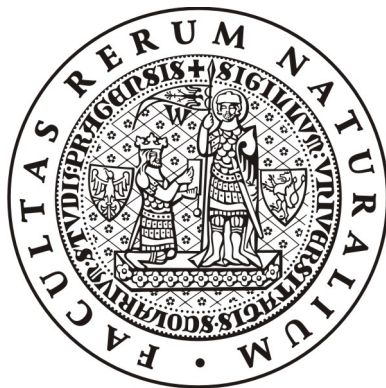


Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra fyziologie rostlin



doktorská disertační práce

Příjem a využití různých forem dusíku u rostlin pšenice

Mgr. Ivana Raimanová

Školitel: Ing. Jan Haberle, CSc., VÚRV, v.v.i., Praha Ruzyně

Konzultant: Ing. Marie Trčková, VÚRV, v.v.i., Praha Ruzyně

Praha 2009

Prohlašuji, že jsem předkládanou doktorskou disertační práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Jana Haberle, CSc. a Ing. Marie Trčková a že nebyla předložena jako doktorská disertační práce na žádné jiné vysoké škole.

V Praze 28.5.2009

.....

Mgr. Ivana Raimanová

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, kteří mě v průběhu doktorského studia všemožně podporovali. Především bych chtěla poděkovat mé konzultantce Ing. Marii Trčkové za cenné a podmětné rady a laskavé vedení práce a mému školiteli Ing. Janu Haberlemu, CSc. za cenné připomínky a odbornou pomoc při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat mým kolegům z oddělení fyziologie rostlin a laboratoře půd a rostlin. Mé speciální díky patří Ing. Martinu Bárnetovi nejen za statistické vyhodnocení dat a pomoc s úpravami textu, ale zvláště za pochopení a povzbuzení v těch mnoha chvílích, kdy jsem to chtěla vzdát.

Práce byla vypracována za finanční podpory těchto projektů:

0002700601 Principy vytváření, kalibrace a validace trvale udržitelných a produktivních systémů hospodaření na půdě (MZE)

QF4176 Omezení negativního vlivu abiotických stresů (NAZV)

521/02/0479 Utilizace živin u různých druhů pšenice a její projev v kvalitě zásobních bílkovin (GAČR)

522/02/0530 Hormonální regulace senescence listů a její vztah k využití dusíku u obilnin (GAČR)

Obsah

1.	Úvod.....	1
2.	Literární přehled.....	3
2.1	Dusík.....	3
2.1.1	Koloběh dusíku v půdě.....	3
2.1.2	Příjem dusíku z půdy.....	5
2.1.3	Příjem a asimilace nitrátů.....	5
2.1.4	Příjem a asimilace amonných iontů.....	11
2.1.5	Příjem a asimilace močoviny.....	15
2.1.6	Regulace příjmu dusíku.....	18
2.1.7	Transport N v rostlině.....	20
2.2	Příjem živin listy.....	21
2.2.1	Kutikula - bariéra pro vstup.....	21
2.3	Hnojení dusíkem.....	23
2.3.1	Základní hnojení.....	23
2.3.2	Využití listově aplikovaných hnojiv.....	24
3.	Cíl práce.....	26
4.	Metodika.....	27
4.1	Rostlinný materiál.....	27
4.2	Metody analýzy rostlinného materiálu.....	27
4.2.1	Stanovení obsahu celkového dusíku a dalších živin.....	27
4.2.2	Stanovení obsahu nitrátů v čerstvé biomase.....	27
4.2.3	Stanovení obsahu amonných iontů v čerstvé biomase.....	28
4.2.4	Stanovení aktivity nitrát reduktázy.....	28
4.2.5	Stanovení obsahu chlorofylu.....	29
4.2.6	Stanovení obsahu rozpustných bílkovin.....	29
4.2.7	Stanovení izotopového poměru $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ a obsahu N.....	30
4.3	Zjištění rozdílů mezi nitrátovou, smíšenou a amonnou výživou.....	30
4.3.2	Určení negativního vlivu nízkého pH.....	32
4.3.3	Odběr vzorků rostlinného materiálu.....	32
4.4	Určení vnitrodruhových a mezidruhových rozdílů v rychlosti příjmu jednotlivých forem dusíku.....	32
4.4.2	Stanovení kinetiky příjmu nitrátových či amonných iontů.....	34
4.5	Pokusy s použitím značených ^{15}N substrátů.....	35
4.5.1	Určení rychlosti příjmu a následné translokace N přijatého z jeho jednotlivých forem.....	35
4.5.2	Určení teplotní závislosti příjmu jednotlivých forem dusíku.....	35
4.6	Pokusy s listově aplikovanými ^{15}N značenými substráty.....	36
4.6.1	Určení příjmu a následné translokace jednotlivých forem dusíku při listové aplikaci.....	36
4.6.2	Určení efektivity využití listově aplikované močoviny v pozdní fázi vývoje pro tvorbu zrna a stanovení možného vlivu přípravků na ochranu rostlin při společné aplikaci na její příjem a využití.....	36
4.7	Statistické zpracování výsledků.....	37
5.	Výsledky.....	38
5.1	Zjištění rozdílů mezi nitrátovou, smíšenou a amonnou výživou.....	38
5.1.1	Morfologické rozdíly.....	38
5.1.2	Rozdíly v obsahu dusíku.....	39
5.1.3	Rozdíly v obsahu esenciálních prvků.....	40
5.1.4	Rozdíly v aktivitě nitrát reduktázy a obsahu nitrátů a amonných iontů.....	41

5.2	Určení negativního vlivu nízkého pH	44
5.2.1	Morfologické rozdíly	44
5.2.2	Rozdíly v obsahu dusíku	45
5.2.3	Rozdíly v obsahu esenciálních prvků.....	46
5.2.4	Rozdíly v aktivitě nitrát reduktázy a obsahu nitrátů a amonných iontů..	48
5.3	Určení vnitrodruhových a mezidruhových rozdílů v rychlosti příjmu jednotlivých forem dusíku.....	49
5.3.1	Kinetické parametry	49
5.3.2	Rozdíly v růstu a v obsahu celkového dusíku a amonných iontů v kořenech a listech	51
5.4	Určení rychlosti příjmu a následné translokace dusíku přijatého z jeho jednotlivých forem	55
5.5	Určení teplotní závislosti příjmu jednotlivých forem dusíku.....	57
5.6	Určení příjmu a následné translokace jednotlivých forem dusíku při listové aplikaci	59
5.7	Určení efektivnosti využití listově aplikované močoviny v pozdních fázích vývoje pro tvorbu zrna a stanovení možného vlivu přípravků na ochranu rostlin při společné aplikaci na její příjem a využití.....	61
6.	Diskuze.....	63
6.1	Vliv nitrátové a amonné formy N a jejich kombinace na růst rostlin pšenice včetně odlišení vlivu nízkého pH.....	63
6.2	Vnitrodruhové a mezidruhové rozdíly v rychlosti příjmu nitrátové a amonné formy dusíku	68
6.3	Rychlost příjmu a následná translokace jednotlivých forem dusíku a teplotní závislost jejich příjmu	70
6.4	Příjem a využití různých forem dusíku při listové aplikaci	73
6.5	Efektivnost využití listově aplikované močoviny v pozdní fázi vývoje pro tvorbu zrna a vliv společné aplikace s prostředky na ochranu rostlin na její příjem a využití	74
7.	Závěry	77
8.	Seznam literatury	79

1. Úvod

Rostoucí světová populace spolu se snižováním plochy zemědělské půdy a její degradací vytvářejí, i přes úspěch „zelené revoluce“, tlak na zvyšování intenzity výroby potravin a objemu produkce zemědělských plodin. Ekonomické důvody a celospolečenský důraz na ochranu životního prostředí vedou k hledání možností zvýšit efektivnost nezbytných vstupů, především energie, dusíkatých hnojiv a prostředků na ochranu rostlin.

Uvedené problémy a možnosti se v značné míře koncentrují u obilovin. Hospodářsky významné druhy pšenice (zejména *Triticum aestivum* L. a *Triticum durum* Desf.) patří svou výměrou k nejpěstovanějším plodinám světa a zajišťují důležitou část výživy světové populace. Podle statistik FAO byla v roce 2007 celková výměra pšenice 217 mil ha a světová produkce se v posledních letech pohybovala mezi 600 - 670 mil t zrna. V České republice je pšenice pěstována na 0,6 - 0,7 mil. ha a její průměrný výnos činí 4 – 5 t/ha.

Agroekologické podmínky, v kterých je pšenice pěstována sahají od semiaridních oblastí po oblasti s hojnými srážkami, od tropů po chladné oblasti ve vysokých zeměpisných šířkách s krátkou vegetační dobou. Pěstitelské systémy zahrnují rozmanité způsoby výživy rostlin a závlahy, odlišné oseední postupy a různé formy zpracování půdy. Používá se odlišná hustota porostů nebo pěstování pšenice ve směsi odrůd či společně s jinými druhy.

Tomuto rozsahu půdně-klimatických a výrobních podmínek odpovídá i široká škála dostupnosti půdního dusíku a podmínek pro příjem a využití živin obecně. Množství a dostupnost jednotlivých forem dusíku pro rostliny kolísá v průběhu jejich ontogenetického vývoje v důsledku dynamiky přeměn dusíku v půdě a v závislosti na konkrétních povětrnostních podmínkách.

Dusík je klíčový esenciální prvek pro dosažení požadovaného výnosu a kvality pěstovaných plodin, který působí v interakci s ostatními živinami a dostupností vody. Pro zvýšení účinnosti využití dusíku a dalších živin je nezbytné poznat a propojit znalosti o relevantních procesech na různých úrovních, od exprese genů až po celistvou rostlinu či populaci jedinců - porost.

V oblasti výživy rostlin je znalost procesů příjmu a využití různých forem dusíku jednou z hlavních možností jak přímo či zprostředkovaně, ovlivňovat růst, výnos a kvalitu produkce.



2. Literární přehled

2.1 Dusík

Dusík je minerální živinou, bez které rostliny nemohou přežít. Je potřebný ve značném množství a jeho nedostatek významně omezuje jejich růst a snižuje výnos. Ačkoli je dusík v půdě přítomen jak ve formě organických tak anorganických sloučenin, rostliny přijímají dusík převážně ve formě nitrátové (NO_3^-) nebo amonné (NH_4^+), v menší míře mohou také využít jako zdroj dusíku aminokyseliny, které jsou dostupnou formou dusíku např. na arktických loukách či v slaných mokřadech a nebo formu amidovou pocházející z aplikace močoviny jako hnojiva. Některé druhy rostlin mají schopnost vytvářet symbiotický vztah s bakteriemi a jsou tak schopny využít vázaný vzdušný dusík.

Dusík je součástí bílkovin, aminokyselin, nukleových kyselin a dalších biologicky aktivních látek. Po uhlíku, vodíku a kyslíku je to čtvrtý nejhojněji zastoupený prvek v rostlinném těle. Obsah dusíku v rostlinách se zpravidla pohybuje v rozmezí 1,5 - 4,5 %.

2.1.1 Koloběh dusíku v půdě

Dusík je v biosféře přítomen v mnoha formách. Obrovskou zásobárnou dusíku je atmosféra, která obsahuje kolem 78 % molekulárního dusíku. Tato forma dusíku však není pro většinu živých organismů dostupná. Molekulární dusík musí být nejprve fixován, a to buď fyzikálními procesy v atmosféře, odkud se dostává do půdy srážkami ve formě HNO_3 a nebo v půdě, kde je působením bakterií a zelených řas převeden na NH_3 . Dalším zdrojem dusíku v půdě jsou proteolytické procesy při kterých se dusík uvolňuje při rozkladu rostlinné, živočišné a mikrobiální biomasy. Stále větší podíl dusíku se také dostává do půdy činností člověka ať aplikací minerálních hnojiv nebo z depozice atmosférického NH_3 , který vzniká v důsledku průmyslové činnosti a intenzivního zemědělství (Ramos, 1996). To vede ke změně dostupnosti a poměru forem dusíku v půdě v mnoha přirozených ekosystémech a může tak ovlivnit jejich druhové složení (London, 2000). Zvýšená depozice NH_3 následkem antropogenní činnosti je spojená s acidifikací půd a přispívá k odumírání lesů.

Procesy přeměny dusíku v půdě ovlivňují jeho dostupnost pro rostliny. Většina těchto procesů je výsledkem aktivity půdních mikroorganismů. Dusík je v půdě přítomen ve formě organické (98 - 99%) a anorganické - NO_3^- a NH_4^+ (1 - 2%).

Mineralizace, při které je půdní organická hmota přeměňována na minerální dusík působením bakterií či hub zahrnuje 2 fáze – amonizaci a nitrifikaci. Nejprve je proteolyticky uvolněný amino-dusík degradován na NH_4^+ . V půdách s neutrálním nebo s alkalickým pH jsou pak vzniklé amonné ionty pomocí nitrifikačních bakterií přeměněny na nitráty. V kyselých půdách jsou nitrifikační procesy výrazně omezeny a dusík v nich tak zůstává převážně v amonné formě.

Nitrifikace je dvoustupňový oxidační proces řízený činností aerobních chemolitotrofních bakterií. V prvním kroku jsou amonné ionty převedeny na nitrity působením bakterií rodu *Nitrosomonas*, *Nitrocystis* apod. a v druhém kroku vznikají z nitritů nitráty činností bakterií rodu *Nitrobacter*.

Obě formy minerálního dusíku jsou poté buď přijaty a využity rostlinami či mikroorganismy a tím biologicky fixovány do organické hmoty nebo podléhají dalším přeměnám v půdě, které mohou vést k uvolnění dusíku zpět do atmosféry.

Amonné ionty mohou být buď reverzibilně imobilizovány fixací na půdní koloidy, jílové součásti či fenolické látky nebo přeměněny na amoniak, který může volatilizací unikat do atmosféry. Tento proces je výrazně ovlivňován hodnotou pH, teplotou a vlhkostí půdy. V alkalickém prostředí je velká část amonných iontů přítomna v půdním roztoku ve formě amoniaku, který je na povrchu půdy snadno uvolňován (Watson *et al.*, 1994; Malhi *et al.*, 2003). Také při povrchové aplikaci močoviny (zvláště v období sucha), může dojít ke ztrátám dusíku volatilizací.

Nitráty díky své velké mobilitě v půdě mohou být snadno vyplavovány do spodních vod nebo působením bakterií přeměňovány buď zpět na amonné ionty (amonifikace) nebo až na plynný dusík či jeho oxidy při denitrifikačních procesech (Taiz a Zeiger, 2002). Při denitrifikaci jsou nitráty využívány chemoheterotrofními nebo chemolitotrofními bakteriemi (např. *Paracoccus denitrificans* a *Thiobacillus denitrificans*) jako konečný akceptor elektronů namísto kyslíku. Denitrifikační procesy jsou tedy častější na zamokřených půdách s nedostatkem kyslíku.

2.1.2 Příjem dusíku z půdy

Příjem obou forem dusíku (NO_3^- i NH_4^+) je ovlivněn jak vnitřními faktory jako jsou N a C status rostliny, její vývojová fáze, tak vnějšími faktory jako je teplota, množství srážek, obsah O_2 či pH rhizosféry.

Ve většině případů je koncentrace nitrátů v půdním roztoku výrazně vyšší (10x - 1000x) než koncentrace amonných iontů (von Wirén *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2007), což je dáno rychlou konverzí volných amonných iontů působením půdních mikroorganismů a nitrát je tak převažující formou dusíku na většině orných půd.

Amonné ionty jsou dostupnější formou dusíku na zamokřených či kyselých půdách a také během chladnějších období, kdy je omezena nitrifikace.

2.1.3 Příjem a asimilace nitrátů

Nitráty jsou v půdě vysoce pohyblivé, snadno difundují v půdním roztoku a jsou tak rychle dostupné pro kořeny rostlin. Koncentrace nitrátů v půdě se může měnit v rozsahu 4 řádů od μM až po mM koncentrace. Suchozemské rostliny mají proto vyvinuty dva systémy pro příjem nitrátů – vysoko-afinitní (HATS) s K_m v rozpětí μM a nízko-afinitní (LATS) s K_m v rozpětí mM .

Při vysoké vnější koncentraci nitrátů se uplatňuje hlavně nízko-afinitní transportní systém (LATS). LATS mají všeobecně nižší kapacitu pro příjem nitrátů než mají HATS a začínají fungovat při koncentracích nitrátů nad $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$. Rychlost příjmu se u nich lineárně zvyšuje s rostoucí koncentrací v okolním prostředí a saturační koncentrace je zřejmě dosažena až kolem 50 mM (Crawford a Glass, 1998). Příjem pomocí LATS je významnější v mladších částech kořene.

Při nízkých vnějších koncentracích nitrátů ($0 - 0,5 \text{ mM}$), jsou aktivní dva vysokoafinitní transportní systémy - konstitutivní (cHATS, $K_m = 6 - 20 \mu\text{M}$) a indukovaný přítomností nitrátů (iHATS, $K_m = 20 - 100 \mu\text{M}$) (Crawford a Glass, 1998; Glass, 2003). cHATS mají vyšší afinitu k NO_3^- , ale iHATS mají mnohem vyšší příjmovou kapacitu (Siddiqi *et al.*, 1990; Aslam *et al.*, 1992; Kronzucker *et al.*, 1995a).

HATS se podílí výrazně na příjmu nitrátů z půdy ve všech stádiích vývoje. Nízká aktivita LATS může být způsobena nízkou koncentrací nitrátů v půdě, která je téměř stále pod úrovní, kdy LATS fungují. V polních podmínkách dochází k přechodnému zvýšení koncentrace nitrátů nad tuto úroveň pouze na jaře

(v počátečních fázích vývoje), kdy dochází k výrazné mineralizaci nebo při aplikaci hnojiv.

Je známo, že maximální rychlost příjmu nitrátů ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{kořene}$) není konstantní a liší se dle rostlinného druhu, genotypu, vývojové fáze rostliny a vnějších podmínek.

Malagoli *et al.*, (2004) zjistili, že rychlost příjmu nitrátů je závislá na diurnálním rytmu - maxima dosahuje asi 6 h po začátku světelné periody a v noci dosahuje asi 1/2 maximální denní rychlosti. Totéž bylo potvrzeno u sóji, kde v noci klesala rychlost příjmu nitrátů na 45 - 50 % oproti příjmu ve dne (Delhon *et al.*, 1995).

Rychlost příjmu je také významně ovlivněna teplotou. Snížení teploty u kořenů vede k výraznému poklesu rychlosti příjmu (Lainé *et al.*, 1993). Mnohem citlivější k teplotě se ukázal být HATS systém, LATS vykazuje mnohem menší citlivost na pokles teploty v kořenové zóně (Malagoli *et al.*, 2004).

