také dojít k oslabení mykorhizní symbiózy dotčených jehličnanů. Bylo pozorováno (Andersen & Rygielwicz, 1995), že u sazenic borovice těžké vystavených po 25 dnů zvýšeným koncentracím O₃ o denních maximech 126 ppb zadržel jejich symbiont slizivka oprahlá (*Hebeloma crustuliniforme*) na konci pokusu v porovnání s houbou u sazenic nevystavených O₃ menší množství (váženo s ohledem na celkovou suchou biomasu organismu) značeného ¹⁴C.

Tato práce nepatří mezi nejpřesvědčivější kvůli vysokému podílu statisticky nesignifikantních jevů mezi pozorovanými, tyto výsledky už ale byly potvrzeny u jehličnanů (a i u širokolistých rostlin) dodatečným výzkumem, například bylo pozorováno (Kytöviita et al, 2001), že symbiont borovice halepské čechrátka podvinutá (*Paxillus involutus*) po 79 dnech strávených v atmosféře s 200 nmol/mol O₃ byl, ve srovnání s mykorhizou borovice vystavené standardním troposférickým koncentracím ozonu, výrazně menší (z 22,8 mg suché váhy na 13,2 mg, rozdíl 42%) a zabral méně prostoru ve sledovací komoře. V dlouhodobém horizontu by ozonové poškození mykorhizy mohlo nést vážné důsledky pro zdraví celého ekosystému skrze zhoršení dostupnosti N. Navíc, jak bylo zmíněno v podkapitole 2.3.1., rostliny se spíše aklimatizují ke zvýšeným koncentracím CO₂ v případě limitace N. Budou-li mít z důvodu vyšších koncentrací O₃ slabší čerpání N z mykorhizy, spíše se tedy jejich síla uhlíkového sinku oslabí; tím hůře, že zvýšené troposférické koncentrace CO₂ dle všeho taktéž zhoršují schopnost mykorhizy asimilovat N, tak jak sazenice borovice halepské vystavené 700 μmol/mol CO₂ obsahovaly konzistentně nižší množství (a to nikoliv pouze s ohledem na procento celkové biomasy, což by se dalo očekávat, ale i na absolutní hmotnost) značeného ¹⁵N v porovnání s 500 μmol/mol kontrolami, přestože tyto hodnoty byly statisticky významné pouze u nadzemních částí sazenic (Kytöviita et al, 2001).

Této úvaze—tedy oslabení uhlíkového sinku jehličnanů v důsledku účinků O₃—by také odpovídal nižší pozorovaný přísun značeného ¹⁵N do sazenic borovice halepské a jejího symbionta čechrátky podvinuté ve výše zmíněné práci (Kytöviita et al, 2001), kdy jak množství v nadzemních částech rostliny (4,63 ng oproti 8,54 ng, změna 46%), tak v kořenech (4,83 ng oproti 9,21 ng, změna 48%), tak zejména v houbě (4,14 ng oproti 29,27 ng, změna 86%) bylo konzistentně nižší. Nutno dodat, že celkové množství neznačeného N v rostlině bylo u „ozonovaných“ sazenic srovnatelné s kontrolami, tedy účinek O₃ pravděpodobně nenastal okamžitě a postupně se akumuloval v průběhu experimentu.

Podobné výsledky, tedy zhoršení stavu mykorhizy v návaznosti na koncentrace ozonu, byly získány v několika dalších pracích (pro review, viz: Manning & von Tiedemann, 1995).

2.3.4. Poškození v důsledku zhoršení obrany vůči biotickým stresorům

Signalizace ROS a oxidativní stres je tedy jednou z prvotních reakcí rostliny na stresy jiné, a to včetně při napadení patogenem (Lopez-Huertas et al, 2000) nebo po jiném mechanickém stimulu (Yahraus et al, 1995). Zdálo by se tedy, že zvýšené ozonové koncentrace a následující „oxidativní výbuch“ bude rostlině v tomto spíše k užitku, preventivně ji připravující na nebezpečí. Tato úvaha však opomíjí vysoké energetické náklady související s vyrovnáním se s vyšší hladinou ozonu; je možné, že by došlo k pozitivní hormezi při nižších koncentracích, avšak momentálně průměrné hladiny troposférického O₃ v mnohých oblastech dosahují 50 ppbv (Staehelin et al, 2017), již nad hranicí 40 nmol/mol, při které bylo ještě patrné zlepšení fotosyntetického výkonu u japonských modřínů (Sugai et al, 2018).

Ano, zacílené práce našly u některých rostlin po vystavení velmi vysokým, avšak krátkodobým, koncentracím O₃ robustnější obranu vůči patogenům, a naopak menší poškození ozonem po útoku patogenu (pro review, viz: Manning & von Tiedemann, 1995). Z dokladů o snížené zranitelnosti nejehličnanů na biotické ohrožení díky ozonu lze uvést například jilm Davidův/japonský (*Ulmus davidiana* var. *Japonica*) vystavený jeden-a-půlkrát vyšším koncentracím O₃ (54,5 nmol/mol) než jsou běžné (40,2 nmol/mol), který byl navštěvován herbivorním hmyzem 3,3krát méně, než kontroly (Sugai et al, 2020). Citlivost rostliny vůči patogenu každopádně závisí na konkrétním druhu útoku. Vyšší výskyt nekrotů a zrychlená senescence jako důsledek působení O₃ například nahrávají nekrotrofům a naopak škodí obligátním biotrofům. Tato domněnka se zdá být částečně podpořena pár studiemi: některé nekrotrofní houby byly například schopny využít ozonové léze na bramborách jako vstupní bránu pro infekci (pro review, viz: Manning & von Tiedemann, 1995).

U jehličnanů to ale vypadá, že by obrázek byl o něco konzistentnější, a že je dnešní dlouhodobě navýšené koncentrace spíše vyčerpávají, nežli by je vybuzovaly k pohotovosti. Například sazenice smrku ztepilého po dvou letech vyrostly oproti kontrolám výrazně méně pod kombinovaným stresem, tedy dvakrát vyšších koncentrací O₃ (denní 37,7-76,0 nl/l, noční 21,2-45,7 nl/l) než je běžná (denní 21,3-43,4 nl/l, noční 12,1-24,1 nl/l) a infekcí plísní *Phytophthora citricola*, zatímco buk lesní v téže studii se nezdál být na tom hůř, než když stresům čelil zvlášť (Luedemann et al, 2005). Kůrovci přímo odpovídali za téměř všechny případy úmrtí ozonem oslabených borovic v Národním lese San Bernardino mezi lety 1968-1972, přestože hladiny ozonu zde byly velmi vysoké (průměrná denní maxima 180-220 ppb) a třeba borovice těžká, jak již bylo zmíněno, patří k na ozon velmi citlivým druhům jehličnanů (Miller, 1973).