Výrazné zvýšení rychlosti příjmu bylo popsáno ve fázích vývoje předcházejících vývoji reprodukčních orgánů u řepky (Malagoli *et al.*, 2004), ječmene (Mattsson *et al.*, 1992) a *Arabidopsis* (Nazoa *et al.*, 2003). V kvetení poté dochází k výraznému omezení aktivity HATS i LATS a tím k poklesu rychlosti příjmu - je to dáno jednak přesunem uhlíkových skeletů do nově vznikajícího sinku (reprodukčních orgánů) a zvýšenou proteolýzou ve stárnoucích listech, čímž roste pool volných aminokyselin, který působí negativní zpětnou vazbou na příjem nitrátů.

2.1.3.1 Transport přes cytoplasmatickou membránu

Prvním krokem při příjmu a využití nitrátů rostlinou je aktivní transport přes plasmatickou membránu kořenových buněk epidermis a primární kůry spojený s vytvořením elektrochemického gradientu pomocí H^+ -ATPázy (Meharg a Blatt, 1995; Miller a Smith, 1996). Při příjmu nitrátů dochází ke slabé alkalizaci rhizosféry (Goodchild a Givan, 1990; Smart a Bloom, 1998).

Vlastní transport nitrátů přes plasmatickou membránu je zajišťován symportem se dvěma protony (McClure *et al.*, 1990; Glass *et al.*, 1992; Crawford a Glass, 1998), kdy vazba nitrátu na transportér je podmíněna navázáním prvního protonu a jeho následné uvolnění na cytoplasmatické straně membrány je zpomalováno vzrůstající koncentrací nitrátů v cytosolu (Meharg a Blatt, 1995).

Při vstupu nitrátů do buňky dochází k přechodné depolarizaci membrány (Glass, *et al.*, 1992), kdy míra depolarizace je závislá na koncentraci nitrátů vně buňky (McClure *et al.*, 1990).

Bazální úroveň aktivity příjmu nitrátů u rostlin vyhladovělých nebo pěstovaných pouze na amonné výživě je dána konstitutivními složkami zajišťujícími příjem nitrátů, rychlost však mnohonásobně vzrůstá pokud rostlina dostane k dispozici nitráty a to díky inducibilním složkám transportního systému. Existují 4 složky zajišťující nitrátový příjem – konstitutivní vysoko-afinitní systém (cHATS), inducibilní vysoko-afinitní systém (iHATS), konstitutivní nízko-afinitní systém (cLATS) a inducibilní nízkoafinitní systém (iLATS). Vysoko a nízko afinitní systémy u vyšších rostlin jsou geneticky odlišné.

U vyšších rostlin byly identifikovány 2 rodiny nitrátových transportérů - NRT1 a NRT2. NRT2 jsou vysoko-afinitní nitrátové transportéry, zatímco většina transportérů NRT1 rodiny jsou transportéry nízko-afinitními. U *Arabidopsis* bylo identifikováno 53 genů pro NRT1 (u rýže dokonce 80) a 7 genů pro NRT2 (Tsay *et al.*, 2007).

2.1.3.1.1 HATS

Dvě složky vysoko-afinitního transportního systému jsou kódovány různými geny a liší se jak v afinitě k nitrátům, tak i různým mechanismem regulace. Konstitutivní složka (cHATS) je přítomna v kořenech i u rostlin, které se nikdy nesetkaly s nitráty, naproti tomu inducibilní složka (iHATS) je exprimována v kořenech až v přítomnosti nitrátů.

Konstitutivní složka má vyšší afinitu k nitrátům, ale mnohem nižší kapacitu příjmu. Hodnota V_{\max} je pro iHATS několikanásobně vyšší než pro cHATS. U ječmene byly zjištěny kinetické parametry pro cHATS (K_m v rozmezí 6 - 20 μM a V_{\max} 0,13 - 1,3 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{FW.h}^{-1}$), pro iHATS pak (13 - 79 μM resp. 2 - 15 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{FW.h}^{-1}$)(Siddiqi *et al.*, 1990; Aslam *et al.*, 1992).

Inducibilní vysoko-afinitní příjem nitrátů je vysoce regulovaný, jeho aktivita rychle vzrůstá po počáteční dodávce nitrátů a klesá v odpovědi na akumulaci některých endogenních zdrojů dusíku jako jsou nitráty, amonné ionty a zvláště aminokyseliny, které mohou být zapojeny do negativní zpětnovazebné regulace a tak koordinovat příjem kořeny v souladu s potřebou nadzemní části (Ismande a Touraine, 1994; Crawford a Glass, 1998). Tato regulace probíhá především na úrovni transkripce

mRNA Nrt2 genů (Lejay *et al.*, 1999; Zhuo *et al.*, 1999), i když byla prokázána i regulace post - transkripční (Frasier *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2007).

U nejlépe prostudovaného druhu *Arabidopsis thaliana* patří *AtNRT2.1* a *AtNTR2.2* mezi transportéry pro vysoko-afinitní příjem nitrátů (Liu *et al.*, 1999; Cerezo *et al.*, 2001a) zatímco *AtNTR1.1* a *AtNRT1.2* jsou zapojeny do nízko-afinitního příjmu (Huang *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1999). Výjimku tvoří *AtNTR1.1* (původně identifikovaný jako CHL1), který je transportérem s duální afinitou – vysoko-afinitní fáze s K_m kolem 50 μM a nízko-afinitní s hodnotou 4 mM (Liu *et al.*, 1999). Bylo zjištěno, že status transportéru je dán fosforylací či defosforylací na molekule threoninu 101. Fosforylace je regulována v reakci na vnější změny v koncentraci nitrátů (Liu a Tsay, 2003). Fosforylovaný CH1 funguje jako vysoko-afinitní nitrátový transportér a defosforylovaný jako nízko-afinitní.

AtNTR1.1 (CHL1), *AtNRT2.1* a *AtNRT2.2* jsou nitrátem indukované geny, které se účastní exprese iHATS, ale jejich bazální hladina se částečně podílí i na cHATS. Ze studia mutantů recesivních v těchto genech vyplývá, že výraznější podíl na aktivitě iHATS má *AtNRT2.1* (Li *et al.*, 2007). Jeho exprese rychle vzrůstá v reakci na přítomnost nitrátů v živném médiu, naopak vznikající metabolity (zvláště pak glutamin) expresi omezují (Nazon *et al.*, 2003). Obdobné výsledky byly získány i u ječmene pro *HvNRT2* (Vidmar *et al.*, 2000). Geny se sekvenční podobností byly nalezeny také u kukuřice (Quaggiotti *et al.*, 2003), tabáku (Quesada *et al.*, 1997), sóji (Amarasinghe *et al.*, 1998), pšenice (Yin *et al.*, 2007) řepky či rýže (Araki a Hasegawa, 2006). Zatím však u nich nebyl prokázán transportér s duální afinitou jako je *AtNRT1.1*.

NRT2 protein je tvořen 12 transmembránovými doménami. Jak bylo zjištěno, aby fungoval jako transportér nitrátů musí vytvořit komplex s další jednotkou – označenou jako NAR2. Např. u ječmene je to spojení *HvNAR2.3* a *HvNRT2.1* a teprve pak vzniklý komplex funguje jako vysoko-afinitní přenašečový systém (Tong *et al.*, 2000). U *Arabidopsis* byly objeveny 2 NAR2 geny a u *AtNAR2.1* byla prokázána účast na vysoko-afinitním příjmu nitrátů (Orsel *et al.*, 2006). Poslední studie ukázaly, že *AtNAR2.1* funguje jako kotva, která pomáhá správnému umístění NRT2 proteinu na plasmatické membráně (Miller *et al.*, 2007).

2.1.3.1.2 LATS

Také nízko-afinitní transportní systém pro nitráty má konstitutivní a inducibilní složku. Prvním izolovaným NRT1 genem byl v roce 1993 CHL1 (dle chlorečnan rezistentní mutant). Protein, který tento gen kódoval nevykazoval ve své době sekvenční podobnost s žádným známým proteinem v databázi a bylo u něj prokázáno, že přenáší nitráty společně s protony (Tsay *et al.*, 1993). Bylo zjištěno, že CHL1 (dnes *AtNTR1.1*) je zapojen do příjmu nitrátů z půdy (Huang *et al.*, 1996). V roce 1994 byly identifikovány geny pro transportéry di- a tri-peptidů, které vykazovaly sekvenční podobnost s CHL1 a společně tak vytvořily rodinu transportérů zvanou NRT1(PTR) (Steiner *et al.*, 1995). Nitrátové transportéry však ve většině případů nemohou přenášet peptidy a naopak. Přes jejich sekvenční podobnost jsou tedy jejich funkce v rostlině zcela odlišné.

U *Arabidopsis thaliana* je kromě *AtNTR1.1* zapojen do nízko-afinitního příjmu také *AtNRT1.2* (Huang *et al.*, 1999), přesto mezi oběma přenašeči existují podstatné rozdíly. *AtNRT1.1* je transportér s duální aktivitou, jehož exprese je indukována nitráty, naproti tomu *AtNRT1.2* je exprimován konstitutivně a jedná se o čistě nízko-afinitní transportér (Huang *et al.*, 1999). Rozdíl je i v místě exprese. *AtNTR1.1* (CHL1) je exprimován v epidermis kořenové špičky, v ostatních částech kořene pak v primární kůře a endodermis. Naproti tomu *AtNRT1.2* byl nalezen pouze v epidermis. Podobné je to i u *OsNRT1*, což je konstitutivní gen kódující čistě nízko-afinitní nitrátový transportér, který je exprimován pouze v kořenové pokožce rýže (Lin *et al.*, 2000). Navíc se ukázalo, že exprese *AtNTR1.1* je větší v mladších částech kořenů než ve starších (Huang *et al.*, 1996, Guo *et al.*, 2001), u *AtNRT2.1* je tomu naopak (Nazon *et al.*, 2003, Remans *et al.*, 2006).

Současně bylo zjištěno, že transkripce obou genů se liší v reakci na nedostatek N, přítomnost dusitanů a aktivitu NR (Filleur a Daniel-Vedele, 1999, Lejay *et al.*, 1999; Loqué *et al.*, 2003). Velké rozdíly v expresi byly pozorovány také v závislosti na vývojovém stádiu rostliny (Huang *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1998). Některé práce naznačují, že by CHL1 mohl fungovat jako nitrátový senzor (Krouk *et al.*, 2006).

Homology nízko-afinitních transportérů byly také identifikovány u řepky (Muldin a Ingemarsson, 1995), rajčete (Lauter *et al.*, 1996), rýže (Lin *et al.*, 2000) či citrusu (Cerezo *et al.*, 2000).

Předpokládá se, že všechny NRT1 transportéry u vyšších rostlin obsahují 12 transmembránových domén s velkou hydrofilní smyčkou mezi doménami 6 a 7.

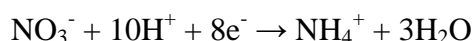
2.1.3.2 Metabolické přeměny v buňce

Po přijetí nitrátu do buněk kořene, musí být nitrát transportován přes několik buněčných membrán, aby byl distribuován do různých buněčných kompartmentů a různých pletiv. Zvláště důležitý je jeho transport do vakuoly, kde jsou nitráty ukládány ve velkém množství do zásoby. Z dosavadních měření membránového potenciálu na tonoplastu a koncentrace nitrátů v cytosolu a ve vakuole vyplývá, že také transport nitrátů přes tonoplast je aktivní proces (Miller a Smith, 1996).

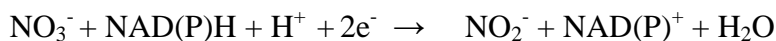
O transportérech do různých kompartmentů buňky a různých pletiv je toho známo méně. U *Arabidopsis AtCLCa* zajišťuje transport nitrátů do vakuoly antiportem s protony (De Angely *et al.*, 2006).

Měření pomocí mikroelektrod u ječmene ukázalo, že koncentrace nitrátů v cytosolu je udržována na hodnotě kolem 4 mM, kdežto koncentrace ve vakuole je závislá na koncentraci v živném médiu (Miller a Smith, 1996). Dále bylo zjištěno, že i při nedostatku nitrátů v médiu je koncentrace v cytosolu udržována relativně dlouhou dobu konstantní uvolňováním nitrátů z vakuoly (van der Leij *et al.*, 1998).

Asimilace nitrátů se skládá z dvoustupňové redukce. Tento proces je vysoce-energeticky náročný, je potřeba ekvivalent 12 ATP (Bloom *et al.*, 1992).

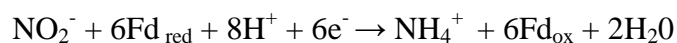


První krok asimilace nitrátů probíhá v cytoplasmě. Reakce je katalyzována enzymem nitrát reduktázou (NR).



Nitrát reduktáza u vyšších rostlin je složena ze dvou identických podjednotek, každá obsahuje 3 prostetické skupiny: FAD, hem a molybdenový komplex (MoCo) (Campbell, 1999). Exprese a aktivita nitrát reduktázy je regulována na transkripční úrovni koncentrací nitrátů, N-metabolity, CO₂, C-metabolity, světlem a cytokininy a enzym současně prochází posttranslační modifikací fosforylací. Fosforylace a následná vazba inhibičního 14-3-3 proteinu je odpovědná za reverzibilní inaktivaci NR (Huber *et al.*, 1996; Campbell, 1999; Buchanan *et al.*, 2000).

Volné nitrity jsou pro rostlinu vysoce toxické a vznikající nitrity jsou proto ihned transportovány do plastidů, kde jsou přeměněny na amonné ionty za katalýzy nitrit reduktázou (NiR).



Jak bylo zjištěno, toxicita NO_2^- je závislá na pH. Pokud bylo pH neutrální, nebyly projevy toxicity pozorovány ani u pšenice ani u rýže pěstované na mediu s nitritem jako zdrojem N, zatímco při pH 4 byly nitrity pro rostliny vysoce toxické (Zsoldos *et al.*, 1999).

2.1.4 Příjem a asimilace amonných iontů

Koncentrace amonných iontů v půdě kolísá v rozsahu 2 řádů. Amonné ionty se v půdě, v porovnání s nitráty, pohybují 50x – 500x pomaleji, často jsou vázány na jílové minerály a v rhizosféře se tak snadno vytvářejí zóny s nízkou koncentrací amonných iontů. Pro jejich příjem jsou tak třeba jak nízko-, tak zvláště vysoko-afinitní transportní systémy.

V mnoha přirozených (lesy mírného pásma, mokřady) i zemědělských ekosystémech (rýžoviště) může být NH_4^+ převládající formou dusíku (Pearson a Stewart, 1993; Bijlsma *et al.*, 2000).

Ačkoli příjem a asimilace amonných iontů jsou pro rostlinu energeticky méně náročné, (vzhledem k tomu že amonné ionty nemusí být redukovány, aby mohly být v rostlinné buňce zabudovány do aminokyselin a jsou zároveň meziprodukty v mnoha metabolických reakcích) byly u většiny rostlin pěstovaných v přítomnosti amonného iontu jako jediného zdroje dusíku pozorovány symptomy toxicity (Givan, 1979; Gerendás *et al.*, 1997; Britto a Kronzucker, 2002).

Koncentrační práh, při kterém se tyto symptomy toxicity projeví se však mezi rostlinnými druhy velmi liší. Mezi druhy, které jsou velmi citlivé k toxickému působení amonných iontů patří i velká většina polních plodin jako např. ječmen (Britto *et al.*, 2001b), brambory (Cao a Tibbits, 1998), fazole (Zhu *et al.*, 2000). Na druhou stranu spektra pak patří rýže, která je dobře adaptována na pěstování v prostředí, kde jsou amonné ionty jediným zdrojem dusíku (Wang *et al.*, 1993a; Britto *et al.*, 2001b). Jak bylo pozorováno, citlivé druhy rostlin (ječmen) akumulují mnohem větší množství amonných iontů a dochází u nich k výraznému zpětnému

vyučování amonných iontů v porovnání s tolerantními druhy (rýže) (Britto *et al.*, 2001b).

Toxické působení amonných iontů je však u většiny rostlin zcela potlačeno když jsou v živném médiu současně přítomny nitráty (Feng a Barker, 1992; Cruz *et al.*, 1993; Schortemeyer *et al.*, 1997). U mnoha rostlin byla pozorována vyšší rychlost růstu a lepší výnos u rostlin pěstovaných v přítomnosti obou iontů v porovnání se samotnými nitráty (Kronzucker *et al.*, 1999a; Baozhen *et al.*, 2006). Zdá se, že přítomný nitrát může působit jako signál, který stimuluje množství biochemických reakcí (Tischner, 2000) a kromě toho nedochází k tak výrazné acidifikaci okolního prostředí (Marschner, 1995).

Navíc je většina rostlin schopna přijímat amonné ionty rychleji v porovnání s nitráty pokud jsou obě formy dusíku přítomny v živném médiu v podobných koncentracích (Macduff a Jackson, 1991; Serna *et al.*, 1992; Gessler *et al.*, 1998; Gazzarrini, *et al.*, 1999; Kronzucker *et al.*, 1999 a,b). Celkový příjem N může být až o 75 % vyšší než u stejné koncentrace jednotlivých iontů a současně dochází ke zvýšenému transportu N do nadzemních částí, což může mít velký agronomický význam.

2.1.4.1 Transport přes membránu

Příjem amonných iontů je spojen s výraznou acidifikací rhizosféry (Smart a Bloom, 1998). Amonný iont je transportován přes membránu antiportem s H^+ (Wang *et al.*, 1994; Cerezo *et al.*, 2001b) a příjem amonných iontů je tak spojen s poklesem pH v cytosolu (Marschner, 1995).

Při transportu amonných iontů přes plasmatickou membránu dochází k její velmi rychlé depolarizaci, což je pravděpodobně dáno zvýšením pozitivního náboje v cytosolu (Ayling, 1993; Wang *et al.*, 1994).

2.1.4.1.1 HATS

Také v případě amonných iontů je vysokoafinitní transportní systém tvořen dvěma složkami – cHATS a iHATS. U transportérů amonných iontů bylo zjištěno, že exprese konstitutivní složky (cHATS) je významnější než je tomu v případě nitrátů a současně indukce substrátem (u iHATS) je méně výrazná. Aktivita HATS pro amonné ionty je závislá na metabolismu (Glass *et al.*, 1997). U rostlin, které se nikdy neseťkaly s amonnými ionty byla zjištěna V_{max} kolem $4 - 6 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{FW.h}^{-1}$ (Mäck a Tischner, 1994). Odhadnuté hodnoty K_m pro HATS kolísaly

v rozpětí 17 – 188 μM (Wang *et al.*, 1993b; Kronzucker *et al.*, 1996). U rýže bylo zjištěno, že kinetické parametry příjmu se lišily v závislosti na koncentraci amonných iontů, ve které byly rostliny před měřením pěstovány (Wang *et al.*, 1993b). U rostlin adaptovaných na nižší koncentrace NH_4^+ byly hodnoty V_{max} vyšší a K_m nižší než u rostlin adaptovaných na vysokou dodávku amonných iontů.

U vyšších rostlin byly identifikovány geny pro vysoko-afinitní transportní systémy patřící do rodiny AMT1 a MEP/AMT2 genů (Ninnemann *et al.*, 1994; Gazzarrini *et al.*, 1999; Howitt a Udvardi, 2000; Loqué *et al.*, 2006; Yuan, *et al.*, 2007).

Prvním izolovaným genem kódujícím vysoko-afinitní NH_4^+ transportér byl *AtAMT1;1* u *Arabidopsis* (Ninnemann *et al.*, 1994). Tento gen kóduje polypeptid o velikosti 53 kDa, který je exprimován v kořenech i listech. Bylo zjištěno, že se jedná o aktivní přenašečový systém řízený gradientem protonů, který kotransportuje H^+/NH_4^+ (K_m kolem 10 μM). Jeho exprese vzrůstá v kořenech při nedostatku dusíku (Gazzarrini *et al.*, 1999). U *Arabidopsis* bylo identifikováno prozatím 5 AMT1 transportérů (*AtAMT1;1* - *AtAMT1;5*) (Gazzarrini *et al.*, 1999; Loqué a von Wirén, 2004).

Homology byly posléze identifikovány u rajčete (Lauter *et al.*, 1996; von Wirén *et al.*, 2000), rýže (Sonoda *et al.*, 2003), citrusů (Camanes *et al.*, 2007) či topolu (Couturier *et al.*, 2007).

Jak bylo nedávno zjištěno, regulace jednotlivých genů pro vysokoafinitní transportéry amonných iontů může být orgánově specifická (Couturier *et al.*, 2007; Engineer a Kranz, 2007).

2.1.4.1.2 LATS

Při vysokých koncentracích amonných iontů v okolním prostředí je jejich příjem z velké části zajišťován nízko-afinitním transportním systémem (LATS). Příjem amonných iontů zde vykazuje lineární závislost na koncentraci (Wang *et al.*, 1993b; Kronzucker *et al.*, 1996) a jeho aktivita není zřejmě negativně regulována vyšším obsahem N v rostlině (Wang *et al.*, 1993a; Glass *et al.*, 1997; Rawat *et al.*, 1999; Cerezo *et al.*, 2001b). Zatím nebyl objeven žádný specifický přenašeč amonných iontů a zdá se, že pro nízko - afinitní příjem jsou využívány kanály pro K^+ - AKT1 či KAT1 (Lagarde *et al.*, 1996; Bertl *et al.*, 1997).

Interakce mezi NH_4^+ a K^+ byly zkoumány u rýže (Wang *et al.*, 1996). Při nízkém obsahu K v rostlině byl příjem amonných iontů inhibován draslíkem. Zdá se, že u nízko-afinitního příjmu dochází k výrazné kompetici mezi oběma ionty.

Rostliny se musí bránit toxickému působení nadbytku amonných iontů buď jejich ukládáním v pletivech (Husted *et al.*, 2000) nebo zvýšeným vylučováním amonných iontů zpět do okolního prostředí (Lang a Kaiser, 1994). Vylučování amonných iontů do okolního prostředí je proces velmi energeticky nákladný (Kronzucker *et al.*, 2001). Zvyšuje se rychlost dýchání a může také docházet k poklesu koncentrace ATP v buňce (Rigano *et al.*, 1996). Soudí se, že zvýšená potřeba uhlikatých skeletů v kořenech rostlin přijímajících amonné ionty může být také částečně odpovědná za projevy toxicity (Schortemeyer *et al.*, 1997).

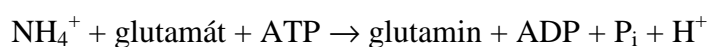
2.1.4.2 Metabolické přeměny v buňce

Volné amonné ionty v buňce jsou samy o sobě toxické (Marschner, 1995; Tobin a Yamaya, 2001). Koncentrace NH_4^+ v cytosolu je tak většinou velmi nízká, pohybuje se v řádu mikro až milimolů (Britto *et al.*, 2001a; Miller *et al.*, 2001). Rostliny se snaží bránit nadbytečnému množství amonných iontů v cytosolu, jak kontrolou jejich příjmu, tak zpětným vylučováním amonných iontů přes plasmatickou membránu, ukládáním do vakuol a jejich asimilací.

Asimilace amonných iontů zahrnuje uvolňování protonů (Raven a Smith, 1976). Na 1 mol asimilovaného NH_4^+ je vyprodukován 1 mol H^+ . Protony jsou pak transportovány ven z buňky pomocí plasmatické H^+ -ATPázy.

Po přijetí do buňky jsou amonné ionty velmi rychle metabolizovány. Pro jejich zabudování do organických sloučenin (jsou navázány jako amidové zbytky do glutaminu) je třeba ekvivalentu 2 ATP (Bloom *et al.*, 1992). Asimilace amonných iontů je dvojstupňový proces, který je katalyzován dvěma enzymy - GS (glutamin syntetázou) a GOGAT (glutamát syntetázou) (Lea a Mifflin, 1974; Mifflin a Lea, 1980).

První krok asimilace amonných iontů probíhá buď v cytosolu (převážně v kořenech) nebo v plastidech (v nadzemních částech). Reakce je katalyzována glutamin syntetázou (GS).



Druhý krok asimilace probíhá v plastidech za katalýzy glutamát syntázou (GOGAT).



V nadzemních částech může být jako zdroj redukčních ekvivalentů namísto NADH využit ferredoxin.

Kromě amonných iontů pocházejících z jejich příjmu přes plasmatickou membránu, jsou dalšími zdroji amonných iontů v cytoplasmě asimilace nitrátů, katabolismus proteinů a aminokyselin, zvláště ve stárnoucích listech (Mattsson a Schjoerring, 2003) a fotorespirace.

Při remobilizaci a reutilizaci dusíku je důležitá aktivita GS ve stárnoucích listech a aktivita GOGAT ve vyvíjejících se orgánech.

2.1.5 Příjem a asimilace močoviny

Močovina je důležitým N-metabolitem v rostlinách. Jejím přirozeným zdrojem v biosféře je detoxikace dusíkatých sloučenin u některých živočichů a člověka a její následné vylučování do prostředí. Hlavním zdrojem močoviny je však její aplikace jako hnojiva pro výživu rostlin. Močovina $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ obsahuje 46 % N a je tak hnojivem s největším obsahem dusíku. V současné době zaujímá močovina celosvětově více než 50 % z aplikovaných hnojiv pro polní plodiny (Glibert *et al.*, 2006; EFMA, 2008).

Koncentrace močoviny v půdě je však poměrně nízká. Močovina je totiž velmi rychle degradována půdními organismy hydrolýzou pomocí ureázy (Watson *et al.*, 1994), proto se předpokládá že většina N z močoviny aplikované do půdy je rostlinami přijímána ve formě amonných iontů (Marschner, 1995). Přesto bylo prokázáno, že rostliny přijímají i nehydrolyzovanou močovinu a to jak kořeny (Gerendás *et al.*, 1998; Mérigout *et al.*, 2008), tak i přes list (Krogmeier *et al.*, 1989).

2.1.5.1 Transport přes membránu

Močovina je malá nepolární sloučenina, jež může snadno procházet přes plasmatickou membránu a její příjem, tak může probíhat prostou difúzí. Jak však bylo zjištěno, příjem močoviny je závislý na koncentraci a vykazuje dvoufázovou kinetiku (Wilson a Walker, 1988). Při vyšších vnějších koncentracích je tedy příjem močoviny

zprostředkovan usnadněnou difúzí a zároveň byl prokázán i aktivní transport (Wilson *et al.*, 1988).

Podle novějších poznatků transport močoviny přes plasmatickou membránu či tonoplast může být zprostředkovan některými typy aquaporinů (Eckert *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2003b). Současně byl identifikován i vysoko-afinitní transportní systém pro příjem močoviny (Liu *et al.*, 2003a).

2.1.5.1.1 HATS

Vysoko-afinitní transportér pro močovinu byl u vyšších rostlin identifikován u *Arabidopsis* (*AtDUR3*) či rýže (*OsDUR3*) (Liu *et al.*, 2003a). Gen *AtDUR3* kóduje integrální membránový protein se 14 transmembránovými doménami, který patří do rodiny tzv. Na⁺-symportérů. Transport močoviny je však stimulován nižším pH a nereaguje na přítomnost Na⁺; bylo tedy navrženo, že se jedná o H⁺ - močovina kotransportér. *AtDUR3* je exprimován jak v listech, tak v kořenech. Jeho exprese v kořenech je stimulována nedostatkem dusíku (Liu *et al.*, 2003a; Kojima *et al.*, 2007).

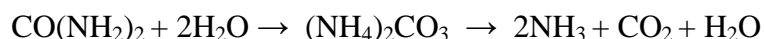
Zároveň byla jeho zvýšená exprese potvrzena v klíčících semenech společně s vysoko-afinitním transportérem amonných iontů (*AtATM1;1*) a cytosolickou glutamin-syntetázou (Gazzarrini *et al.*, 1999; Oliveira a Coruzzi, 1999).

2.1.5.1.2 Usnadněná difúze pomocí aquaporinů

Transport močoviny usnadněnou difúzí zprostředkovaný určitým typem aquaporinů byl zjištěn u tabáku (Eckert *et al.*, 1999) a *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 2003b). Příjem močoviny těmito kanály vykazuje lineární závislost na koncentraci a žádnou saturační kinetiku. Současně bylo zjištěno, že exprese jejich genů vzrůstá v kořenech při nedostatku dusíku, kdežto v listech je jejich exprese víceméně konstitutivní (Liu *et al.*, 2003b). Tyto kanály se nacházejí jak na plasmatické membráně tak i na tonoplastu a zajišťují tak nejen vstup močoviny z vnějšího média do nitra buňky, ale zároveň i transport nadbytečné močoviny do vakuoly. Přes tato nová zjištění však je transport močoviny v rostlinách a jeho regulace stále málo prozkoumán.

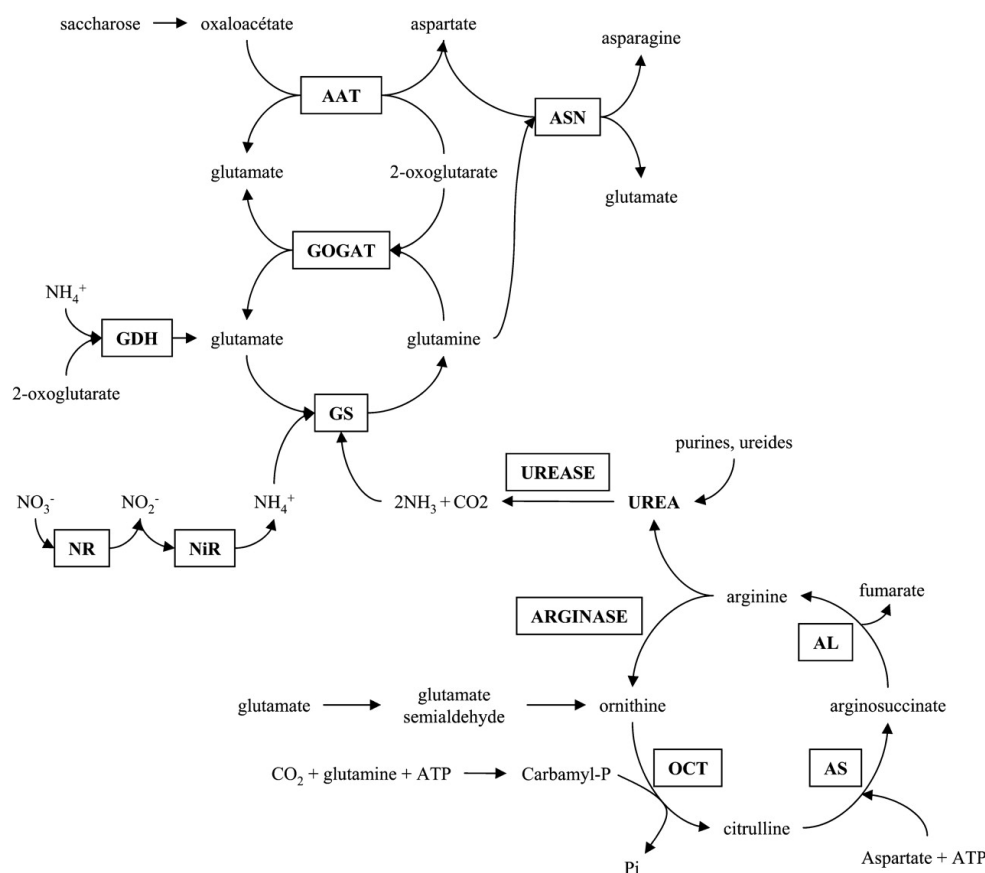
2.1.5.2 Metabolické přeměny v buňce

Vlastní hydrolýza přijaté močoviny probíhá v cytoplasmě a je katalyzována enzymem ureázou. Ureáza je Ni-dependentní enzym, který se vyskytuje téměř u všech organismů (Gerendás *et. al.*, 1999). Katalyzuje rozklad močoviny na amoniak a oxid uhličitý.



Dalším zdrojem močoviny v rostlinách jsou dva biochemické cykly. Močovina je syntetizována v rostlinných buňkách jednak během degradace argininu v ornithinovém cyklu pomocí arginázy v mitochondriích a také vzniká při katabolismu ureidů (jako je allantoin). Vznikající močovina je poté opět hydrolyzována v cytoplasmě.

Amonné ionty pocházející z hydrolýzy močoviny jsou poté zabudovány do organických sloučenin pomocí GS-GOGAT cyklu stejně jako přijaté amonné ionty a amonné ionty vznikající asimilací nitrátů či při fotorespiraci (Mérigout *et al.*, 2008).



Obr.2.1 Schéma metabolismu močoviny (převzato z Mérigout *et al.*, 2008).

Močovina se akumuluje zvláště ve starších listech jako důsledek rozkladu proteinů a retranslokace dusíku (Gerendás *et al.*, 1999). Zároveň v senescentních listech vzrůstá aktivita ureázy a glutamin syntetázy (Masclaux *et al.*, 2000; Witte *et al.*, 2002). Akumulace močoviny byla pozorována také během klíčení a vývoje semenáčků jako důsledek mobilizace zásobních proteinů (Zonia *et al.*, 1995).

2.1.6 Regulace příjmu dusíku

Procesy příjmu živin a jejich molekulární součásti jsou regulovány buď v reakci na dostupnost dané živiny nebo na výživný stav rostliny a je tomu tak i v případě dusíku (Glass *et al.*, 2002). Regulace příjmu vždy odpovídá aktuálnímu stavu rostliny, rychlosti růstu a ontogenetické fázi. Příjem je také ovlivněn vnějšími podmínkami jako je teplota, světlo, pH a chemické a fyzikální podmínky rhizosféry. Příjem dusíku zvláště na úrovni vysoko-afinitních transportních systémů je stimulován fotosyntézou (Lejay *et al.*, 2003; Lejay *et al.*, 2008).

2.1.6.1 Regulace příjmu nitrátů

Příjem nitrátů kořeny rostlin je regulován potřebou rostliny a podléhá negativní zpětné vazbě dané koncentrací metabolitů a NO_3^- v pletivech (Forde a Clarkson, 1999; Vidmar *et al.*, 2000). Potřeba nadzemních částí rostliny je kořenům zprostředkována pomocí koncentrace aminokyselin (zvláště pak glutaminu) ve floému (Tillard *et al.*, 1998). Samotná regulace příjmu nitrátů se liší od regulace příjmu ostatních iontů, u kterých se při nedostatku zvyšuje kapacita pro příjem. U nitrátů se naopak kapacita snižuje a příjem běží jen pomocí cHATS. Aktivita HATS i LATS pro příjem nitrátů klesá u rostlin v reakci na nedostatek dusíku (Lejay *et al.*, 1999) a jednotlivé transportéry jsou převážně regulovány na úrovni transkripce. Např. u vysokoafinitního transportéru (NRT2.1) byla prokázána indukce přítomností nitrátů v okolním prostředí i v malé koncentraci (10 – 50 μM) (Filleur a Daniel-Vedele, 1999; Wang *et al.*, 2004), omezení exprese negativní zpětnou vazbou N-metabolity jako jsou NH_4^+ a aminokyseliny (Zhuo *et al.*, 1999; Nazoa *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004) a stimulace světlem a cukry (Lejay *et al.*, 1999; Lejay *et al.*, 2003).

Příjem nitrátů je též regulován aktuální fotosyntetickou aktivitou rostliny, což podporuje hypotézu, že vliv světla na příjem nitrátů je v kořenech zprostředkován dostupností produktů fotosyntézy. Např. u sóji rychle klesal příjem nitrátů při snížení

koncentrace CO₂, zastínění nadzemní části či inhibici floémového toku, naproti tomu přidání cukrů do média tento efekt odstranilo (Delhon *et al.*, 1996).

Přítomnost amonných iontů naopak může výrazně brzdit příjem nitrátů (Siddiqi *et al.*, 1990; Touraine a Glass, 1997). Negativní vliv amonných iontů na příjem nitrátů je pravděpodobně částečně způsoben negativní zpětnou vazbou produkty jejich asimilace (Forde a Clarkson, 1999).

Také fytohormony regulují příjem nitrátů-např. *AtNRT1.1* je regulován auxinem (Guo *et al.*, 2003), cytokininy jsou zapojeny do signalizace dostupnosti N a regulace exprese NRT2 (Sakakibara, 2003, Brenner *et al.*, 2005) a exogenně dodávaná ABA indukuje expresi NRT2 a NAR2 genů v kořenech pšenice rostoucích na substrátu bez dusíku (Cai *et al.*, 2007).