Podobně dopadl výzkum borovice lesní v jiné práci (Bonello et al, 1993): zvýšené koncentrace ozonu způsobily dřívější zjevení se symptomů infekce kořenovníkem vrstevnatým (*Heterobasidion annosum* [Fr.] Bref.). Autoři této práce podezřívají jako hlavního pachatele masivního rozdílu v odpovědích dřívě zmíněné *memory effects*, zde konkrétně stresové metabolity stilbeny, které v těle jehličnanů zůstávají dlouho po skončení původního impulsu. Dle všeho tyto látky převádějí strom do vyčerpaného stavu náchylného k poškození buď samovolně, či právě při odolávání škůdcům (Langebartels et al, 1998); pokus s borovicemi však ukázal, že jejich negativní dopad na sebe za vhodných okolností nemusí nechat dlouho čekat. Zajímavé ovšem je, že byla-li borovice zároveň před infekcí patogenem již prorostlá mykorrhizním symbiontem slizivkou oprahlou (*Hebeloma*

crustuliniforme [Bull. ex St. Am.] Quél.), tak se žádné symptomy infekce nedostavily dříve, než 21. dne; tehdy se ale chlorózy objevily i v kontrolách, a byly tedy pravděpodobně způsobeny nedostatkem živin, nikoliv infekcí. Vzhledem ke krátkému trvání pokusu není jasné, jakou roli by hrály případné negativní dopady ozonu na slizivku (popsáno v podkapitole 2.3.3.) a zdali by mykorhiza dokázala tlumit kombinované dopady infekce a O₃ i nadále. Pro objasnění zde bude potřeba dalšího výzkumu.

2.4. Ozon a ekosystém

Z jevů popsaných v kapitole 2.3. vyplývá, že zvýšené hodnoty O₃ působí na primární produkci jehličnanů negativně (tj. ji snižují), a dalo by se očekávat, že to samé bude platit také na úrovni celého ekosystému. Zjednodušeně řečeno tomu tak opravdu je, ale dynamika vstupujících sil je o něco složitější.

Jak již bylo řečeno, O₃ zapřičiňuje v rostlinách největší změny zvnitřku, kam se nemůže dostat jinak nežli skrz průduchy, a tedy flux ozonu do buněk rostlin je pevně svázán s konduktancí průduchů (Laisk et al, 1989). Citlivost různých druhů vůči O₃ sice není lineárně vázána ani na jejich aktuální, ani maximální průduchovou konduktanci (Calatayud et al, 2010) a odvíjí se také od velmi variabilních antioxidačních obranných schopností rostliny, nicméně kombinace obojího představuje poměrně přesné měřítko jakožto takzvaný efektivní flux ozonu (*effective ozone flux*), navrženému v (Dizengremel et al, 2008); pro účely monitorování jednoho druhu ale bohatě stačí standardní měřený flux.

Na konduktanci průduchů, a tedy i flux O₃, má velký vliv mnoho rozličných faktorů. Jejich zavírání je například standardní odpovědí na–kromě samotného ozonu–nedostatek vody (Pei et al, 2000). Vzhledem k predikovaným změnám klimatu se dá v budoucnu očekávat obecně menší tendence rostlin si své průduchy ponechávat otevřené, což by je mohlo učinit více odolné vůči poškození ozonem. Zároveň stoupající koncentrace CO₂ by teoreticky mohly zaručit, že se rostlinný NEP nebude příliš lišit od současného i s přivřenými průduchy, v praxi tomu ale tak kvůli aklimaci k CO₂ není (Kytöviita et al, 2001; pro review, viz: Ainsworth & Long, 2005).

V jedné práci (Juráň et al, 2018) bylo například na základě pozorování lesa smrků zteplých v Beskydech vypočítáno, že se vztah koncentrací ozonu a stomatálního fluxu ozonu vůči NEP tohoto lesa silně mění v závislosti od aktuální teploty, globální radiace a relativní vlhkosti ovzduší (dostupnost vody v půdě, taktéž obvykle významný faktor, zde nebyla limitující). Například stomatální flux O₃ přivozoval větší snížení NEP (o 1,59 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) za většího svitu ($>500 \text{ W}/\text{m}^2$) nežli za slabšího (o 1,07 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ při $<300 \text{ W}/\text{m}^2$). Nicméně to, že ozon–a zejména jeho flux, neboť zde bylo znovu potvrzeno, že změny fluxu přesněji odpovídají pozorovaným dopadům na rostliny–NEP snižoval, bylo pravdivé za každého modelovaného počasí. Důležité je také to, že v situaci, kdy přítomnost ozonu nehrála tak velkou roli kvůli zavřeným průduchům, NEP již bylo nízké i tak, právě kvůli zavřeným průduchům.

Odlišnosti v citlivosti na O₃ dále na úrovni ekosystémů vedou ke změnám ve druhovém složení lesů. V Národním lese San Bernardino v jižní Kalifornii–smíšeném lese složeném na konci 60. let minulého století z borovicovitých jehličnanů borovice těžké, borovice Lambertovy (*Pinus*

lambertiana), jedle ojiněné (*Abies concolor*), a ve vyšších partech také borovice Jeffreyovy; dále z dubu černého kalifornského (*Quercus kelloggii*) a pazeravu sbíhavého (*Libocedrus/Calocedrus decurrens*)—ozon zprostředkoval zrychlené odumírání borovic těžkých. Mladé stromky tohoto druhu jsou obvykle zvýhodňovány odumíráním starších stromů, avšak zde nebyly schopny toho kvůli ozonu využít (jdnak kvůli účinkům na mladé stromky, jdnak kvůli snížené produkci semen u jedinců dospělých), a sukcese by tedy dle očekávání musela přepadnout k některému z jiných druhů, snižujíc procento borovic těžkých v lese. Kromě samotných borovic toto v důsledku ovlivnilo také druhy na ni vázané, a vzhledem k potížím jiných stromů s dostatečně rychlým zastoupením borovice těžké, také místy vedlo ke změně biomu z lesa do křovinného chaparralu (Miller, 1973).

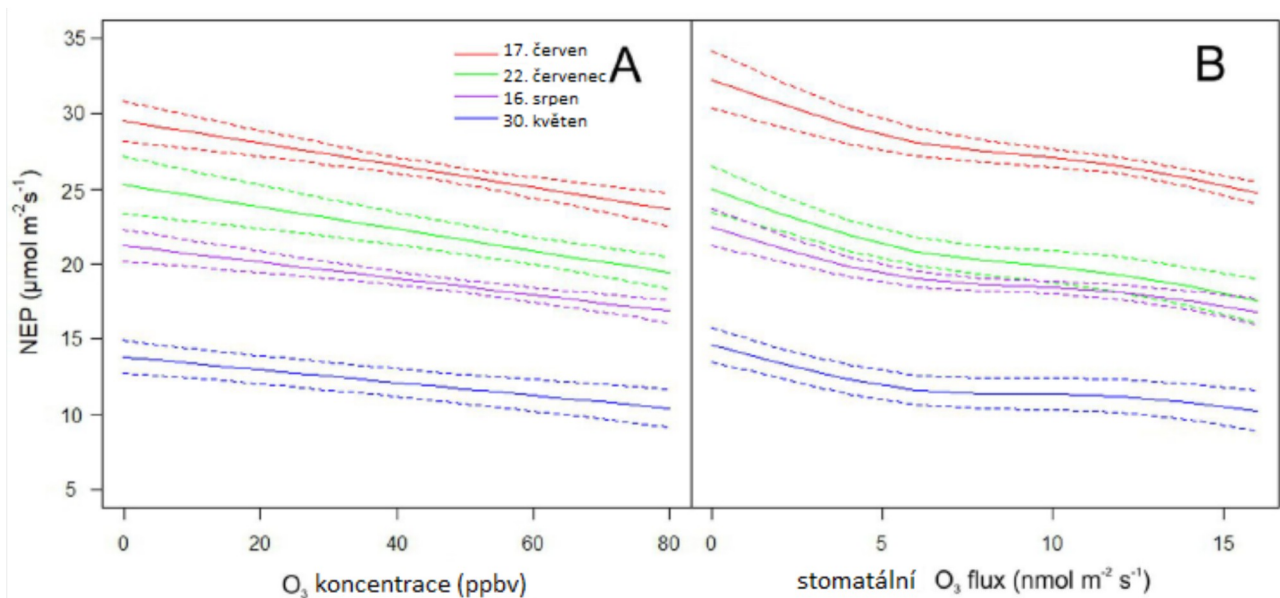


Schéma 13: Model závislosti NEP na koncentracích ozonu a stomatálním fluxu. Vymodelovány byly čtyři různé dny s odlišným počasím. Převzato z (Juráň et al, 2018), upraveno.