2.1.6.2 Regulace příjmu amonných iontů

Stejně jako v případě nitrátů podléhá i příjem amonných iontů negativní zpětné vazbě zprostředkované produkty N metabolismu v rostlině, které charakterizují její N-status (Gazzarrini *et al.*, 1999; Rawat *et al.*, 1999; Cerezo *et al.*, 2001b; Loqué a von Wirén, 2004). Tato zpětná vazba tedy ovlivňuje aktivitu HATS tak, aby byla optimálně zajištěna potřeba dusíku v rostlině. Zdá se však, že příjem amonných iontů je regulován spíše na lokální úrovni než úrovni celé rostliny a že příjem závisí na rychlosti asimilace amonných iontů v kořenech (Loqué a von Wirén, 2004).

Také příjem amonných iontů je regulován na úrovni exprese jejich transportérů a to jak v reakci na N-hladovění (Gazzarrini *et al.*, 1999; Camanes *et al.*, 2009) tak na fotosyntetickou aktivitu rostliny a tím produkci a transport fotosyntetických asimilátů do kořenů (Lejay *et al.*, 2003; Camanes *et al.*, 2007).

U *Arabidopsis* bylo zjištěno, že v reakci na nedostatek dusíku dochází k výraznému zvýšení transkripce *AtAMT1;1* i *AtAMT1;3* a současnému zvýšení aktivity HATS (Gazzarrini *et al.*, 1999; Rawat *et al.*, 1999; Loqué *et al.*, 2006). Ovšem brzy po obnovení dodávky amonných iontů do média byl vysoko-afinitní příjem rychle omezen (Rawat *et al.*, 1999). Zároveň bylo zjištěno, že exprese *AtAMT1;1* je potlačena přítomností nitrátů v médiu (Wang *et al.*, 1998).

U citrusů byla nalezena výrazná závislost mezi fotosyntetickou aktivitou v listech a aktivitou NH₄⁺-HATS a zároveň expresí *CitAMT1*. Zdá se tedy, že změny v produkci a transportu fotosyntetických asimilátů do kořenů během dne ovlivňují jak expresi *CitAMT1*, tak aktivitu příslušného HATS (Camanes *et al.*, 2007).

V poslední době bylo zjištěno, že genová exprese *AtAMT1;1* je jinak regulována v kořenech a jinak v nadzemní části rostliny. Je tedy možné, že regulace různých genů AMT1 rodiny závisí na tom, v jaké části rostliny jsou exprimovány (Engineer a Kranz, 2007).

2.1.6.3 Regulace příjmu močoviny

Příjem močoviny kořeny je řízen obsahem dusíku v rostlině. U deficitních rostlin byl příjem větší v porovnání s rostlinami saturovanými (Bradley *et al.*, 1989). Příjem močoviny je inhibován přítomností amonných iontů a nitrátů a je stimulován u rostlin, kde je močovina jediným zdrojem dusíku. Stimulace příjmu zároveň korelovala se zvýšenou expresí genu kódujícího vysokoafinitní transportér močoviny (Mérigout *et al.*, 2008).

Příjem amonných iontů je stimulován nejen nedostatkem dusíku, ale také u rostlin, které dostávaly močovinu jako jediný zdroj dusíku. Naproti tomu příjem nitrátů stejně jako jeho translokace do nadzemní části byl močovinou bržděn. Tento efekt však nebyl pozorován tam, kde byla močovina dodávána v kombinaci s nitráty a amonnými ionty (Mérigout *et al.*, 2008).

2.1.7 Transport N v rostlině

Většina amonných iontů je asimilována v kořenech. Vyšší koncentrace amonných iontů je pro rostlinu toxická, a proto jsou urychleně zabudovány do organických sloučenin nebo akumulovány ve vakuolách. Při příjmu amonných iontů jsou ve zvýšené míře do kořenů transportovány sacharidy sloužící jako uhlíkaté skelety a do nadzemní části je pak dusík transportován ve formě aminokyselin, zvláště glutaminu či asparaginu. U obilnin je hlavní transportní formou glutamin.

Při příjmu nitrátů je transportní formou přímo nitrát, a proto není třeba tolik C-skeletů. S rostoucí koncentrací nitrátů roste podíl nitrátů transportovaných do nadzemní části. Koncentrace nitrátů v xylémové šťávě může být relativně dosti vysoká (10-30 mM) (Miller *et al.*, 2007), zvláště u trav (kam patří i většina obilovin), u kterých je většina přijatých nitrátů asimilována v nadzemní části. Přijatý nitrát může být také ve velké míře ukládán v kořenech do vakuol. Uchovávání nitrátů ve vakuolách je důležité pro udržení osmotické rovnováhy a jako N-reserva.

V případě močoviny bylo zjištěno, že většina přijaté močoviny je ihned asimilována v kořenech podobně jako je tomu v případě amonných iontů, ale určitý

podíl přijaté močoviny je transportován do nadzemních částí aniž by předtím došlo k její hydrolýze ureázou v kořenech (Mérigout *et al.*, 2008).

2.2 Příjem živin listy

Z hlediska praktické výživy rostlin má nezanedbatelný význam příjem živin aplikovaných na povrch listu. Transportní systémy odpovědné za přenos jednotlivých forem N přes plasmatickou membránu jsou podobné transportérům izolovaným z kořenů. Hlavní rozdíly spočívají v odlišné anatomické stavbě listu a kořene.

Hlavní a základní úlohou listů je zajištění fotosyntézy, tedy zachycení maximálního kvanta fotosynteticky aktivního záření a přijetí potřebného množství CO₂ a to i při nízké vlhkosti vzduchu. Proto došlo u vyšších rostlin v průběhu evolučního vývoje k vytvoření ochranné struktury, která brání nekontrolovaným ztrátám vody - kutikuly.

Hlavní funkcí rostlinné kutikuly je ochrana rostlin proti nadměrným ztrátám vody, zároveň omezuje únik metabolitů z vnitřních pletiv a omezuje vstup znečišťujících látek z prostředí. Rostlinná kutikula ale zároveň představuje hlavní překážku pro látky, které jsou aplikovány na povrch listu, ať už se jedná o hnojiva nebo prostředky na ochranu rostlin.

2.2.1 Kutikula - bariéra pro vstup

Na povrchu listu se nachází pokožka (epidermis), která tvoří rozhraní mezi vnitřními pletivy listu a okolním prostředím. Její vnější povrch je pokryt kutikulou. Kutikula je hydrofóbní membrána složená z degradovatelného biopolymeru kutinu, nedegradovatelného polymeru kutanu a asociovaných rozpustných kutikulárních lipidů zvaných kutikulární vosky (Jenks a Ashworth, 2003). Vosky jsou převážně lineární, alifatické molekuly s dlouhým polymerním řetězcem a mohou být nalezeny jak na vnitřních částech kutinového polymeru (intrakutikulární vosky), tak na jeho povrchu (epikutikulární vosky). Právě kutikulární vosky jsou pravděpodobně hlavní transportní bariérou kutikulární membrány (Riederer a Schreiber, 2001; Richardson *et al.*, 2007). Struktura a složení kutikuly a kutikulárních vosků se liší mezi rostlinnými druhy, odrůdami i mezi jednotlivými orgány a v závislosti na vývojové fázi rostliny (Heredia-Guerrero *et al.*, 2008).

I když je kutikula převážně lipofilní povahy, jsou zde přítomny i hydrofilní struktury. Kutin obsahuje neesterifikované hydroxy- a karboxy- skupiny. A zároveň

byly ve velkém množství jako složky kutikulární membrány identifikovány polysacharidy jako pektin a celulóza, které mají vysokou hydratační kapacitu (Luque *et al.*, 1995).

Průnik látek do listu je pasivním procesem, který je řízen koncentračním gradientem. V současné době se předpokládá, že látky aplikované na list mohou prostupovat kutikulou 2 rozdílnými cestami v závislosti na své chemické podstatě, tedy buď lipofilní nebo polární cestou (Eichert a Goldbach, 2008). Voda a další malé nepolární molekuly (např. močovina) mohou pro prostup přes kutikulu využívat jak lipofilní tak polární cestu. Předpokládá se, že rychlost průchodu kutikulou je výrazně pomalejší u hydrofilních látek než u látek lipofilních.

2.2.1.1 Difúze lipofilní cestou

Syntetické látky jako pesticidy, herbicidy a jiná xenobiotika jsou většinou neiontové povahy a mnoho z těchto molekul je navíc lipofilních. Tyto látky mohou difundovat kutikulou tzv. lipofilní cestou, kdy míra propustnosti je charakterizována pohyblivostí dané molekuly v transportní bariéře (v závislosti na velikosti molekuly) a současně její rozpustností ve voskové vrstvě kutikuly (Schreiber, 2005). Propustnost kutikuly pro tyto látky je výrazně ovlivněna teplotou a použitím plastifikátorů (plasticizers) (Bauer *et al.*, 1997).

2.2.1.2 Difúze polární cestou

Naproti tomu polární a iontové sloučeniny (většina aplikovaných živin) využívají tzv. polární cestu přes kutikulární póry. Nabité molekuly nesou hydratační obal, kterého se nemůžou zbavit a tak nemůžou být rozpuštěny v lipofilní kutinové a voskové vrstvě kutikuly. Z toho plyne, že nabité sloučeniny musí využít pro difúzi alternativní cestu a předpokládá se, že procházejí polárními póry, které jsou vyplněné vodou a procházejí kutikulární membránou (Schönherr, 1976; Schönherr, 2000; Schönherr a Schreiber, 2004; Schreiber, 2005).

V kutikule je těchto hydrofilních pórů velké množství ($10^{10} \cdot \text{cm}^{-2}$), většinou o průměru do 1 nm. Předpokládá se však, že v bezprostředním okolí svěracích buněk průduchů a trichomů je jejich hustota vyšší a liší se i průměrem a propustností. Zároveň bylo zjištěno, že velikost pórů se liší mezi jednotlivými rostlinnými druhy (Eichert a Goldbach, 2008). Při příjmu anionového fluorescenčního barviva bylo zjištěno, že jeho průchod do listu je výhradně vázán na bezprostřední okolí svěracích

buněk, ale zapojeno bylo jen kolem 10 % všech průduchů. Toto procento se zvýšilo opakovaným vyschnutím a znovu zvlhčením roztoku aplikovaného na list. Dosud není zcela jasné, zda usnadnění „příjmu“ v okolí průduchů je způsobeno vyšší prostupností peristomatální kutikuly nebo zda difúze probíhá přímo skrz průduchovou štěrbinu v roztoku spojujícím povrch listu a listový mezofyl tím, že dojde k modifikaci buněčných stěn póru průduchu. Přesto není pochyb, že přítomnost průduchů usnadňuje příjem látek aplikovaných na povrch listu (Eichert a Burkhardt, 2001).

Difúze touto cestou není pravděpodobně ovlivněna teplotou (Schönherr, 2000). Je však výrazně ovlivněna vzdušnou vlhkostí (Schönherr, 2000; Schreiber, 2005). Vliv plastifikátorů je diskutabilní (Schönherr, 2000 a 2002).

2.3 Hnojení dusíkem

Zdvojnásobení celosvětové produkce potravin v posledních čtyřiceti letech bylo spojeno se 7-násobným nárůstem používaných dusíkatých hnojiv. Následkem toho byl výrazně zvýšen negativní vliv na fungování a diverzitu přírodních společenstev.

2.3.1 Základní hnojení

Základní podmínkou setrvalého rozvoje zemědělství je udržení nebo zlepšení půdní úrodnosti a ochrana životního prostředí před nežádoucím znečišťováním. Tomuto požadavku musí odpovídat i systémy výživy a hnojení polních plodin. Nerovnováha mezi požadavkem rostliny a dodávkou dusíku může vést buď k suboptimálnímu výnosu nebo k poškození životního prostředí nadbytkem hnojiva.

Určení základní dávky hnojiv vychází z množství (tzv. normativu) živin, které je potřebné k tvorbě požadovaného výnosu. Např. pro tvorbu 1 t potravinářské ozimé pšenice je zapotřebí 24,3 kg N, 4 kg P a 11,7 kg K. (Klír *et al.*, 2008). Toto normativní množství je dále upraveno podle skutečné zásoby živin v půdě, množství mineralizovatelných posklizňových zbytků předchozí plodiny a případného podílu živin uvolněných z předcházejícího hnojení organickými hnojivy. Dále se zohledňují půdní a klimatické podmínky stanoviště.

Aby došlo k rovnoměrnému rozdělení v půdním profilu, jsou potřebné živiny s výjimkou dusíku, to je P, K a Mg, aplikovány při základním zpracování půdy. Potřebné množství N je rozděleno do několika dílčích dávek, při čemž na podzim se nehnojí dusíkem vůbec nebo jen na půdách s nízkou zásobou minerálního N, kdy je

aplikováno menší množství N jako součást kombinovaných hnojiv, případně v síranu amonném.

První („regenerační“) dávka N v množství 30 – 60 kg /ha je aplikována na počátku jarní vegetace. Jejím účelem je poskytnutí snadno přístupného N pro obnovení růstu a dodání dostatečného množství N do půdního profilu pro příjem v pozdějších vývojových fázích. Pro regenerační hnojení je doporučována nitrátová forma hnojiv (většinou dusičnan vápenatý), ale vzhledem k vyšší ceně se běžně využívá levnější dusičnan amonný s vápencem či dolomitem, ale i močovina nebo hnojiva se sírou (např. DASA).

Následuje „produkční“ hnojení na počátku sloupkování (50 – 80 kg N/ha), které předchází období intenzivního růstu. Pro produkční hnojení je nejčastěji používán dusičnan amonný s vápencem (LAV), ale škála hnojiv je širší, zahrnuje i močovinu, DAM (tekuté hnojivo s dusíkem ve třech formách - nitrátové, amonné a amidové) a různé druhy kombinovaných hnojiv.

V závislosti na intenzitě pěstování může být použito ještě pozdní tzv. „kvalitativní“ hnojení (dávka zpravidla 30 kg N/ha) před koncem sloupkování.

Toto rámcové schéma je do značné míry modifikováno zásobou vody v půdě a průběhem konkrétních povětrnostních podmínek, zejména datem nástupu jarní vegetace, množstvím a rozdělením srážek a průměrnými teplotami vzduchu a půdy.

2.3.2 Využití listově aplikovaných hnojiv

V zemědělství je listová aplikace živin široce rozšířena a její význam stále vzrůstá díky možnosti cílené aplikace pouze potřebného množství, čímž je snížen negativní vliv na životní prostředí spojený s aplikací hnojiv do půdy. Zároveň umožňuje flexibilně reagovat na potřeby rostlin podle aktuálního stavu porostu a vnějších podmínek. Foliární aplikace se využívá jako doplněk k půdnímu hnojení a také jako možná alternativa v případech, kdy mají rostliny zvýšenou potřebu nebo v podmínkách nízké dostupnosti živin z půdy. V případě dusíku či draslíku však listová aplikace nikdy nemůže nahradit příjem z půdy.

Při listové aplikaci se většinou využívají relativně vysoké koncentrace živin a může tak hrozit poškození listů. Hlavním dusíkatým hnojivem používaným pro tyto aplikace je močovina, případně dusičnan vápenatý nebo hořečnatý.

V podmínkách přechodného klimatu a v důsledku nastupujících klimatických změn se stále častěji objevují období s dočasným nedostatkem srážek, kdy aplikace

hnojiv v pevné formě není efektivní, a jedinou možností jak poskytnout rostlinám nezbytné živiny včetně N je listová výživa. Dalším důvodem k efektivnímu použití listové aplikace N je zvýšení obsahu N látek v pletivech rostlin remobilizovatelných pro tvorbu zrna potravinářské pšenice v pozdních fázích vegetace. Z hlediska úspory nákladů se často používá společná aplikace listových hnojiv s prostředky na ochranu rostlin.

3. Cíl práce

Náplň disertační práce byla dána potřebou využít nové poznatky týkající se příjmu a využití dusíku rostlinami v aplikovaném zemědělském výzkumu. K aktuálním problémům současné rostlinné výroby patří zejména ochrana životního prostředí (povrchových a spodních vod) před vyplavováním nitrátů a dalších živin z půdního profilu a snížení nezbytných finančních nákladů na jednotku získané produkce bez negativního dopadu na kvalitu zrna. To je spojeno s vyšší efektivností využití živin pro tvorbu hospodářského výnosu pěstovaných plodin a, v případě výživy dusíkem, náhradou drahých nitrátových hnojiv levnějšími hnojivy s amonnou formou N nebo močovinou. Tyto cíle nelze uskutečnit bez dokonalé znalosti mechanismu příjmu a využití dusíku polními plodinami.

Hlavním cílem práce bylo určení vlivu amonné, nitrátové a amidové formy dusíkaté výživy na příjem dusíku kořeny a listy pšenice seté a jeho následné využití.

Řešení zvolené problematiky bylo rozděleno do následujících dílčích cílů:

1. Zjistit vliv nitrátové a amonné formy N a jejich kombinace na růst rostlin pšenice a charakterizovat rozdíly v metabolismu dusíku včetně odlišení vlivu nízkého pH na sledované charakteristiky.
2. Pomocí kinetických parametrů příjmu určit vnitrodruhové a mezidruhové rozdíly ve schopnosti přijímat a využívat nitrátovou a amonnou formu dusíku.
3. Určit rychlost příjmu a následnou translokaci jednotlivých forem dusíku a stanovit teplotní závislost jejich příjmu.
4. Získat nové poznatky o příjmu a využití různých forem dusíku při listové aplikaci a o následném pohybu přijatého dusíku uvnitř rostliny.
5. Určit efektivnost využití listově aplikované močoviny v pozdní fázi vývoje pro tvorbu zrna a stanovit vliv společné aplikace s prostředky na ochranu rostlin na její příjem a využití.

4. Metodika

Při zpracování této disertační práce bylo hodnoceno několik skupin pokusů dle jednotlivých dílčích cílů.

4.1 Rostlinný materiál

Pro základní pokusy v kontrolovaných podmínkách byla vybrána srovnávací odrůda jarní pšenice (*Triticum aestivum* L. cv. Munk). Osivo pocházelo z genové banky VÚRV, v.v.i. Obilky byly před pokusem desinfikovány 1% roztokem chloraminu po dobu 30 minut a poté důkladně propláchnuty destilovanou vodou. Poté byly obilky nechány přes noc na Petriho misce nabobtnat a následně 24 hodin při laboratorní teplotě naklíčit. Dále byly rostliny pěstovány v živném roztoku podle popisu u každého pokusu (viz níže).

4.2 Metody analýzy rostlinného materiálu

4.2.1 Stanovení obsahu celkového dusíku a dalších živin

Sušina byla rozemleta na jemný prášek. Do Kjeldahlovy spalovací baňky bylo naváženo 0,25 g vzorku a přidány 3 ml koncentrované kyseliny sírové s přídavkem selenu jako katalyzátoru. Vzorky byly mineralizovány v pískové lázni při teplotě 300 °C až do úplného odbarvení vzorku. Poté byl vzorek kvantitativně převeden do 0,1 l odměrné baňky a doplněn po risku destilovanou vodou.

Obsah celkového dusíku a fosforu v mineralizovaném vzorku byl stanoven spektrofotometricky na automatickém analyzátoru Skalar San Plus System (Breda, Nizozemí), obsah Ca, Mg a K byl stanoven pomocí ICP-OES Tracescan (Thermo Jarell Ash, Franklin, USA). Výsledek byl vyjádřen jako mg prvku na g suché hmotnosti ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW).

4.2.2 Stanovení obsahu nitrátů v čerstvé biomase

Zmrazené vzorky listů a kořenů (1 g) byly skladovány při teplotě -80 °C. Obsah nitrátů v rostlinách byl stanoven po homogenizaci a následné extrakci horkou destilovanou vodou. Koncentrace NO_3^- iontů byla stanovena po jejich redukci na NO_2^- převedením přes zrnitou měď-kadmiovou kolonu na automatickém analyzátoru

Scalar San Plus Systém (Breda, Nizozemí) spektrofotometricky při 540 nm. Výsledek je uváděn jako mg nitrátů na g čerstvé hmotnosti ($\text{mg NO}_3^- \cdot \text{N} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$).

4.2.3 Stanovení obsahu amonných iontů v čerstvé biomase

Vzorky listů (0,5 g) byly ihned po odběru zamraženy a uchovávány při teplotě $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Obsah amonných iontů v rostlinných extraktech byl stanoven upravenou metodou podle Cruz a Martins-Loução, (2000).

Vzorky byly homogenizovány v tekutém dusíku. Byl přidán 0,003 M citronan sodný v poměru 1 : 10. Homogenizovaný vzorek byl odstředěn po dobu 15 minut při 10 000 g a $4\text{ }^\circ\text{C}$. Získaný supernatant byl inkubován ve vodní lázni při $100\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 3 minut. Poté bylo přidáno aktivované dřevěné uhlí (50 mg na ml supernatantu). Vzorek byl protřepán a odstředěn po dobu 15 minut při 10 000 g a $4\text{ }^\circ\text{C}$. Získaný supernatant byl použit pro přímé stanovení koncentrace NH_4^+ iontů dle Rhine *et. al.*, (1998).

K 0,5 ml vzorku bylo přidáno 0,5 ml 0,17 M citrátového pufru (pH 7), promícháno a necháno 1 minutu reagovat. Poté přidáno 0,5 ml 2-fenyl-fenol-nitroprusidu, 0,25 ml fosfáto-hypochloridového pufru (pH 13) a 1 ml destilované vody. Jemně promícháno a necháno 45 minut reagovat při laboratorní teplotě. Výsledná barevná reakce byla stanovena spektrofotometricky při 660 nm. Jako standardní roztok pro kalibrační křivku byl použit síran amonný (200 mg NH_4^+/l). Výsledek je uváděn jako $\mu\text{g NH}_4^+ \cdot \text{N} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$.

4.2.4 Stanovení aktivity nitrát reduktázy

Vzorky listů (1 g) byly zmrazeny a skladovány při teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Aktivita nitrátreduktázy byla stanovena metodou *in vitro* podle Gaudinová, (1990).

Extrakce enzymu:

Homogenizace rostlinného materiálu byla provedena za chladu (teplota $4\text{ }^\circ\text{C}$) v 0,1 M TRIS - HCl pufru (pH 8) s přísadkou 3% BSA. Po rozetření vzorku v kapalném N_2 byl přidán pufr v poměru 1 : 5. Homogenizovaný vzorek byl odstředěn po dobu 30 min při 15 000 g a $4\text{ }^\circ\text{C}$. Získaný supernatant byl použit k přímému stanovení aktivity enzymu.

Inkubace enzymu:

K 0,15 ml enzymového extraktu bylo přidáno 0,5 ml 0,1 M fosfátového pufru (pH 7,5); 0,1 ml 0,1 M KNO₃ a 0,15 ml NADH⁺. Jako blank bylo použito 0,15 ml H₂O namísto enzymového extraktu. Po 10 minutové inkubaci při 25 °C ve vodní lázni byla enzymatická reakce zastavena přidávkem 0,1 ml 0,3% kyseliny oxaloctové.

Detekce nitritů:

Detekce vzniklých nitritů byla provedena měřením azobarviva vzniklého po přidání 1,0 ml 1% sulfanilamidu (v 1 M HCl) a 0,5 ml 0,02% naftyletylendiaminu k 1,0 ml vzorku při 540 nm. Jako standardní roztok pro kalibrační křivku byl použit 20 μM NaNO₂. Výsledek je prezentován jako koncentrace množství vzniklých nitritů na gram čerstvé hmoty za minutu (nmol NO₂⁻ g⁻¹ FW.min⁻¹).

4.2.5 Stanovení obsahu chlorofylu

Obsah chlorofylu byl stanoven upravenou metodou dle AOAC, 1990.

Zmrazené vzorky listů (0,3 g) byly převedeny do 50 ml Erlenmayerových baněk a opakovaně extrahovány 7 ml vroucího 80% ethanolu. Postup byl opakován do úplného odbarvení listů. Extrakty byly převedeny do 50 ml odměrné baňky a doplněny po rysku 80% ethanolu. Byla změřena absorbance získaných extraktů chlorofylu při 661 nm a 643,5 nm na spektrofotometru Beckmann DU - 530. Obsah chlorofylu v listech byl vypočten podle daného empirického vzorce:

$$\text{Chlorofyl a+b} = (7,12 \cdot A_{661} + 16,18 \cdot A_{643,5})$$

Obsah chlorofylu je vyjádřen jako mg chlorofylu na g čerstvé hmotnosti listu (mg Ch_{a+b}. g⁻¹FW).

4.2.6 Stanovení obsahu rozpustných bílkovin

Vzorky listů (0,6 g) byly po odběru zamrazeny a uchovávány do analýzy při -80 °C. Obsah rozpustných bílkovin byl stanoven dle Bradford, (1976).

Homogenizace rostlinného materiálu byla provedena za chladu (teplota 4°C) v 0,1 M TRIS - HCl pufru (pH 8). Po rozetření vzorku v kapalném N₂ byl přidán pufr v poměru 1 : 5. Homogenizovaný vzorek byl odstředěn po dobu 30 min při 15 000 g a 4°C. Získaný supernatant byl použit k přímému stanovení obsahu rozpustných bílkovin.

Reakční činidlo: Comassiova brilantová modř – 100 mg modři rozpuštěno v 50 ml 95% etanolu, přidáno 0,1 l 85% H₃PO₄, doplněno do 1 l destilovanou vodou a přefiltrováno.

Detekce rozpustných bílkovin:

K 0,1 ml vzorku bylo přidáno 5 ml reakčního činidla, promícháno a necháno 30 minut reagovat při laboratorní teplotě. Výsledná barevná reakce byla stanovena spektrofotometricky při 595 nm. Jako standardní roztok pro kalibrační křivku byl použit hovězí sérum albumin (1000 mg albuminu/l). Výsledek je uváděn jako mg rozpustných bílkovin na g čerstvé hmotnosti (mg g⁻¹FW).

4.2.7 Stanovení izotopového poměru ¹⁵N/¹⁴N a obsahu N

Odebrané vzorky rostlin byly standardně usušeny při 70 °C. Rozemlety na vibračním kulovém mlýnu MM 301 (Retsch) na velmi jemný homogenní prášek. Vzorek (1 – 3 mg) byl navážen do cínové kapsle. Vlastní stanovení bylo provedeno na elementárním analyzátoru EA 3200 (Eurovector, Itálie) spojeném s izotopovým hmotnostním spektrometrem Isoprime (GV Instruments, UK).

Analyzovaný vzorek je spálen v kyslíkové atmosféře a vzniklé spalné plyny jsou čištěny, redukovány a separovány v elementárním analyzátoru. Oddělené plyny (N₂ a CO₂) pak prochází izotopovým hmotnostním spektrometrem, kde při průletu magnetickým polem (ve vysokém vakuu) jsou dráhy jednotlivých izotopů odkloněny na základě jejich molekulové hmotnosti. Jednotlivé paprsky jsou zachyceny ve štěrbinách kolektoru a vyhodnoceny detektorem. Je určen celkový obsah N a C a izotopové složení v atom% ¹⁵N či ¹³C.

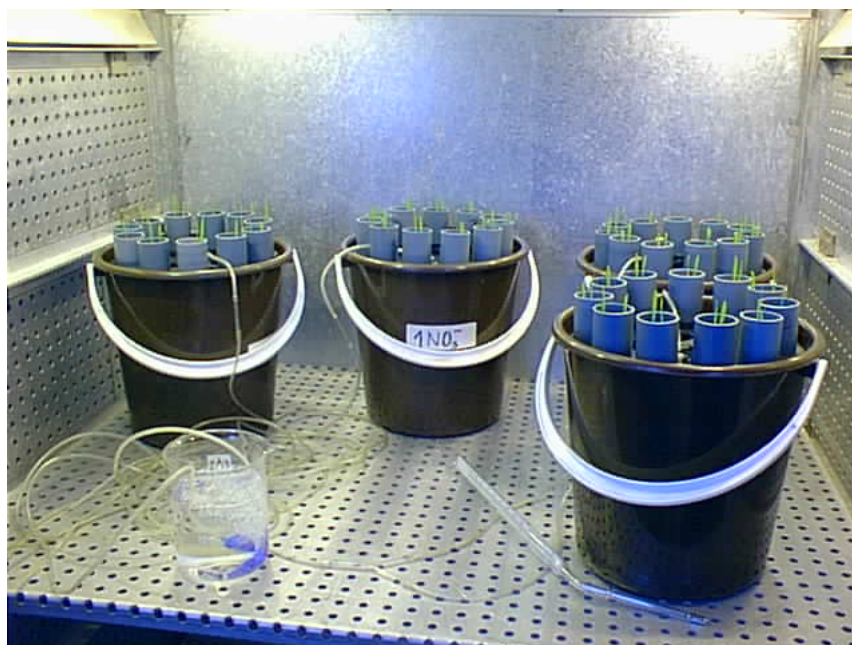
4.3 Zjištění rozdílů mezi nitrátovou, smíšenou a amonnou výživou

Byly provedeny 3 základní pokusy se stejným schématem uspořádání. Rostliny pšenice byly pěstovány v klimaboxu v živném roztoku v 10 l nádobách za standardních podmínek - fotoperioda 16 h světlo/8 h tma, (400 μmol.m⁻¹s⁻¹), teplotní režim 22/15 °C po dobu 3 týdnů. Kultivační roztok byl kontinuálně provzdušňován a měněn pravidelně ve dvoudenních intervalech. Během kultivace bylo měřeno pH v roztoku. Rostliny pšenice byly pěstovány ve třech variantách dusíkaté výživy – nitrátové, amonné a smíšené (poměr NO₃⁻ : NH₄⁺ byl 1 : 1). Obsah dusíku byl u všech variant 774 μmol.l⁻¹.

Koncentrace živin v roztoku:

- nitrátová výživa: 316 μM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 141.5 μM KNO_3 , 82.6 μM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 105 μM KH_2PO_4 , 95.2 μM KCl , 2.5 μM H_3BO_3 , 2.0 μM Fe-EDTA , 0.2 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 μM $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.05 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.007 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$
- smíšená výživa: 122.5 μM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 141.5 μM KNO_3 , 387 μM NH_4Cl , 82.6 μM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 105 μM KH_2PO_4 , 95.2 μM KCl , 193 μM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.5 μM H_3BO_3 , 2.0 μM Fe-EDTA , 0.2 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 μM $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.05 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.007 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$
- amonná výživa: 774 μM NH_4Cl , 82.6 μM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 105 μM KH_2PO_4 , 236.2 μM KCl , 316 μM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.5 μM H_3BO_3 , 2.0 μM Fe-EDTA , 0.2 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 μM $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.05 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.007 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$

U všech variant bylo pH živného roztoku upraveno na vstupní hodnotu 5,8 - 6,0
přídavkem 0,2 M NaOH.



Obr.4.1 Pohled na rostliny pšenice krátce po začátku kultivace.

4.3.2 Určení negativního vlivu nízkého pH

Pro odlišení negativního vlivu nízkého pH bylo v posledním pokusu udržováno pH u poloviny rostlin v nitrátové a amonné variantě výživy na zvolené konstantní hodnotě pomocí pH-statů 20 μM roztokem HCl či NaOH. U varianty nitrátové byla udržována nízká hodnota pH (4,4 - 4,6), u varianty amonné naopak hodnota pH vyšší (5,8 - 6,0). Hodnoty byly zvoleny podle předchozích měření, kdy rostliny přijímající amonné ionty okyselovaly živný roztok během dvou dnů na hodnoty pH $\leq 4,5$, a rostliny s nitrátovým zdrojem dusíku výchozí živný roztok slabě alkalizovaly (pH $\geq 6,1$).

4.3.3 Odběr vzorků rostlinného materiálu

Ve zvoleném stádiu 21 dní byly rostliny sklizeny. Byla oddělena nadzemní část a kořeny a rostliny byly zváženy. Část rostlin byla rozstříhána na malé segmenty a byly naváženy vzorky na stanovení obsahu nitrátů a amonných iontů v listech a kořenech a vzorky na stanovení obsahu chlorofylu a aktivity nitrát reduktázy v listech. Vzorky byly ihned po navážení zmrazeny a až do provedení analýzy byly uchovávány v mrazícím boxu při teplotě -20 či -80 °C. Zbylá část rostlin byla usušena při teplotě 70 °C a použita pro stanovení obsahu celkového dusíku a dalším živin.

4.4 Určení vnitrodruhových a mezidruhových rozdílů v rychlosti příjmu jednotlivých forem dusíku

Pro stanovení kinetických parametrů charakterizujících vysokoafinitní transportní systém, který zajišťuje příjem nitrátů či amonných iontů bylo vybráno dvanáct moderních odrůd dvou druhů jarní pšenice (*Triticum aestivum* a *Triticum durum*) (Tab. 4.1). Rostliny vybraných odrůd byly předpěstovány po dobu 3 týdnů v hydroponické kultuře za standardních podmínek (fotoperioda 16/8 hodin den/noc, teplotní režim 22/15 °C) v kultivační místnosti ve 200 litrových vanách. Živný roztok byl kontinuálně provzdušňován a měněn 2-3 týdně. Rostliny byly pěstovány ve dvou variantách výživy – amonné a nitrátové. Koncentrace dusíku byla v obou variantách výživy snížena na 387 μM při současném zachování poměru N k ostatním živinám.

Koncentrace živin v roztoku:

- nitrátová výživa: 157.9 μM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 70.8 μM KNO_3 , 41.3 μM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 52.5 μM KH_2PO_4 , 47.6 μM KCl , 1.25 μM H_3BO_3 , 1.0 μM Fe-EDTA , 0.1 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 μM $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.025 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.004 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$
- amonná výživa: 387 μM NH_4Cl , 41.3 μM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 52.5 μM KH_2PO_4 , 118.4 μM KCl , 158 μM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.25 μM H_3BO_3 , 1.0 μM Fe-EDTA , 0.1 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 μM $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.025 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.004 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$

U obou variant bylo pH živného roztoku upravováno na hodnotu 5,8 - 6,0 přidávkem 0,2 M NaOH.

Tab. 4.1 Seznam vybraných odrůd.

Odrůda	Botanická varieta	Země původu
<i>Triticum aestivum</i>		
Roxo	<i>graecum</i>	Portugalsko
AC Read	<i>graecum</i>	Kanada
Pacifik	<i>lutescens</i>	Kanada
Munk	<i>lutescens</i>	Německo
Sandra	<i>aestivum</i>	Česko
<i>Triticum durum</i>		
Zenit	<i>leucomelan</i>	Itálie
Marmilla	<i>leucomelan</i>	Itálie
Saadi	<i>leucomelan</i>	Francie
Kharkovskaya 21	<i>hordeiforme</i>	Ukrajina
Lyudmila	<i>hordeiforme</i>	Rusko
Valbelice	<i>leucurum</i>	Itálie
Mojo 2	<i>melanopus</i>	Mexiko

Současně s měřením rychlosti příjmu byla část rostlin sklizena pro stanovení obsahu celkového dusíku v sušině a obsahu amonných iontů v čerstvé biomase, u nitrátové varianty byly navíc odebrány vzorky na stanovení aktivity nitrát reduktázy a obsahu nitrátů v čerstvé biomase.

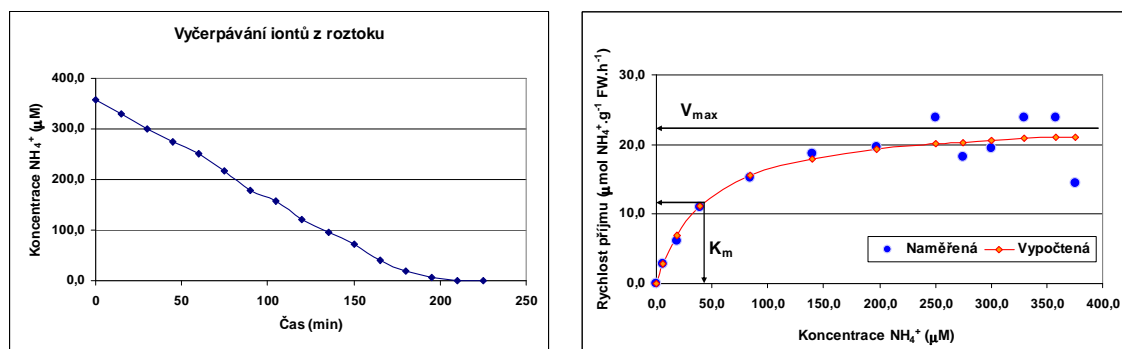
4.4.2 Stanovení kinetiky příjmu nitrátových či amonných iontů

Po třech týdnech pěstování byly rostliny přemístěny na několik hodin do živného média bez dusíku. Před vlastním měřením pak byly ponechány 30 minut v roztoku se stejnou koncentrací N jako měřicí roztok pro odstranění indukce.

Rychlost příjmu amonných a nitrátových iontů byla určena z jejich úbytku z živného roztoku.

Jednotlivé pokusné rostliny byly přemístěny do nádob o objemu 250 ml s čerstvým živným roztokem, který byl kontinuálně provzdušňován a míchán. Živný roztok obsahoval 250 μM NO_3^- či NH_4^+ . V pravidelných intervalech (15 minut) byly automaticky odebírány vzorky pro stanovení koncentrace nitrátů a amonných iontů.