Ne vždy jsou rozdíly v reakci blízko příbuzných a blízko žijících druhů na ozon takto dramatické. V jedné práci (Sugai et al, 2019) srovnávající citlivost vůči O_3 u modřínu japonského a jedle sachalinské (*Abies sachalinensis*) nebyly mezi těmito dvěma pozorovány žádné rozdíly v růstu; fotosyntéza se zpomalila u obou druhů. Velký rozdíl však nastal v asimilaci N: u modřínu došlo k velkému snížení obsahu N v jehlicích, zatímco jedle nevykazovala žádné významné změny. V dlouhodobém horizontu by tato odlišnost mohla také vést ke změnám v dynamice společenství.

Rozdíly mezi borovicovitými jehličnany ve vyjadřování stresu ozonem nesou také rozličné důsledky pro proveditelnost dálkového průzkumu Země skrz spektrální monitoring. Některé druhy—jako borovice těžká—jsou pro tento typ výzkumu vhodné, neboť barvu mění v přítomnosti ozonu velmi ochotně (Ustin & Curtiss, 1990). U jiných druhů—jako třeba u douglasky tisolisté, u které se v odpovědi na ozon chlorózy neobjevují vůbec (Mortensen, 1994; Smeulders et al, 1995)—se však barevné spektrum odražené jehlicemi prostě ozonem příliš nezmění (Ustin & Curtiss, 1990); u dalších—jako je smrk ztepilý—zase třeba i ano, ale až s dlouhým odstupem (Wieser & Havranek, 1996; Siefertmann-Harms et al, 2005). Tato limitace je o to důležitější, že kromě chloróz jsou

variabilní také růstové odpovědi. V nich třeba právě douglaska naopak patří k těm citlivějším: neměnně jsou přírůstky její biomasy pod vlivem ozonu nižší, než u kontrol (Mortensen, 1994; Smeulders et al, 1995). Patří také k těm jehličnanům, které jsou nejméně ochotné zvyšovat svůj fotosyntetický výkon za vyšších koncentrací CO₂, a mohla by tedy v budoucnu být zvláště znevýhodněná v soutěži s ostatními druhy (Mortensen, 1994; Smeulders et al, 1995). Kvůli absenci viditelných symptomů však není zatím možné spolehlivě zjišťovat její zdravotní stav přímo a je třeba odvozovat její zranitelnost v dané oblasti skrze srovnání s bioindikátorem.

Jako bioindikátor je vhodné vybírat místně široce rozšířený druh se zvýšenou citlivostí a přitom snadno kvantifikovatelnými symptomy. V severní Americe jsou těmito druhy nepřekvapivě borovice těžká a borovice Jeffreyova, zatímco ve Středomoří například borovice zobanitá (*Pinus uncinata*) (Kefauver et al, 2014). Dále, jak již bylo zmíněno, důležitější než samotná koncentrace troposférického ozonu je jeho stomatální flux, který se odvíjí především od aktuální konduktance průduchů (Juráň et al, 2018). Ta zase závisí od mnoha dalších variabilních faktorů (teplota, vlhkost vzduchu...), které se mohou dramaticky měnit i na krátkých vzdálenostech, je-li topografie terénu výrazně výškově rozmanitá, proto je při analýze získaných dat třeba tyto okolnosti brát v potaz; zatím vykládaná úsilí v tomto směru vypadají slibně (Kefauver et al, 2014).

Nejvýznamnějším ohrožením ekosystémů ve střední Evropě, kterému musí místní jehličnaté lesy čelit, je odumírání monokultur smrků ztepilých kvůli útokům lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*), někdy jednoduše nyzývaného kůrovec podle čeledě, do které patří (Vacek et al, 2015; Bałazy et al, 2019). Pravděpodobně nejvýznamnějším faktory vedoucí k oslabení smrků natolik, že nedokáží lýkožroutovi efektivně čelit, jsou: historické znečištění SO₂ (Vacek et al, 2015), sucho a silný vítr. Není však vyloučeno, že jistou roli hraje i ozon (Bytnerowicz et al, 2004; Šrámek et al, 2012; Zapletal et al, 2018), tím spíše, že je ozon schopen dopady sucha na jehličnany zhoršovat (Barnes et al, 1990). Průměrné letní koncentrace O₃ se na většině horských území České republiky dlouhodobě pohybují kolem 30-50 ppb, denní maxima však mohou přesahovat 100 ppb (Bytnerowicz et al, 2004; Zapletal et al, 2018), což je dostatečně vysoká hladina pro to, aby se již efekt O₃ projevil. Analýza je o to těžší, že existují důvody předpokládat, že jsou tyto kalamity, tedy silné vichry následované rozmnožením se lýkožrouta, standardní součástí ekosystémového cyklu a že tyto disturbance se odehrávají pravidelně (Svoboda et al, 2012). Na druhou stranu je minimálně možné, že se extrémní projevy počasí–jako právě silné vichry–začnou v souvislosti se změnou klimatu vyskytovat častěji (Gulev et al, 2021). Tématu je po právu udílena velká pozornost.

Přejdeme-li zde od měřítka lokálního ke globálnímu, vrátíme se k tomu, co bylo zmíněno na samém začátku práce: O₃ je skleníkový plyn (Gulev et al, 2021). Spíše než skrze přímé radiační působení ale bude v budoucnu ovlivňovat globální klima skrze všechny výše popsané narušení pozemní rostlinné fixace uhlíku, ponechávajíc více skleníkového plynu CO₂ v atmosféře: sám antropogenní O₃ má dnes dodatečné radiační působení oproti roku 1900 o síle kolem +0,35 W/m² (+0,25 až +0,65 W/m²), přičemž k roku 2100 by se toto číslo mohlo zdvojnásobit; ale jeho nepřímé působení skrze CO₂ je k roku 2100 odhadováno na přibližně +0,62 až +1,09 W/m², s průměrnou hodnotou +0,89 W/m², tedy více než dvakrát více, nežli by bylo jeho působení přímé (Sitch et al, 2007).

3. Závěr

Cílem práce bylo představit současný stav znalostí o fyziologických a strukturálních přeměnách, ke kterým dochází v organismech jehličnanů čeledě borovicovitých v odpovědi na troposférický ozon.

Tento plynný polutant se tvoří především během horkého slunečního počasí a za dostatečného přísunu NO₂. Do rostlin se ozon dostává skrze průduchy, kde je následně lokalizována převážná část z jeho přítomnosti vyplývajících poškození.

Hlavní dopad troposférického ozonu na rostliny spočívá ve výrazném utlumení jejich schopnosti fixace uhlíku. Děje se tak jednak skrze přímou degradaci molekul chlorofylu a jednak skrze poruchy v regulaci výměny plynů cestou rozličných poškození průduchů: od jejich ucpání voskem, přes vytvoření oxidativního stresu vedoucího k uzavření průduchu, až po aklimaci k ROS natolik, že nedokáží adekvátně reagovat na sucho. V závislosti na citlivosti konkrétního druhu mohou ozonem přivozené dysfunkce mít akutní nebo chronický charakter a projevovat se širokou škálou symptomů, od chloróz přes zrychlenou senescenci až po zpomalení růstu celé rostliny. U jehličnanů, většina zástupců kterých je stálezelená, se v přítomnosti ozonu v jehlicích hromadí stresové metabolity, které v nich zůstávají dlouhé měsíce a jakožto takzvané *memory effects* ovlivňují chování stromu i dlouho po ukončení bezprostředního stresu. Konkrétně mohou vést například ke chloróze nebo předčasné senescenci jehlic, odložené na období rašení jehlic nových.

Dále ozon může zesilovat účinky jiných stresových faktorů. Při limitaci Mg, kdy má rostlina problém s obstaráváním nových molekul chlorofylu, ozon zrychluje degradaci molekul starých. Za sucha, kdy je potřeba pečlivě regulovat výměnu plynů tak, aby nedocházelo k plýtvání vodou, ozon snižuje citlivost rostliny vůči vysychání. Při napadení patogenem či parazitem je již rostlina ozonem oslabena a nedokáže útočnickovi efektivně čelit. Zároveň ozon brání rostlině ve využití dostupných zdrojů, jako zvýšených koncentrací CO₂ v ovzduší nebo získávání živin z půdy.

V konečném důsledku má proto ozon výrazný negativní vliv na životaschopnost a konkurenceschopnost rostliny. Odlišnosti v citlivosti na ozon mezi organismy ve společenství následně mohou vést k nahrazení druhů vůči ozonu citlivějších druhu odolnějšími, případně může být změněn sám typ ekosystému.

Pro člověka nejvýznamnějším důsledkem přítomnosti troposférického ozonu jsou jím způsobované škody na úrodě a na hospodářských lesích. V České republice jsou místní smrkové lesy sužovány suchem a přemnoženým lýkožroutem smrkovým. Jak bylo zmíněno, ozon zhoršuje schopnost rostlin adekvátně na sucho a parazity reagovat, a proto se dá ozon považovat za jeden z podněcujících faktorů kalamit.

Nadále však zůstává mnoho nezodpovězených otázek. Jak se v jednotlivých konkrétních hospodářsky důležitých plodinách vyváží působení O₃ a CO₂? Jaký vliv na tuto dynamiku bude mít zvýšená eutrofizace půd? Jak důležitým se ukáže být snížení rychlosti vzniku ozonu při teplotách nad 39°C? Jakou roli hraje SA v inhibici ROS vlny? Jaké procesy jsou zapojeny do změn v prioritizaci sinků v odpovědi na ozon? Nakolik budou v budoucnu mykorrhiza schopny ochránit

své partnery před vlivy změn klimatu, a nakolik budou naopak kvůli ozonu postiženy samy? Jsou-li smrkové kalamity vůbec podporovány ozonem, do jaké je to míry? Jak vstupuje opadavost modřínů do jejich reakcí na ozon? Jak lze nejlépe monitorovat stav douglasek tisolistých v přírodě, vzhledem k absenci barevných změn v jejich jehlicích? Jaké kroky by se daly podniknout pro co nejefektivnější mitigaci dopadů troposférického ozonu na globální flóru? Které druhy potřebují ochranu nejvíce?

Bez dalšího specializovaného výzkumu odpovědi na tyto otázky nezjistíme, a i proto je třeba v budoucnu vyvíjet zvláštní vědecké úsilí v tomto směru.

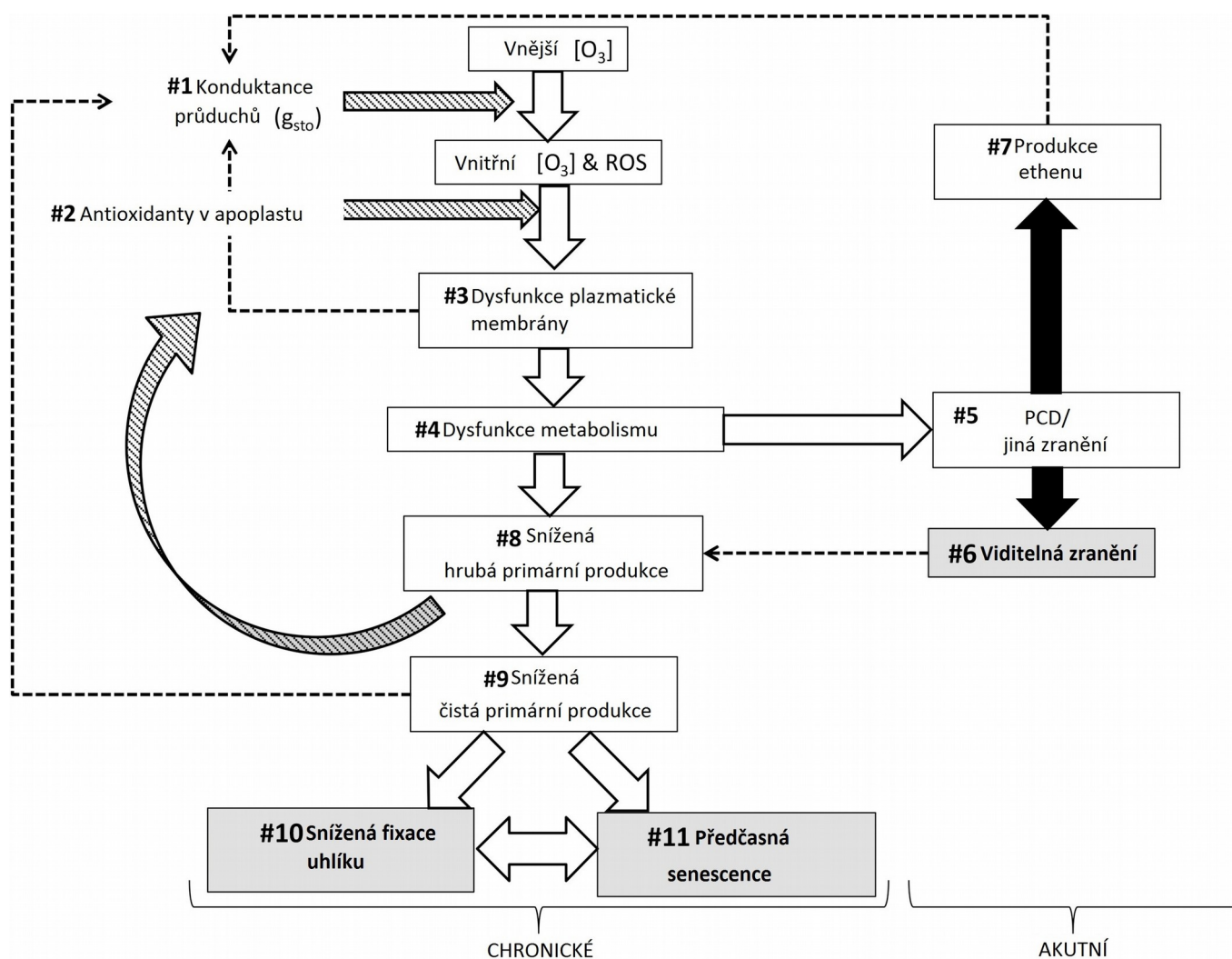


Schéma 14: Zjednodušený model působení troposférického ozonu na rostliny. Převzato z (Emberson et al, 2018), upraveno.