Koncentrace NO_3^- iontů byla stanovena na automatickém analyzátoru Skalar San Plus System (Breda, Nizozemí) po jejich redukci na NO_2^- převedením přes zrnitou měď-kadmiovou kolonu. Obsah NO_2^- iontů byl stanoven měřením zabarvení vzniklého reakcí s sulfanilamidem a dichlor- α -naftylethylendiaminem při 540 nm. Koncentrace amonných iontů byla stanovena spektrofotometricky při 660 nm (viz výše). Rychlost příjmu byla vyjádřena jako $\mu\text{mol NH}_4^+$ nebo NO_3^- na g čerstvé hmotnosti kořene za hodinu ($\mu\text{mol NO}_3^-$ či $\text{NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}\cdot\text{h}^{-1}$). Parametry V_{max} a K_m byly určeny nelineární regresí pomocí programu Enzfiter (Biosoft, UK) (Graf 4.1).



Graf. 4.1 Princip určení kinetických parametrů – V_{max} a K_m .

4.5 Pokusy s použitím značených ^{15}N substrátů

4.5.1 Určení rychlosti příjmu a následné translokace N přijatého z jeho jednotlivých forem

Pokusné rostliny (*Triticum aestivum* cv. Munk) byly předpěstovány po dobu tří týdnů za standardních podmínek ve třech variantách výživy – nitrátové, amonné a smíšené. Koncentrace dusíku byla v posledním týdnu snížena na $155\ \mu\text{M}$. Po třech týdnech byly rostliny přeneseny do živného roztoku obsahujícího $300\ \mu\text{M}$ N, kde byly ponechány 30 minut. Poté byla polovina rostlin z každé varianty dána do ^{15}N nabohaceného roztoku ($\text{Ca}(^{15}\text{NO}_3)_2$ či $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}_2$) a polovina do roztoku kontrolního. U smíšené varianty výživy byly rostliny dány do roztoku, kde byl dusík přítomen ve formě dusičnanu amonného. Značený pomocí ^{15}N byl buď nitrátový nebo amonný iont. Rostliny byly rozděleny mezi oba značené roztoky a roztok kontrolní. Rostliny byly sklizeny po 1 a 2 hodinách inkubace, opláchnuty chladným ($\pm 4\ ^\circ\text{C}$) neznačeným roztokem, rozděleny na jednotlivé části, zváženy a usušeny. Rychlost příjmu a translokace jednotlivých forem byla vypočtena z množství přijatého ^{15}N do rostliny.

4.5.2 Určení teplotní závislosti příjmu jednotlivých forem dusíku

Pokusné rostliny (*Triticum aestivum* cv. Munk) byly pěstovány po dobu tří týdnů hydroponicky za standardních podmínek ve 200 l vanách v nitrátové variantě výživy. Čtvrtý týden kultivace byla rostlinám snížena teplota na $15\ ^\circ\text{C}$ den/ $10\ ^\circ\text{C}$ noc a upraven živný roztok, tak že obsahoval $\frac{1}{4}\ \text{NH}_4^+ + \frac{3}{4}\ \text{NO}_3^-$ nebo $\frac{1}{4}\ \text{CO}(\text{NH}_2)_2 + \frac{3}{4}\ \text{NO}_3^-$ a odpovídající množství ostatních živin. Po čtyřech týdnech kultivace byl měřen příjem jednotlivých N-forem a jejich translokace z kořenů v závislosti na teplotě v kořenové zóně.

Rostliny byly nejprve aklimatizovány po dobu 10 minut v odpovídajícím neznačeném živném roztoku s danou teplotou ($5, 10, 15$ a $20\ ^\circ\text{C}$). Poté byly rostliny přemístěny do $0,3\ \text{l}$ měřicího roztoku, který obsahoval $250\ \mu\text{M}$ ^{15}N v jedné ze tří různých forem - $\text{Ca}(^{15}\text{NO}_3)_2$, $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}_2$ nebo $\text{CO}(^{15}\text{NH}_2)_2$. Část rostlin byla použita jako kontrola a inkubována v neznačeném roztoku. Teplota živného média byla udržována pomocí termostatizované vodní lázně na požadované hodnotě $\pm 0,5\ ^\circ\text{C}$.

Rostliny byly sklizeny po 1 a 2 hodinách, promyty po dobu 5 min v chladném neznačeném roztoku, rozděleny na nadzemní část a kořeny, zváženy a usušeny. Rychlost příjmu a následná translokace N přijatého z jednotlivých forem (NO_3^- , NH_4^+ a $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) v závislosti na teplotě byla vypočtena z obsahu ^{15}N v rostlině.

4.6 Pokusy s listově aplikovanými ^{15}N značenými substráty

4.6.1 Určení příjmu a následné translokace jednotlivých forem dusíku při listové aplikaci

Pokusné rostliny (*Triticum aestivum* cv. Munk) byly pěstovány po dobu čtyř týdnů hydroponicky za standardních podmínek ve 200 l vanách v nitrátové variantě výživy. Následně byla provedena listová aplikace. Způsob listové aplikace jednotlivých forem N byl zvolen tak, aby umožnil alespoň semikvantitativní hodnocení jejich příjmu a následné distribuce mezi jednotlivé orgány rostlin.

Na bázi čepele nejmladšího plně vyvinutého listu bylo aplikováno 2x 5 μl 5% roztoku značené močoviny nebo 2x 5 μl odpovídající koncentrace nitrátové či amonné formy N. Ve vhodně zvolených časových intervalech byly pokusné rostliny sklizeny. Nejdříve byl opatrně odstřižen exponovaný list nejméně 1cm nad místem aplikace a poté odstraněna zbývající část listové čepele. Rostlina byla opláchnuta destilovanou vodou, osušena, zvážena a rozdělena na jednotlivé části. Příjem dané formy dusíku (NO_3^- , NH_4^+ a $-\text{NH}_2$) a následná translokace byly zjištěny z obsahu ^{15}N v jednotlivých částech rostliny.

4.6.2 Určení efektivity využití listově aplikované močoviny v pozdní fázi vývoje pro tvorbu zrna a stanovení možného vlivu přípravků na ochranu rostlin při společné aplikaci na její příjem a využití

Pro pokus v polních podmínkách byla použita ozimá pšenice (*Triticum aestivum* L. cv. Nela) pěstovaná na pozemcích VÚRV, v.v.i. v Praze Ruzyni. Ve fázi metání (BBCH 52) (Lancashire *et al.*, 1991) byla označena stébla ve stejné vývojové fázi. Dvě hodiny před aplikací močoviny byla polovina rostlin ošetřena fungicidním přípravkem Tango Super.

Na bázi praporcového listu označených rostlin byl aplikován 5% roztok ^{15}N -značené močoviny. Rostliny byly sklizeny po 24 hodinách, 4 a 11 dnech a ve sklizňové zralosti. Sklizeno bylo vždy 15 označených rostlin. Rostliny byly rozděleny na praporcové listy, jejich pochvy, 1.internodium, klas a zbytek rostliny. Ve stejných termínech bylo také sklizeno 15 praporcových listů z neoznačených rostlin pro stanovení aktivity nitrát reduktázy a obsahu rozpustných bílkovin. Rozdíl v příjmu a translokaci močoviny mezi ošetřenými a neošetřenými rostlinami byl zjištěn z obsahu ^{15}N v jednotlivých částech rostlin a zároveň byl stanoven podíl přijatého dusíku využitého pro tvorbu zrna.

4.7 Statistické zpracování výsledků

Statistické hodnocení bylo provedeno statistickým programem STATGRAPHICS Plus 4.0. Byl využit Tukey test na 0,05% hladině významnosti. Statisticky významné rozdíly jsou v tabulkách a grafech znázorněny příslušnými písmeny (a, b, c, ...). Dále jsou uváděny statistické parametry analýzy rozptylu: P (dosažená hladina významnosti), F (poměr nestranných odhadů společného rozptylu σ^2 – testová statistika) a Df (počet stupňů volnosti).

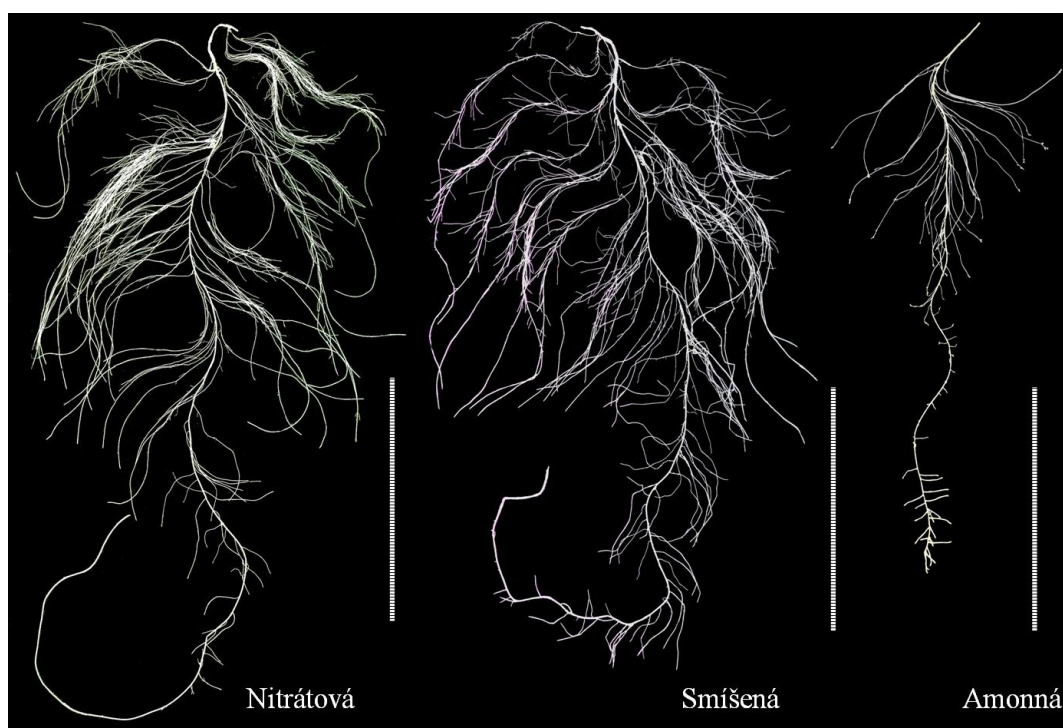
5. Výsledky

5.1 Zjištění rozdílů mezi nitrátovou, smíšenou a amonnou výživou

V základních pokusech byly rostliny kultivovány v živném roztoku, který obsahoval 774 μM dusíku ve třech variantách dusíkaté výživy – čistě nitrátové, smíšené (1:1) a čistě amonné. Byly sledovány rozdíly v růstu, obsahu esenciálních prvků a vybraných ukazatelích dusíkatého metabolismu v závislosti na formě dusíku přítomného v živném médiu.

5.1.1 Morfologické rozdíly

Po třítydenní kultivaci byly u rostlin pšenice pozorovány značné rozdíly v růstu a produkci biomasy v závislosti na formě dodávaného dusíku. Rostliny z amonné varianty měly výrazně nižší produkci biomasy kořenů, kořeny byly výrazně kratší a méně větvené v porovnání s oběma dalšími variantami (Tab. 5.1, Obr. 5.1). U rostlin ze smíšené varianty byla zaznamenána průkazně vyšší produkce biomasy nadzemní části.

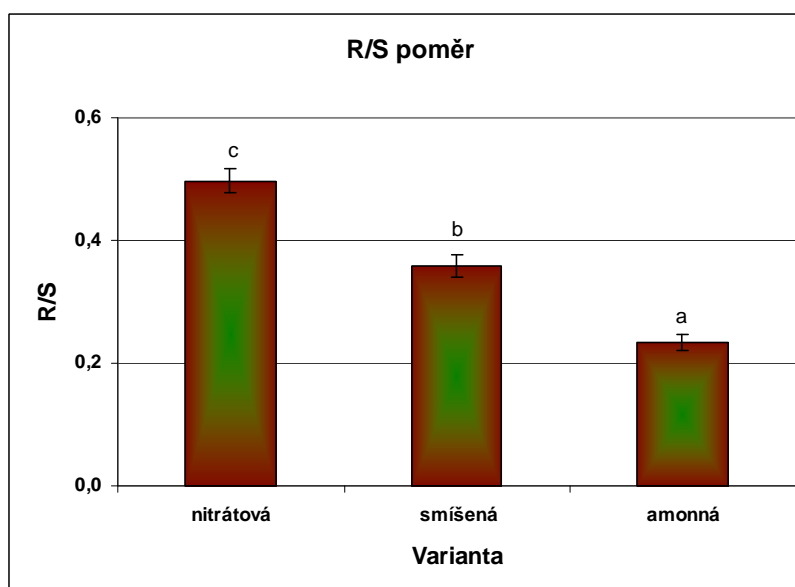


Obr.5.1 Typický vzhled seminálních kořenů pšenice po 3-týdenní kultivaci ve třech variantách N-výživy. Měřítka představují 10 cm.

Tab. 5.1 Hmotnost sušiny (g) pšenice po 3-týdenní kultivaci ve třech variantách N-výživy. Průměr ± SD; P=0,05; statistické hodnocení červeně.

Varianta	DW kořenů (g) (P=0,0002; F=18,75; Df=14)	DW NČ (g) (P=0,0002; F=18,15; Df=14)
Nitrátová	0,189±0,021 b	0,433±0,055 a
Smíšená	0,173±0,024 b	0,543±0,017 b
Amonná	0,112±0,007 a	0,383±0,034 a

Tyto změny v růstu se projeví i v rozdílech v R/S poměru, kdy nejvyšší R/S poměr byl zjištěn u rostlin z nitrátové varianty, ve smíšené variantě byl poměr nižší díky větší biomase nadzemní části a u rostlin z amonné varianty nedosahoval ani poloviční hodnoty v porovnání s nitrátovou variantou vzhledem k omezenému růstu kořenů (Graf 5.1).

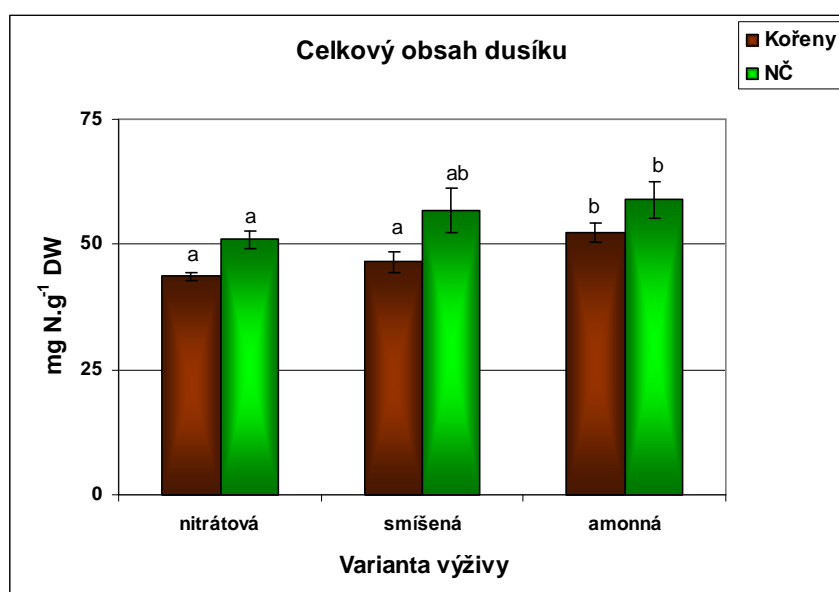


Graf. 5.1 R/S poměr u rostlin pšenice po 3-týdenní kultivaci ve třech variantách N-výživy. Průměr ± SD; (P=0,0001; F=233,9; Df=14).

5.1.2 Rozdíly v obsahu dusíku

Statisticky průkazné rozdíly mezi jednotlivými variantami N-výživy byly zjištěny v obsahu celkového dusíku v sušině rostlin (Graf. 5.2). Rostliny přijímající amonné ionty jako jediný zdroj dusíku měly největší obsah dusíku jak v nadzemních částech, tak i v kořenech (58,9 případně 52,5 mg N.g⁻¹ DW). U nitrátové varianty výživy byl obsah N výrazně nižší (50,9 případně 43,6 mg N.g⁻¹ DW). U rostlin ze smíšené varianty výživy byl obsah dusíku v nadzemních částech vyšší než u rostlin

živých samotným nitrátem, zároveň však nižší než u rostlin z amonné varianty. Obsah v kořenech se příliš nelišil od nitrátové varianty.



Graf. 5.2 Obsah celkového dusíku u rostlin pšenice po 3-týdenní kultivaci ve třech variantách N-výživy. Průměr ± SD; ($P=0,0001$; $F= 36,02$; $Df=17$ pro kořeny, $P=0,0078$; $F=6,82$; $Df=17$ pro NČ).

5.1.3 Rozdíly v obsahu esenciálních prvků

V závislosti na formě přijímaného dusíku byl výrazně ovlivněn i příjem a tím obsah dalších esenciálních kationů (K^+ , Mg^{2+} a Ca^{2+}). Příjem amonného iontu jako jediného zdroje dusíku výrazně negativně ovlivnil obsah těchto kationů a to jak v nadzemních částech tak i kořenech rostlin pšenice (Tab. 5.2). Obsah draslíku a hořčíku v kořenech dosahoval jen 30 % obsahu stanovenému u rostlin z nitrátové varianty výživy, v případě vápníku to byla necelá polovina. Obsah v nadzemních částech dosahoval 60 % u K, 45 % u Mg a pouze 40 % u Ca.

Negativní vliv přijímaného amonného iontu na obsah těchto kationů nebyl zcela potlačen ani přítomností nitrátů v živném médiu. Rostliny ve smíšené variantě výživy obsahovaly také významně méně K, Mg a Ca. V porovnání s nitrátovou variantou výživy jejich obsah dosahoval přibližně 75, 50 a 65 % v kořenech a 90, 75 a 75 % v listech.

Tab. 5.2 Obsah esenciálních prvků u rostlin pšenice (*Triticum aestivum*) po 3-týdenní kultivaci ve třech variantách N-výživy. Průměr ± SD; P=0,05; statistické hodnocení červeně.