4. Seznam použité literatury

Ahmad, H.M.; Rahman, M.U.; Ali, Q.; Awan, S.I. (2015). „*Plant cuticular waxes: a review on functions, compositions, biosyntheses mechanism and transportation*“. *Life Science Journal* **2015** 12(4), 60-67. DOI: 10.7537/marslsj1204s15.08

Ainsworth, E.A.; Long, S.P. (2005). „*What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy*“. *New Phytologist* **2005** 165 (2), 351-371. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2004.01224.x

Andersen, C.P.; Rygiewicz, P.T. (1995). „*Allocation of carbon in mycorrhizal Pinus ponderosa seedlings exposed to ozone*“. *New Phytologist* **1995** 131 (4), 471-480. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1995.tb03084.x

Antunes, F.; Cadenas, E. (2000). „*Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes*“. *FEBS Letters* **2000** 475 (2), 121-126. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01638-0

Asada, K.; Kiso, K.; Yoshikawa, K. (1974). „*Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination*“. *The Journal of Biological Chemistry* **1974** 249 (7), 2175-2181.

Asada, K. (1994). „*Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues*“. *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants (Foyer, C.H. & Mullineaux, P.M., eds) Boca Raton, CRC Press* **1996** 1 (1) 77-104

Azarpazhooh, A.; Limeback, H. (2008). „*The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature*“. *Journal of Dentistry* **2008** 36 (2) 104-116. DOI: 10.1016/j.jdent.2007.11.008

Bałazy, R.; Zasada, M.; Ciesielski, M.; Waraksa, P.; Zawila-Niedźwiecki, T. (2019). „*Forest dieback processes in the Central European Mountains in the context of terrain topography and selected stand attributes*“. *Forest Ecology and Management* **2019** 435 (1), 106-119. DOI: 10.1016/j.foreco.2018.12.052

Barnes, J.D.; Davison, A.W.; Booth, T.A. (1988). „*Ozone accelerates structural degradation of epicuticular wax on Norway spruce needles*“. *New Phytologist* **1988** 110 (3), 309-318. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1988.tb00267.x

Barnes, J.D.; Eamus, D.; Davison, A.W.; Ro-Poulsen, H.; Mortensen, L. (1990). „*Persistent effects of ozone on needle water loss and wettability in Norway spruce*“. *Environmental Pollution* **1990** 63 (4), 345-363. DOI: 10.1016/0269-7491(90)90140-8

Bell, M.L.; McDermott, A.; Zeger, S.L.; Samet, J.M.; Dominici, F. (2004). „*Ozone and short-term mortality in 95 US urban communities, 1987-2000*“. *JAMA* **2004** 292 (19), 2372-2378. DOI: 10.1001/jama.292.19.2372

Bendall, D.S.; Bonner, W.D. Jr. (1971). „*Cyanide-insensitive respiration in plant mitochondria*“. *Plant Physiology* **1971** 47 (2), 236-245. DOI: 10.1104/pp.47.2.236

Bloomer, B.J.; Stehr, J.W.; Piety, C.A.; Salawitch, R.J.; Dickerson, R.R. (2009). „*Observed relationships of ozone pollution with temperature and emissions*“. *Atmospheric Science* **2009** 36

(9), číslo článku: L09803. DOI: 10.1029/2009GL037308

Bonello, P.; Heller, W.; Sandermann, H. (1993). „Ozone effects on root-disease susceptibility and defence responses in mycorrhizal and non-mycorrhizal seedlings of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.)“. *New Phytologist* **1993** 124 (4), 653-663. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1993.tb03855.x

Bradley, D.J.; Kjellbom, P.; Lamb, C.J. (1992). „Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid response“. *Cell* **1992** 70 (1), 21-30. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90530-P

Bytnerowicz, A.; Godzik, B.; Grodzińska, K.; Frańczek, W.; Musselman, R.; Manning, W.; Badea, O.; Popescu, F.; Fleischer, P. (2004). „Ambient ozone in forests of the Central and Eastern European mountains“. *Environmental Pollution* **2004** 130 (1), 5-16. DOI: 10.1016/j.envpol.2003.10.032

Calatayud, V.; Marco, F.; Cerveró, J.; Sánchez-Peña, G.; Sanz, M.J. (2010). „Contrasting ozone sensitivity in related evergreen and deciduous shrubs“. *Environmental Pollution* **2010** 158 (12), 3580-3587. DOI: 10.1016/j.envpol.2010.08.013

Choi, W.-G.; Miller, G.; Wallace, I.; Harper, J.; Mittler, R.; Gilroy, S. (2017). „Orchestrating rapid long-distance signaling in plants with Ca^{2+} , ROS and electrical signals“. *Plant Journal* **2017** 90 (4), 698-707. DOI: 10.1111/tpj.13492

Crabtree, J.; Kemp, A.R. (1946). „Weathering of soft vulcanised rubber“. *Industrial & Engineering Chemistry* **1946** 38 (3), 278-296. DOI: 10.1021/ie50435a016

Crutzen, P.J. (1974). „Photochemical reactions initiated by and influencing ozone in unpolluted tropospheric air“. *Tellus* **1974** 26 (1-2), 47-57. DOI: 10.3402/tellusa.v26i1-2.9736

Davies, K.J. (1987). „Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects“. *The Journal of Biological Chemistry* **1987** 262, 9895-9901.

Dizengremel, P.; Le Thiec, D.; Bagard, M.; Jolivet, Y. (2008). „Ozone risk assessment for plants: central role of metabolism-dependent changes in reducing power“. *Environmental Pollution* **2008** 156 (1), 11-15.

Dodge, M.C. (1984). „Combined effects of organic reactivity and NMHC/ NO_x ratio on photochemical oxidant formation—a modeling study“. *Atmospheric Environment* **1984** 18 (8), 1657-1665. DOI: 10.1016/0004-6981(84)90388-3

Emberson, L.D.; Pleijel, H.; Ainsworth, E.A.; van den Berg, M.; Ren, W.; Osborne, S.; Mills, G.; Pandey, D.; Dentener, F.; Büker, P.; Ewert, F.; Koeble, R.; Van Dingenen, R. (2018). „Ozone effects on crops and consideration in crop models“. *European Journal of Agronomy* **2018** 100, 19-34. DOI: 10.1016/j.eja.2018.06.002

Evans, L.S.; Miller, P.R. (1972). „Ozone damage to ponderosa pine: a histological and histochemical appraisal“. *American Journal of Botany* **1972** 59 (3), 297-304. DOI: 10.1002/j.1537-2197.1972.tb10096.x

- Ghimire, R.P.; Kivimäenpää, M.; Kasurinen, A.; Häikiö, E.; Holopainen, T.; Holopainen, J.K. (2017). „*Herbivore-induced BVOC emissions of Scots pine under warming, elevated ozone and increased nitrogen availability in an open-field exposure*“. *Agricultural and Forest Meteorology* **2017** 242, 21-32. DOI: 10.1016/j.agrformet.2017.04.008
- Groden, D.; Beck, E. (1979). „*H₂O₂ destruction by ascorbate-dependent systems from chloroplasts*“. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1979** 546 (3), 426-435. DOI: 10.1016/0005-2728(79)90078-1
- Guan, L.M.; Zhao, J.; Scandalios, J.G. (2000). „*Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize CAT1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response*“. *The Plant Journal* **2000** 22 (2), 87-95. DOI: 10.1046/j.1365-3113x.2000.00723.x
- Gulev, S.K.; Thorne, P.W.; Ahn, J.; Dentener, F.J.; Domingues, C.M.; Gerland, S.; Gong, D.; Kaufman, D.S.; Nnamchi, H.C.; Quaas, J.; Rivera, J.A.; Sathyendranath, S.; Smith, S.L.; Trewin, B.; von Schuckmann, K.; Vose, R.S. (2021). „*Changing state of the climate system. Climate change 2021: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Masson-Delmotte, V.; Zhai, P.; Pirani, A.; Connors, S.L.; Péan, C.; Berger, S.; Caud, N.; Chen, Y.; Goldfarb, L.; Gomis, M.I.; Huang, M.; Leitzell, K.; Lonnoy, E.; Matthews, J.B.R.; Maycock, T.K.; Waterfield, T.; Yelekçi, O.; Yu, R.; Zhou, B. (eds.)]*“. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA **2021** 287–422. DOI: 10.1017/9781009157896.004 [pozor: toto oficiálně uvedené DOI je neplatné, lépe vyhledávat dle názvu práce]
- Haagen-Smit, A.J. (1952). „*Chemistry and physiology of Los Angeles smog*“. *Industrial & Engineering Chemistry* **1952** 44 (6), 1342-1346. DOI: 10.1021/ie50510a045
- Hagar, H.; Ueda, N.; Shah, S.V. (1996). „*Role of reactive oxygen metabolites in DNA damage and cell death in chemical hypoxic injury to LLC-PK1 cells*“. *The American Journal of Physiology* **1996** 271 (1), F209-F215. DOI: 10.1152/ajprenal.1996.271.1.F209
- Harrison, R.B.; Henry, C.L.; Xue, D. (1994). „*Magnesium deficiency in Douglas-fir and Grand fir growing on a sandy outwash soil amended with sewage sludge*“. *Water, Air, and Soil Pollution* **1994** 75 (1-2), 37–50. DOI: 10.1007/bf01100397
- Heath, R.L. (1987). „*The biochemistry of ozone attack on the plasma membrane of plant cells*“. *Phytochemical Effects of Environmental Compounds (Saunders, J.A. & Kosak-Channing, L. & Conn, E.E., eds). Recent Advances in Phytochemistry, vol 21. Springer, Boston, MA* **1987** DOI: 10.1007/978-1-4613-1931-3_2
- Heck, W.W.; Taylor, O.C.; Adams, R.; Bingham, G.; Miller, J.; Prestom, E.; Weinstein, L. (1982). „*Assessment of crop loss from ozone*“. *Journal of the Air Pollution Control Association* **1982** 32 (4) 353-361. DOI: 10.1080/00022470.1982.10465408
- Ingestad, T. (1959). „*Studies on the nutrition of forest tree seedlings. II Mineral nutrition of spruce*“. *Physiologia Plantarum* **1959** 12 (3) 568-593. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1959.tb07979.x
- Juráň, S.; Edwards-Jonášová, M.; Cudlín, P.; Zapletal, M.; Šigut, L.; Grace, J.; Urban, O. (2018). „*Prediction of ozone effects on net ecosystem production of Norway spruce forest*“. *iForest* –

Karpinski, S.; Reynolds, H.; Karpinska, B.; Wingsle, G.; Creissen, G.; Mullineaux, P. (1999). „Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*“. *Science* **1999** 284 (5414), 654-657. DOI: 10.1126/science.284.5414.654

Kefauver, S.C.; Peñuelas, J.; Ustin, S. (2014). „Using topographic and remotely sensed variables to assess ozone injury to conifers in the Sierra Nevada (USA) and Catalonia (Spain)“. *Remote Sensing of Environment* **2014** 139, 138-148. DOI: 10.1016/j.rse.2013.07.037

King, T.; Cole, M.; Farber, J.M.; Eisenbrand, G.; Zabar, D.; Fox, E.M.; Hill, J.P. (2017). „Food safety for food security: Relationship between global megatrends and developments in food safety“. *Trends in Food Science & Technology* **2017** 68, 160-175. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.08.014

Kivimäenpää, M.; Sutinen, S.; Calatayud, V.; Sanz, M.J. (2010). „Visible and microscopic needle alterations of mature Aleppo pine (*Pinus halepensis*) trees growing on an ozone gradient in eastern Spain“. *Tree Physiology* **2010** 30 (4) 541-554. DOI: 10.1093/treephys/tpq012

Künstler, A.; Bacsó, R.; Gullner, G.; Hafez, Y.M.; Király, L. (2016). „Staying alive – is cell death dispensable for plant disease resistance during the hypersensitive response?“. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **2016** 93, 75-84. DOI: 10.1016/j.pmp.2016.01.003

Kytöviita, M.-M.; Le Thiec, D.; Dizengremel, P. (2001). „Elevated CO₂ and ozone reduce nitrogen acquisition by *Pinus halepensis* from its mycorrhizal symbiont“. *Physiologia Plantarum* **2001** 111 (3), 305-312. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110307.x

Laisk, A.; Kull, O.; Moldau, H. (1989). „Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close to zero“. *Plant Physiology* **1989** 90 (3), 1163-1167. DOI: 10.1104/pp.90.3.1163

Langebartels, C.; Heller, W.; Führer, G.; Lippert, M.; Simons, S.; Sandermann, H., Jr. (1998). „Memory effects in the action of ozone on conifers“. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **1998** 41 (1), 62-72. DOI: 10.1006/eesa.1998.1668

Lezcano, I.; Pérez Rey, R.; Baluja, Ch.; Sánchez, E. (1999). „Ozone inactivation of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* and *Salmonella typhimurium* in water“. *Ozone: Science & Engineering* **1999** 21 (3), 293-300. DOI: 10.1080/01919519908547242

Linzon, S.N. (1966). „Damage to eastern white pine by sulfur dioxide, semimature-needle blight, and ozone“. *Journal of the Air Pollution Control Association* **1966** 16 (3), 140-144. DOI: 10.1080/00022470.1966.10468455

Loew, O. (1900). „A new enzyme of general occurrence in organisms“. *Science* **1900** 11 (279), 701-702. DOI: 10.1126/science.11.279.701