Varianta	P (mg P.g ⁻¹ DW)		K (mg K.g ⁻¹ DW)	
	Kořeny (P=0,0151; F=6,07; Df=14)	NČ (P=0,0001; F=34,21; Df=14)	Kořeny (P=0,0001; F=103,77; Df=11)	NČ (P=0,0001; F=116,52; Df=14)
Nitrátová	6,56±0,78 a	9,03±0,75 b	52,16±4,82 c	53,09±3,05 c
Smíšená	8,38±1,22 b	8,77±0,93 b	40,09±2,36 b	47,52±0,92 b
Amonná	6,10±0,77 a	5,71±0,34 a	15,39±1,29 a	32,28±0,88 a
Varianta	Ca (mg Ca.g ⁻¹ DW)		Mg (mg Mg.g ⁻¹ DW)	
	Kořeny (P=0,0001; F=21,37; Df=14)	NČ (P=0,0001; F=162,42; Df=16)	Kořeny (P=0,0001; F=35,73; Df=12)	NČ (P=0,0001; F=35,01; Df=14)
Nitrátová	2,05±0,29 b	4,15±0,28 c	2,07±0,33 b	2,21±0,35 c
Smíšená	1,38±0,22 a	3,19±0,08 b	1,08±0,19 a	1,62±0,12 b
Amonná	0,95±0,22 a	1,66±0,23 a	0,66±0,11 a	1,04±0,10 a

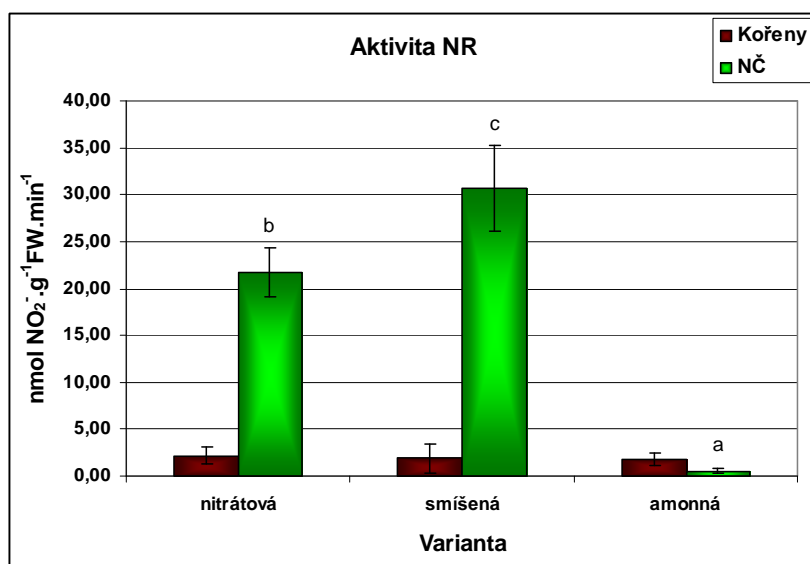
Vliv formy přijímaného dusíku na obsah fosforu, jakožto esenciálního anionu byl méně výrazný. Obsah fosforu v kořenech byl vyšší u rostlin přijímajících obě formy dusíku a výrazně nižší v listech rostlin z amonné varianty (Tab. 5.2).

5.1.4 Rozdíly v aktivitě nitrát reduktázy a obsahu nitrátů a amonných iontů

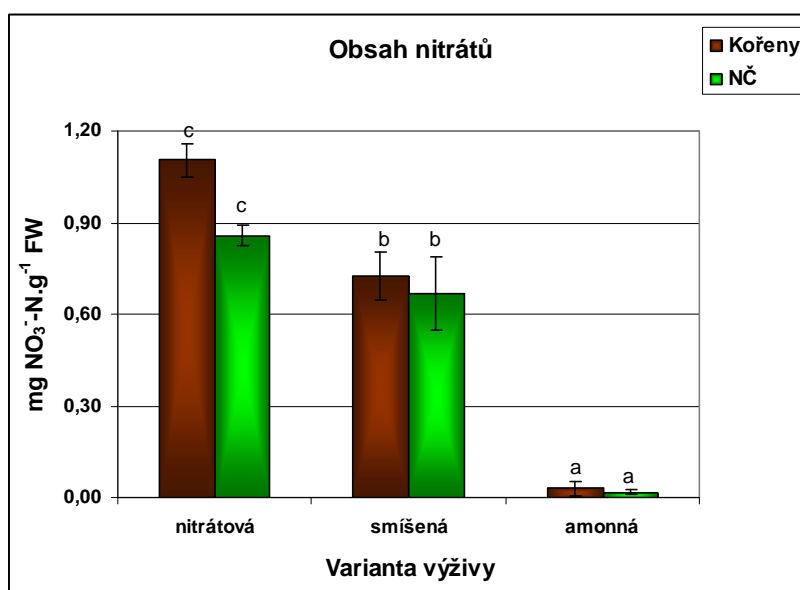
Jako základní parametry charakterizující dusíkatý metabolismus byly vybrány aktivita nitrát reduktázy, obsah nitrátů a obsah amonných iontů v pletivech.

Stanovená aktivita NR v kořenech pokusných rostlin pšenice byla velmi nízká a nelišila se mezi variantami N-výživy. V listech byla zjištěná aktivita NR vyšší u rostlin ze smíšené varianty (30,66 nmol NO₂⁻.g⁻¹FW. min⁻¹) než z varianty nitrátové (21,71 nmol NO₂⁻.g⁻¹FW. min⁻¹). U amonné varianty byla zjištěna jen bazální úroveň aktivity (Graf. 5.3).

Obsah nitrátů byl nejvyšší v pletivech rostlin s čistě nitrátovou výživou. Ve smíšené variantě byl obsah významně nižší a to jak v kořenech tak listech. U všech variant byl zjištěn vyšší obsah nitrátů v kořenech (Graf. 5.4).

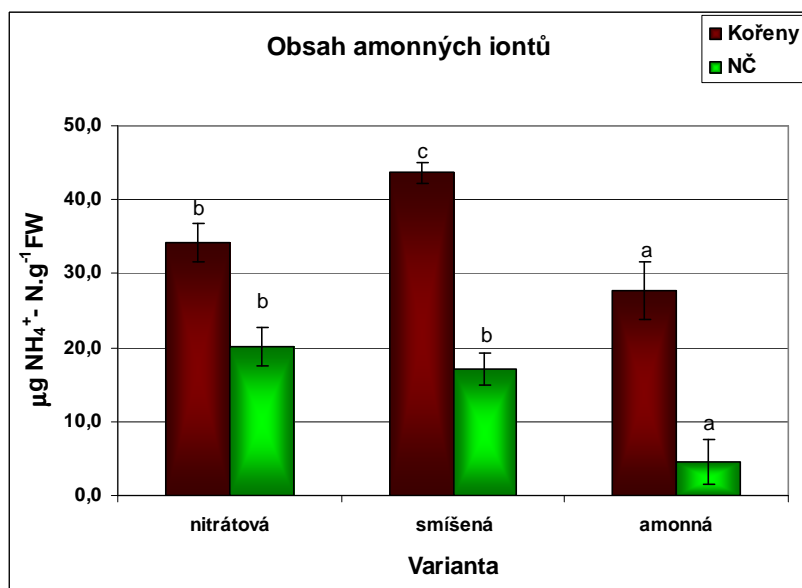


Graf. 5.3 Aktivita NR v pletivech rostlin pšenice po 3-týdenní kultivaci ve třech variantách N-výživy. Průměr ± SD; ($P=0,9030$; $F= 0,10$; $Df=15$ pro kořeny, $P=0,0001$; $F=71,84$; $Df=14$ pro NČ).



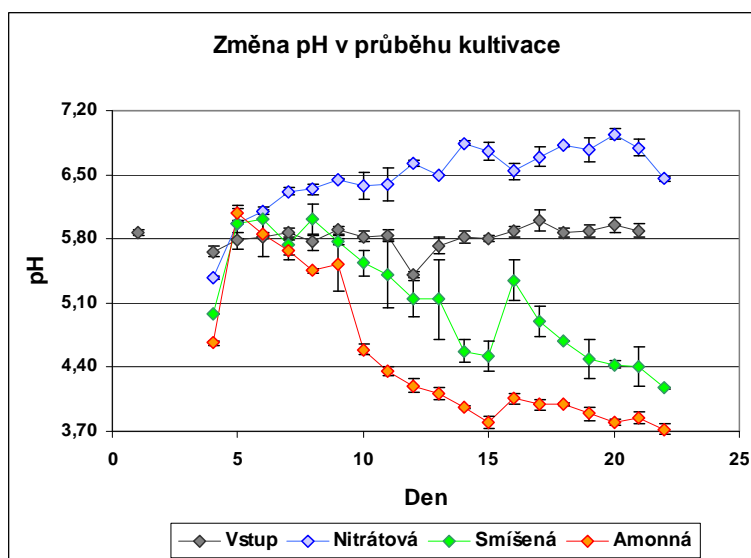
Graf. 5.4 Obsah nitrátů v kořenech a NČ rostlin pšenice po 3-týdenní kultivaci ve třech variantách N-výživy. Průměr ± SD; ($P=0,0001$; $F= 265,21$; $Df=11$ pro kořeny, $P=0,0001$; $F=113,58$; $Df=11$ pro NČ).

Také obsah amonných iontů byl u všech variant výrazně vyšší v kořenech než v listech. Největší obsah amonných iontů v kořenech byl nalezen u rostlin ze smíšené varianty. Obsah v listech byl pak výrazně nižší u rostlin z amonné varianty v porovnání s oběma zbývajících variantami (Graf.5.5).



Graf. 5.5 Obsah amonných iontů v kořenech a NČ rostlin pšenice po 3-týdenní kultivaci ve třech variantách N-výživy. Průměr ± SD; ($P=0,0001$; $F= 28,29$; $Df=14$ pro kořeny, $P=0,0001$; $F=39,37$; $Df=15$ pro NČ).

Během kultivace byla sledována hodnota pH kultivačního roztoku (Graf 5.6). U amonné i smíšené varianty byl pozorován pokles pH. S nárůstem biomasy a jemu odpovídající větší rychlostí příjmu byl pokles pH během dvou dnů mezi výměnami živného roztoku výraznější. Po třítydenní kultivaci okyselovaly rostliny pšenice v amonné variantě výživy živný roztok během dvou dnů až na hodnoty $pH \leq 4$. U nitrátové varianty byla zjištěna slabá alkalizace živného roztoku.



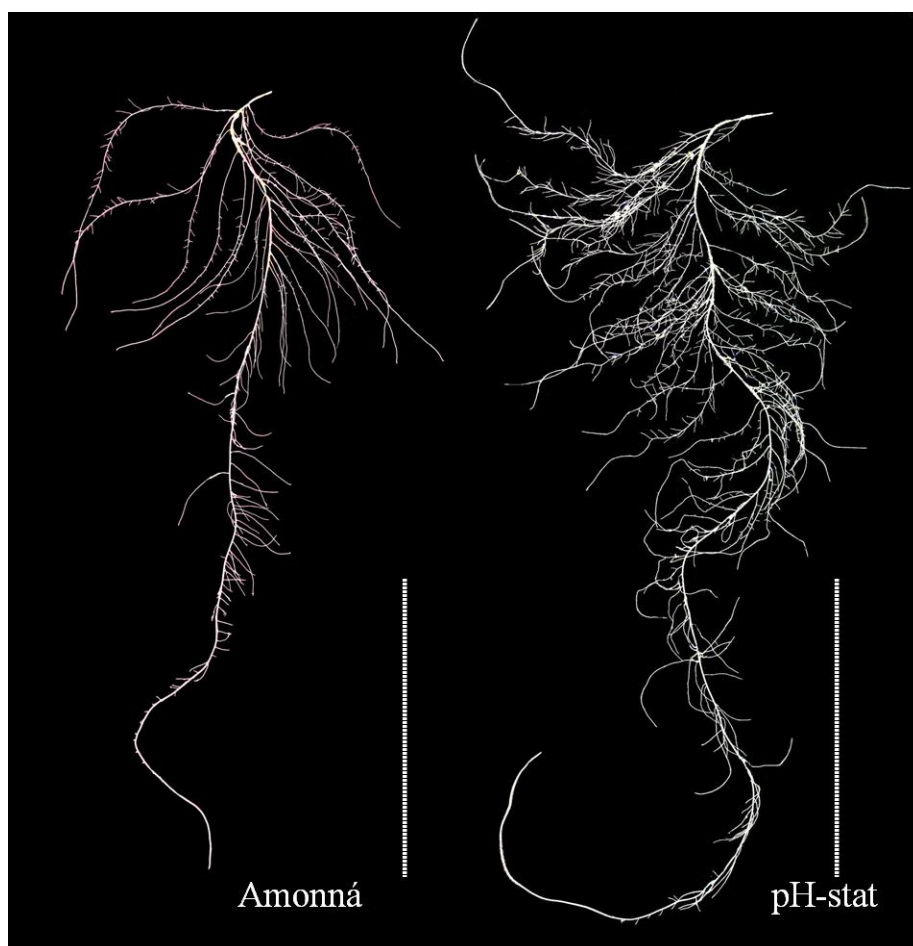
Graf. 5.6 Změny pH v průběhu třítydenní kultivace rostlin pšenice ve třech variantách dusíkaté výživy. Průměr ± SD.

5.2 Určení negativního vlivu nízkého pH

Pro možné odlišení vlivu nízkého pH na zkoumané charakteristiky byl za stejných kultivačních podmínek proveden pokus, kdy bylo pH v roztoku udržováno na zvolené hodnotě. U amonné varianty výživy to byla vyšší hodnota pH (5,8 - 6,0) a u nitrátové varianty výživy naopak nižší hodnota pH (4,4 - 4,6).

5.2.1 Morfologické rozdíly

Porovnání rostlin pěstovaných v amonné variantě výživy s různým pH ukázalo, že u rostlin, kde bylo udržováno vyšší pH došlo k částečnému potlačení negativní reakce na NH_4^+ . Byla zjištěna výrazně vyšší produkce biomasy kořenů a s tím související zvýšení R/S poměru. Produkce biomasy nadzemní části nebyla ovlivněna (Obr. 5.2; Tab. 5.3;).



Obr.5.2 Typický vzhled seminálních kořenů pšenice po 3-týdenní kultivaci v amonné variantě výživy; pH-stat – pH stabilizováno na hodnotě 5,8 - 6,0, amonná - bez stabilizovaného pH. Měřítka představuje 10 cm.

Tab. 5.3 Hmotnost sušiny (g) a R/S poměr u rostlin pšenice po třítydenní kultivaci v amonné variantě výživy (amonná - bez stabilizovaného pH; pH-stat – pH stabilizováno na hodnotě 5,8 - 6,0). Průměr ± SD.

Varianta	DW kořenů (g)	DW NČ (g)	R/S poměr
Amonná	0,073±0,010	0,323±0,036	0,224±0,010
pH-stat	0,120±0,027	0,304±0,058	0,394±0,053

U rostlin pěstovaných v nitrátové variantě výživy nebyly pozorovány významné změny v produkci biomasy kořenů či nadzemní části ani změny v R/S poměru v reakci na snížené pH.

5.2.2 Rozdíly v obsahu dusíku

Byly zjištěny změny v obsahu dusíku v sušině kořenů u rostlin z amonné výživy. U rostlin s vyšším pH kultivačního roztoku byl obsah dusíku výrazně nižší v porovnání s rostlinami, kterým nebylo pH regulováno (Tab. 5.4). Obsah dusíku v listech nebyl ovlivněn.

U rostlin, kde byl nitrát jediným zdrojem N nemělo nízké pH na obsah dusíku v kořenech ani v listech žádný vliv (Tab.5.5).

Tab. 5.4 Obsah dusíku a fosforu u rostlin pšenice po 3-tydenní kultivaci v amonné variantě výživy; pH-stat – pH po celou dobu kultivace stabilizováno na hodnotě 5,8 - 6,0. Průměr ± SD; P=0,05; statistické hodnocení červeně.

Varianta	N (mg N.g-1 DW)		P (mg P.g-1 DW)	
	Kořeny (P=0,0012; F=33,55; Df =7)	NČ (P=0,3508; F=1,02; Df =7)	Kořeny (P=0,1410; F=2,87; Df =7)	NČ (P=0,0480; F=6,14; Df =7)
Amonná	52,53±1,54 b	56,80±2,77	6,63±0,59	7,63±0,23 a
pH-stat	46,90±0,69 a	54,93±1,61	7,56±0,74	9,21±1,08 b

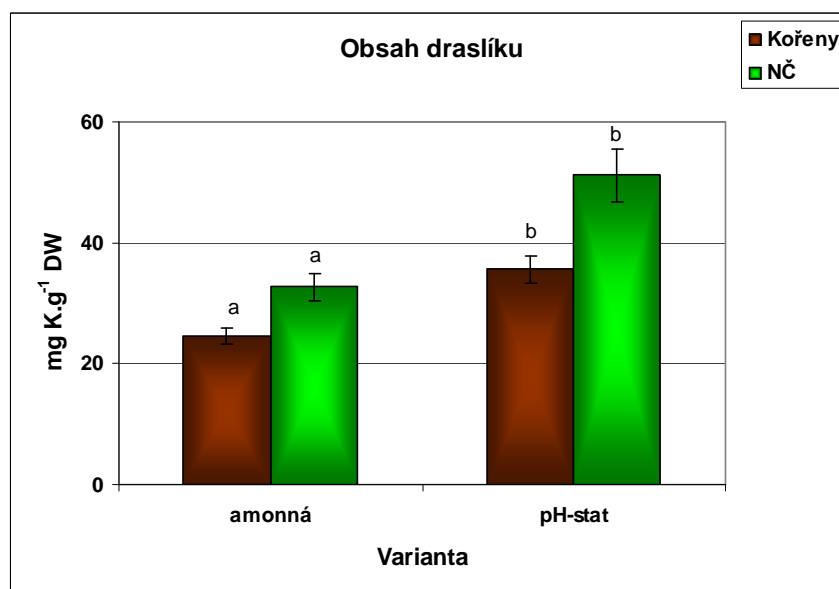
Obsah fosforu byl nízkým pH ovlivněn negativně. U amonné varianty výživy byl stanovený obsah fosforu vyšší u rostlin se stabilizovaným vyšším pH kultivačního roztoku a podobně u nitrátové varianty byl výrazně vyšší obsah fosforu u rostlin, kterým nebylo pH uměle snižováno a to jak v listech tak v kořenech (Tab. 5.4; 5.5).

Tab. 5.5 Obsah dusíku a fosforu u rostlin pšenice po 3-týdenní kultivaci v nitrátové variantě výživy; pH-stat – pH po celou dobu kultivace stabilizováno na hodnotě 4,4 - 4,6. Průměr ± SD; P=0,05; statistické hodnocení červeně.