Lopez-Huertas, E.; Charlton, W.L.; Johnson, B.; Graham, I.A.; Baker, A. (2000). „Stress induces peroxisome biogenesis genes“. *EMBO Journal* **2000** 19 (24), 6770-6777. DOI: 10.1093/emboj/19.24.6770

Loya, W.M.; Pregitzer, K.S.; Karberg, N.J.; King, J.S.; Giardina, C.P. (2003). „Reduction of soil carbon formation by tropospheric ozone under increased carbon dioxide levels“. *Nature* **2003** 425

(6959), 705-707. DOI: 10.1038/nature02047

Lucas, P.W.; Rantanen, L.; Mehlhorn, H. (1993). „*Needle chlorosis in Sitka spruce following a three-year exposure to low concentrations of ozone: changes in mineral content, pigmentation and ascorbic acid*“. *New Phytologist* **1993** 124 (2), 265-275. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1993.tb03816.x

Luedemann, G.G.; Matyssek, R.; Fleischmann, F.; Grams, T.E.E. (2005). „*Acclimation to ozone affects host/pathogen interaction and competitiveness for nitrogen on juvenile Fagus sylvatica and Picea abies trees infected with Phytophthora citricola*“. *Plant Biology* **2005** 7 (6), 640-649. DOI: 10.1055/s-2005-872902

Manning, W.J.; von Tiedemann, A. (1995). „*Climate change: Potential effects of increased Carbon dioxide (CO₂), ozone (O₃), and ultraviolet-B (UV-B) radiation on plant diseases*“. *Environmental Pollution* **1995** 88 (2), 219-245. DOI: 10.1016/0269-7491(95)91446-R

Marenco, A.; Gouget, H.; Nédélec, P.; Pagés, J-P. (1994). „*Evidence of a long-term increase in tropospheric ozone from Pic du Midi series: consequences: positive radiative forcing*“. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* **1994** 99 (D8), 16,617–16,632. DOI: 10.1029/94JD00021

Matsumi, Y.; Kawasaki, M. (2003). „*Photolysis of atmospheric ozone in the ultraviolet region*“. *Chemical Reviews* 2003 103 (12), 4767-4782. DOI: 10.1021/cr0205255

McAdam, E.L.; Brodribb, T.J.; McAdam, S.A.M. (2017). „*Does ozone increase ABA levels by non-enzymatic synthesis causing stomata to close?*“. *Plant, Cell and Environment* **2017** 40, 741-747. DOI: 10.1111/pce.12893

McCord, J.M.; Fridovich, I. (1969). „*Superoxid dismutase, an enzymatic function for erythrocyte*“. *The Journal of Biological Chemistry* **1969** 244 (22), 6049-6055.

Mehler, A.H. (1951). „*Studies on reactions of illuminated chloroplasts: I. Mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents*“. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1951** 33 (1), 65-77. DOI: 10.1016/0003-9861(51)90082-3

Miller, P.R.; Taylor, O.C.; Parmeter, J.R., Jr.; Cardiff, E.A. (1963). „*Ozone injury to foliage of pinus ponderosa*“. *Phytopatology* **1963** 53 (9), 1072+.

Miller, P.L. (1973). „*Oxidant-induced community change in a mixed conifer forest*“. *Advances in Chemistry* **1973** (122), 101-117. DOI: 10.1021/ba-1973-0122.ch009

Morris, K.; Mackerness, S.A.-H.; Page, T.; John, C.F.; Murphy, A.M.; Carr, J.P.; Buchanan-Wollaston, V. (2000). „*Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence*“. *Plant Journal* **2000** 23 (5), 677-685. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2000.00836.x

Mortensen, L.M. (1994). „*The influence of carbon-dioxide or ozone concentration on growth and assimilate partitioning in seedlings of nine conifers*“. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil and Plant Science* **1994** 44 (3) 157-163. DOI: 10.1080/09064719409410239

Nishizawa-Yokoi, A.; Yabuta, Y.; Shigeoka, S. (2008). „*The contribution of carbohydrates including raffinose family oligosaccharides and sugar alcohols to protection of plant cells from oxidative damage*“. *Plant Signaling & Behavior* **2008** 3 (11), 1016-1018. DOI: 10.4161/psb.6738

- Overmyer, K.; Brosché, M.; Kangasjärvi, J. (2003). „*Reactive oxygen species and hormonal control of cell death*“. *Trends in Plant Science* **2003** 8 (7), 335-342. DOI: 10.1016/S1360-1385(03)00135-3
- Overmyer, K.; Tuominen, H.; Kettunen, R.; Betz, C.; Langebartels, C.; Sandermann, H., Jr.; Kangasjärvi, J. (2000). „*Ozone-sensitive Arabidopsis rcd1 mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death*“. *Plant Cell* **2000** 12 (10), 1849-1862. DOI: 10.1105/tpc.12.10.1849
- Parrish, D.D.; Law, K.S.; Staehelin, J.; Derwent, R.; Cooper, O. R.; Tanimoto, H.; Volz-Thomas, A.; Gilge, S.; Scheel, H.-E.; Steinbacher, M.; Chan, E. (2012). „*Long-term changes in lower tropospheric baseline ozone concentrations at northern mid-latitudes*“. *Atmospheric Chemistry and Physics* **2012** 12 (23), 11485-11504. DOI: 10.5194/acp-12-11485-2012
- Pei, Z.-M.; Murata, Y.; Benning, G.; Thomine, S.; Klüsener, B.; Allen, G.J.; Grill, E.; Schroeder, J.I. (2000). „*Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells*“. *Nature* **2000** 406, 731-734. DOI: 10.1038/35021067
- Peterson, D.L.; Arbaugh, M.J.; Wakefield, V.A.; Miller, P.R. (1987). „*Evidence of growth reduction ozone-injured Jeffrey pine (Pinus jeffreyi Grev. and Balf.) in Sequoia and Kings Canyon National Parks*“. *JAPCA – The International Journal of Air Pollution Control and Hazardous Waste Management* **1987** 37 (8), 906-912. DOI: 10.1080/08940630.1987.10466283
- Polle, A.; Otter, T.; MehneJakobs, B. (1994). „*Effect of magnesium-deficiency on antioxidative systems in needles of Norway spruce [Picea abies (L) Karst.] grown with different ratios of nitrate and ammonium as nitrogen-sources*“. *New Phytologist* **1994** 128 (4) 621-628. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1994.tb04026.x
- Prasad, T.K.; Anderson, M.D.; Stewart, C.R. (1994). „*Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings*“. *Plant Physiology* **1994** 105 (2), 619-627. DOI: 10.1104/pp.105.2.619
- Rao, M.V.; Koch, J.R.; Davis, K.R. (2000). „*Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants*“. *Plant Molecular Biology* **2000** 44 (3), 345-358. DOI: 10.1023/A:1026548726807
- Richards, B.L., Sr.; Taylor, O.C.; Edmunds, G.F., Jr. (1968). „*Ozone needle mottle of pine in southern California*“. *Journal of the Air Pollution Control Association* **1968** 18 (2), 73-77. DOI: 10.1080/00022470.1968.10469097
- Schreuder, M.D.J.; Brewer, C.A. (2001). „*Effects of short-term, high exposure to chlorine gas on morphology and physiology of Pinus ponderosa and Pseudotsuga menziesii*“. *Annals of Botany* **2001** 88 (2), 187-195. DOI: 10.1006/anbo.2001.1442
- Schreuder, M.D.J.; van Hove, L.W.A.; Brewer, C.A. (2001). „*Ozone exposure affects leaf wettability and tree water balance*“. *New Phytologist* **2001** 152 (3), 443-454. DOI: 10.1046/j.0028-646X.2001.00272.x
- Sedjo, R. (1993). „*The carbon-cycle and global forest ecosystem*“. *Water Air and Soil Pollution* **1993** 70 (1-4), 295-307. DOI: 10.1007/BF01105003

- Siefermann-Harms, D.; Payer, H.D.; Schramel, P.; 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* **2005** 162 (2) 195-206. DOI: 10.1016/j.jplph.2004.06.009
- Sitch, S.; Cox, P.M.; Collins, W.J.; Huntingford, C. (2007). „*Indirect radiative forcing of climate change through ozone effects on the land-carbon sink*“. *Nature* **2007** 448 (7155), 791-794. DOI: 10.1038/nature06059
- Smeulders, S.M.; Gorissen, A.; Joosten, N.N.; Vanveen, J.A. (1995). „*Effects of short-term ozone exposure on the carbon economy of mature and juvenile Douglas firs [Pseudotsuga menziesii (Mirb.) Franco]*“. *New Phytologist* **1995** 129 (1), 45-53. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1995.tb03008.x
- Sprugel, D.G.; Hinckley, T.M.; Schaap, W. (1991). „*The theory and practice of branch autonomy*“. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1991** 22 (1), 309–334. DOI: 10.1146/annurev.es.22.110191.001521
- Staehelin, J.; Tummon, F.; Revell, L.; Stenke, A.; Peter, T. (2017). „*Tropospheric ozone at northern mid-latitudes: modeled and measured long-term changes*“. *Atmosphere* **2017** 8 (9), 163. DOI: 10.3390/atmos8090163
- Steiner, A.L.; Davis, A.J.; Sillman, S.; Owen, R.C.; Michalak, A.M.; Fiore, A.M. (2010). „*Observed suppression of ozone formation at extremely high temperatures due to chemical and biophysical feedbacks*“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010** 107 (46), 19685-19690. DOI: 10.1073/pnas.1008336107
- Sugai, T.; Kam, D.G.; Agathokleous, E.; Watanabe, M.; Kita, K.; Koike, T. (2018). „*Growth and photosynthetic response of two larches exposed to O₃ mixing ratios ranging from preindustrial to near future*“. *Photosynthetica* **2018** 56 (3), 901-910. DOI: 10.1007/s11099-017-0747-7
- Sugai, T.; Kitao, M.; Watanabe, T.; Koike, T. (2019). „*Can needle nitrogen content explain the interspecific difference in ozone sensitivities of photosynthesis between Japanese larch (Larix kaempferi) and Sakhalin fir (Abies sachalinensis)?*“. *Photosynthetica* **2019** 57 (2), 540-547. DOI: 10.32615/ps.2019.042
- Sugai, T.; Okamoto, S.; Agathokleous, E.; Masui, N.; Satoh, F.; Koike, T. (2020). „*Leaf defense capacity of Japanese elm (Ulmus davidiana var. japonica) seedlings subjected to a nitrogen loading and insect herbivore dynamics in a free air ozone-enriched environment*“. *Environmental Science and Pollution Research* **2020** 27 (3), 3350-3360. DOI: 10.1007/s11356-019-06918-w
- Svoboda, M.; Janda, P.; Nagel, T.A.; Fraver, S.; Rejzek, J.; Bače, R. (2012). „*Disturbance history of an old-growth sub-alpine Picea abies stand in the Bohemian Forest, Czech Republic*“. *Journal of Vegetation Science* **2012** 23 (1), 86-97. DOI: 10.1111/j.1654-1103.2011.01329.x
- Šrámek, V.; Novotný, R.; Vejpustková, M.; Hůnová, I.; Uhlířová, H. (2012). „*Monitoring of ozone effects on the vitality and increment of Norway spruce and European beech in the Central European forests*“. *Journal of Environmental Monitoring* **2012** 14, 1696-1702. DOI: 10.1039/c2em10964f
- Telewski, F.W. (1992). „*Ethylene production by different age class ponderosa and Jeffery pine needles as related to ozone exposure and visible injury*“ [překlep v původním názvu]. *Trees–*

Structure and Function **1992** 6 (4), 195-198. DOI: 10.1007/BF00224335

Ustin, S.L.; Curtiss, B. (1990). „Spectral characteristics of ozone-treated conifers“. *Environmental and Experimental Botany* **1990** 30 (3), 293-308. DOI: 10.1016/0098-8472(90)90041-2

Vacek, S.; Hůnová, I.; Vacek, Z.; Hejcmanová, P.; Podrázský, V.; Král, J.; Putalová, T.; Moser, W.K. (2015). „Effects of air pollution and climatic factors on Norway spruce forests in the Orlické hory Mts. (Czech Republic), 1979-2014“. *European Journal of Forest Research* **2015** 134 (6), 1127-1142. DOI: 10.1007/s10342-015-0915-x

Wieser, G.; Havranek, W.M. (1996). „Evaluation of ozone impact on mature spruce and larch in the field“. *Journal of Plant Physiology* **1996** 148 (1-2), 189-194. DOI: 10.1016/S0176-1617(96)80313-0

Wieser, G. (1997). „Ozone impact on photosynthetic capacity of mature and young Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.): external versus internal exposure“. *Phyton: Annales Rei Botanicae* **1997** 37 (3), 297-302.

Weiss, J. (1935). „Investigations on the radical HO₂ in solution“. *Transactions of the Faraday Society* **1935** 31, 668-681. DOI: 10.1039/TF9353100668

Wohlgemuth, H.; Mittelstrass K.; Kschieschan S.; Bender J.; Weigel H.-J.; Overmyer K.; Kangasjärvi J.; Sandermann H.; Langebartels C. (2002). „Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone“. *Plant, Cell & Environment* **2002** 25 (6), 717-726. DOI: 10.1046/j.1365-3040.2002.00859.x

Wulff, A.; Anttonen, S.; Heller, W.; Sandermann, H., Jr.; Kärenlampi, L. (1996). „Ozone-sensitivity of Scots pine and Norway spruce from northern and local origin to long-term open-field fumigation in central Finland“. *Environmental and Experimental Botany* **1996** 36 (2), 209-221, 223-227. DOI: 10.1016/0098-8472(96)01001-5

Xu, E.; Brosché, M. (2014). „Salicylic acid signaling inhibits apoplastic reactive oxygen species signaling“. *BMC Plant Biology* **2014** 14, číslo článku: 155. DOI: 10.1186/1471-2229-14-155

Yahraus, T.; Chandra, S.; Legendre, L.; Low, P.S. (1995). „Evidence for a mechanically induced oxidative burst“. *Plant Physiology* **1995** 109 (4), 1259-1266. DOI: 10.1104/pp.109.4.1259

Zapletal, M.; Juráň, S.; Krpeš, V.; Michna, K.; Edwards-Jonášová, M.; Cudlín, P. (2018). „Effect of ozone flux on selected structural and antioxidant characteristics of a mountain Norway spruce forest“. *Baltic Forestry* **2018** 24 (2), 261-267.