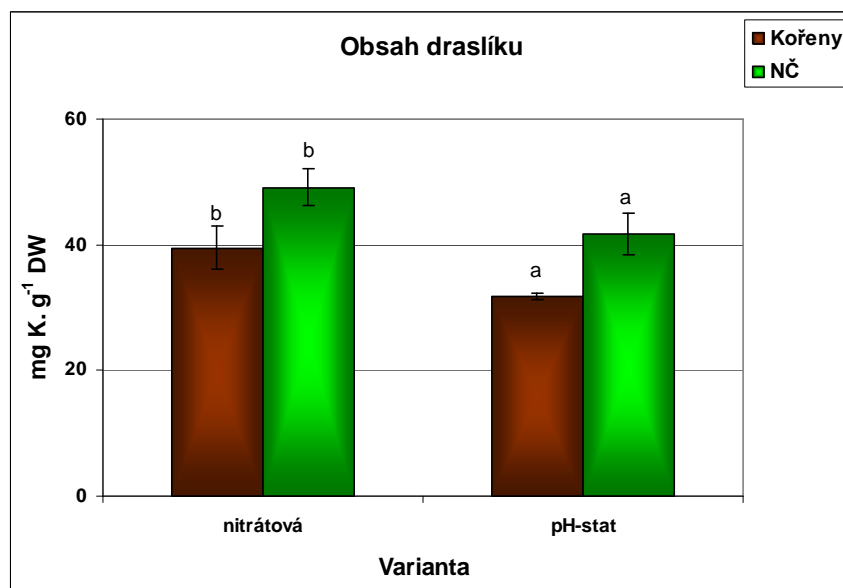
Varianta	N (mg N.g ⁻¹ DW)		P (mg P.g ⁻¹ DW)	
	Kořeny (P=0,6652; F=0,20; Df =9)	NČ (P=0,1015; F=3,42; Df =9)	Kořeny (P=0,0059; F=13,79; Df =9)	NČ (P=0,0036; F=16,47; Df =9)
Nitrátová	43,52±1,62	47,08±1,32	6,25±0,41 b	8,43±0,26 b
pH-stat	43,98±1,22	45,26±1,44	4,79±0,67 a	7,17±0,56 a

5.2.3 Rozdíly v obsahu esenciálních prvků

Výrazný byl vliv nízkého pH na obsah esenciálních kationů (K⁺, Mg²⁺ a Ca²⁺). U rostlin, kde byl zdrojem dusíku amonný iont, vzrostl zvýšením pH živného roztoku obsah draslíku v kořenech o 46 % a v listech dokonce o 57 % (Graf. 5.7). U rostlin živených nitráty byl rozdíl v obsahu draslíku mezi variantami méně výrazný (24 resp. 18 %), přesto však statisticky významný (Graf. 5.8).



Graf. 5.7 Obsah draslíku v kořenech a listech rostlin pšenice po třítydenní kultivaci v amonné variantě výživy; pH-stat – stabilizována hodnota pH mezi 5,8 - 6,0. Průměr ± SD; (P=0,0003; F=55,99; Df=7 pro kořeny; P=0,0006; F=42,54; Df=7 pro NČ).



Graf. 5.8 Obsah draslíku v kořenech a listech rostlin pšenice po třítydenní kultivaci v nitrátové variantě výživy; pH-stat – stabilizována hodnota pH mezi 4,4 - 4,6. Průměr ± SD; (P=0,0023; F=19,42; Df=9 pro kořeny; P=0,0104; F=11,10; Df=9 pro NČ).

Stejně tendence byly pozorovány i v obsahu dalších dvou esenciálních kationů Ca²⁺ a Mg²⁺, kdy u rostlin z amonné výživy byl zjištěn nárůst v obsahu obou iontů v kořenech o třetinu v porovnání s variantou s neupravovaným nízkým pH a v listech pak vzrostl téměř dvojnásobně (Tab. 5.6).

U nitrátové výživy vedlo snížení pH na 4,5 k poklesu v obsahu vápníku v kořenech a v listech o 26 resp. 41 %, obsah hořčíku pak klesl na méně než polovinu a to jak v kořenech tak v listech (Tab.5.7).

Tab. 5.6 Obsah dvojmocných esenciálních kationů u rostlin pšenice po 3-týdenní kultivaci v amonné variantě výživy; pH-stat – pH po celou dobu kultivace stabilizováno na hodnotě 5,8 - 6,0. Průměr ± SD; P=0,05; statistické hodnocení červeně.

Varianta	Ca (mg Ca.g ⁻¹ DW)		Mg (mg Mg.g ⁻¹ DW)	
	Kořeny (P=0,0120; F=12,66; Df =7)	NČ (P=0,0001; F=115,15; Df =7)	Kořeny (P=0,0034; F=21,81; Df =7)	NČ (P=0,0001; F=139,26; Df =7)
Amonná	1,19±0,13 a	1,65±0,15 a	0,75±0,09 a	1,03±0,10 a
pH-stat	1,60±0,15 b	3,40±0,24 b	1,00±0,03 b	1,87±0,08 b

Tab. 5.7 Obsah dvojmocných esenciálních kationů u rostlin pšenice po 3-týdenní kultivaci v nitrátové variantě výživy; pH-stat – pH po celou dobu kultivace stabilizováno na hodnotě 4,4 - 4,6. Průměr ± SD; P=0,05; statistické hodnocení červeně.

Varianta	Ca (mg Ca.g ⁻¹ DW)		Mg (mg Mg.g ⁻¹ DW)	
	Kořeny (P=0,0002; F=41,02; Df =9)	NČ (P=0,0005; F=30,68; Df =9)	Kořeny (P=0,0001; F=155,90; Df =9)	NČ (P=0,0001; F=153,05; Df =9)
Nitrátová	2,07±0,09 b	4,89±0,69 b	3,17±0,20 b	2,54±0,13 b
pH-stat	1,53±0,14 a	2,87±0,22 a	1,31±0,22 a	1,09±0,20 a

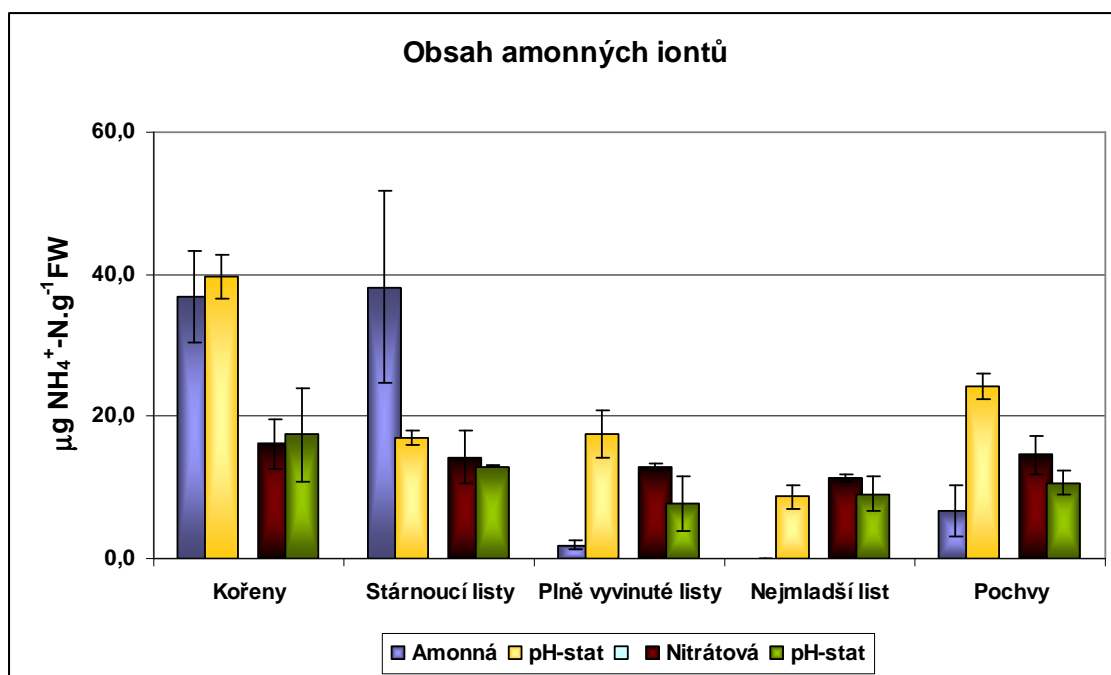
5.2.4 Rozdíly v aktivitě nitrát reduktázy a obsahu nitrátů a amonných iontů

V reakci na nízké pH klesla úroveň aktivity nitrát reduktázy u rostlin, kterým bylo udržováno nízké pH v porovnání s rostlinami u kterých bylo při nitrátové výživě ponecháno pH vyšší a to u plně vyvinutých listů z hodnoty 22,1 nmol NO₂⁻ g⁻¹ FW.min⁻¹ na 12,4 nmol NO₂⁻ g⁻¹ FW. min⁻¹.

Tomu odpovídal i pokles v obsahu nitrátů. V plně vyvinutých listech byl jejich obsah 0,45 mg NO₃⁻-N.g⁻¹ FW u varianty s vyšším nestabilizovaným pH a 0,30 mg NO₃⁻-N.g⁻¹FW u varianty s nízkým pH. Nejvyšší obsah nitrátů byl nalezen u obou variant v pochvách a to 0,69 resp. 0,56 mg NO₃⁻-N.g⁻¹FW.

Při detailnější analýze obsahu amonných iontů v různých částech rostlin pšenice bylo zjištěno, že u amonné varianty výživy s nestabilizovaným pH byl vyšší obsah amonných iontů pouze v kořenech a ve stárnoucích listech. U rostlin, kde bylo pH udržováno na vyšší hodnotě byly amonné ionty nalezeny ve všech analyzovaných částech a nebyl zaznamenán zvýšený obsah amonných iontů ve stárnoucích listech. Také zde byl nejvyšší obsah amonných iontů nalezen v kořenech (Graf 5.9).

U nitrátové varianty výživy byl obsah amonných iontů ve všech částech podobný a v listech vždy vyšší u varianty s vyšším pH, i když zjištěný rozdíl mezi variantami nebyl statisticky významný (Graf 5.9).



Graf. 5.9 Obsah amonných iontů v různých částech rostlin pšenice po 3-týdenní kultivaci v amonné (NH_4^+ - pH-stat – pH po celou dobu kultivace stabilizováno na hodnotě 5,8 - 6,0) a nitrátové variantě (NO_3^- - pH-stat – pH po celou dobu kultivace stabilizováno na hodnotě 4,4 - 4,6) N-výživy. Průměr \pm SD.

5.3 Určení vnitrodruhových a mezidruhových rozdílů v rychlosti příjmu jednotlivých forem dusíku

U vybraných odrůd dvou druhů pšenice (*Triticum aestivum* a *Triticum durum*) byla měřena rychlost příjmu nitrátů a amonných iontů a určeny Michaelis-Mentenovské kinetické parametry (V_{\max} a K_m) charakterizující vysoko-afinitní příjmové systémy pro NO_3^- a NH_4^+ .

5.3.1 Kinetické parametry

U všech sledovaných odrůd bylo zjištěno, že maximální rychlost příjmu amonných iontů (V_{\max}) je výrazně vyšší (2x - 4x) než V_{\max} pro příjem nitrátů. Zároveň však byla zjištěna vyšší afinita příjmu – tedy nižší K_m pro nitráty než pro amonné ionty (Tab. 5.8; 5.9; 5.10).

Mezi odrůdami pšenice seté i pšenice tvrdé byly nalezeny statisticky průkazné rozdíly v hodnotě V_{\max} pro příjem nitrátů (Tab. 5.8). U pšenice seté se významně lišily odrůdy AC Read a Roxo (7,78 resp. 5,13 $\mu\text{mol NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{h}^{-1}$), u pšenice tvrdé se výrazně odlišovala odrůda Mojo 2 (7,90 $\mu\text{mol NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{h}^{-1}$). Rozdíly byly

pozorovány i v hodnotě K_m . Zároveň bylo zjištěno, že odrůdy pšenice seté mají průkazně vyšší V_{max} i K_m v porovnání s odrůdami pšenice tvrdé.

Tab. 5.8 Kinetické parametry V_{max} a K_m pro vysoko-afinitní příjmový systém nitrátů. Průměr \pm SD; $P=0,05$; statistické hodnocení červeně; tučně označeno porovnání druhů.

Odrůda	V_{max} ($\mu\text{mol NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{h}^{-1}$)	K_m (μM)
<i>Triticum aestivum</i>	6,54\pm1,33 b	26,85\pm3,32 b
Roxo	5,13 \pm 0,72 a	22,4 \pm 6,9
AC Read	7,78 \pm 1,44 b	30,1 \pm 11,5
Pacifik	5,53 \pm 0,74 ab	25,9 \pm 7,4
Munk	6,55 \pm 0,46 ab	24,6 \pm 8,9
Sandra	7,36 \pm 0,96 ab	31,2 \pm 12,7
<i>Triticum durum</i>	5,11\pm1,59 a	20,67\pm2,35 a
Zenit	4,33 \pm 0,28 a	20,8 \pm 11,4
Marmilla	5,14 \pm 0,75 a	24,2 \pm 3,0
Saadi	5,12 \pm 1,05 a	16,7 \pm 4,9
Kharkovskaya 21	3,59 \pm 0,86 a	21,7 \pm 2,1
Lyudmila	4,66 \pm 1,41 a	-
Valbelice	4,35 \pm 0,80 a	21,7 \pm 3,5
Mojo 2	7,90 \pm 0,79 b	19,1 \pm 5,5

*- Statistické charakteristiky pro hodnocení odrůd druhu *T. aestivum* ($P=0,0175$; $F=4,21$; $Df =19$).
 Statistické charakteristiky pro hodnocení odrůd druhu *T. durum* ($P=0,0010$; $F=6,39$; $Df =24$).
 Statistické charakteristiky pro hodnocení mezi druhy *T. aestivum* x *T. durum* ($P=0,0030$; $F=9,87$; $Df =44$ pro V_{max} a $P=0,0099$; $F=10,59$; $Df =10$ pro K_m).

Také hodnoty V_{max} a K_m pro příjem amonných iontů se lišily mezi jednotlivými odrůdami obou druhů, avšak zjištěné rozdíly nebyly statisticky významné. Mezidruhové srovnání rovněž neukázalo podstatné rozdíly v kinetických parametrech pro příjem amonných iontů (Tab. 5.9).

Tab. 5.9 Kinetické parametry V_{\max} a K_m pro vysoko-afinitní příjmový systém amonných iontů. Průměr \pm SD; $P=0,05$; statistické hodnocení červeně; tučně označeno porovnání druhů.

Odrůda	V_{\max} ($\mu\text{mol NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{h}^{-1}$)	K_m (μM)
<i>Triticum aestivum</i>	16,91\pm2,74	43,63\pm8,69
Roxo	16,57 \pm 1,00	53,2 \pm 6,5
AC Read	14,89 \pm 2,62	35,7 \pm 9,7
Pacifik	18,18 \pm 1,09	55,6 \pm 17,5
Munk	16,43 \pm 2,44	34,3 \pm 3,6
Sandra	19,56 \pm 3,04	39,4 \pm 0,9
<i>Triticum durum</i>	16,37\pm4,32	38,87\pm5,89
Zenit	17,08 \pm 4,74	50,1 \pm 14,9
Marmilla	18,35 \pm 5,09	44,1 \pm 2,8
Saadi	16,63 \pm 3,59	32,8 \pm 2,3
Kharkovskaya 21	16,69 \pm 2,63	38,5 \pm 7,1
Lyudmila	13,45 \pm 2,65	38,7 \pm 6,5
Valbelice	13,02 \pm 2,48	34,8 \pm 12,5
Mojo 2	20,11 \pm 3,61	33,0 \pm 6,8

*- Statistické charakteristiky pro hodnocení odrůd druhu *T. aestivum* ($P=0,1775$; $F=7,84$; $Df =18$).
 Statistické charakteristiky pro hodnocení odrůd druhu *T. durum* ($P=0,2045$; $F=1,56$; $Df =28$).
 Statistické charakteristiky pro hodnocení mezi druhy *T. aestivum* x *T. durum* ($P=0,6351$; $F=0,22$; $Df =47$ pro V_{\max} a $P=0,3352$; $F=1,02$; $Df =11$ pro K_m).

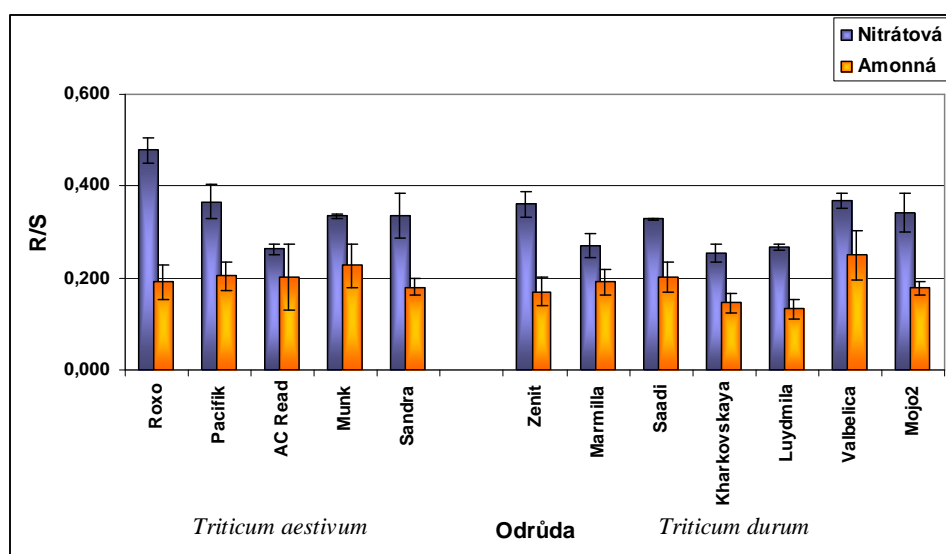
Tab. 5.10 Průměry maximální rychlosti příjmu nitrátů a amonných iontů pro dva druhy pšenice *Triticum aestivum* a *Triticum durum*. Průměr \pm SD; $P=0,05$; statistické hodnocení červeně.

Druh	<i>Triticum aestivum</i> ($P=0,0001$; $F=217,44$; $Df =38$)	<i>Triticum durum</i> ($P=0,0001$; $F=146,75$; $Df =53$)
V_{\max} pro nitráty ($\mu\text{mol NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{h}^{-1}$)	6,54 \pm 1,33 a	5,11 \pm 1,59 a
V_{\max} pro amonné ionty ($\mu\text{mol NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{h}^{-1}$)	16,91 \pm 2,74 b	16,37 \pm 4,32 b

5.3.2 Rozdíly v růstu a v obsahu celkového dusíku a amonných iontů v kořenech a listech

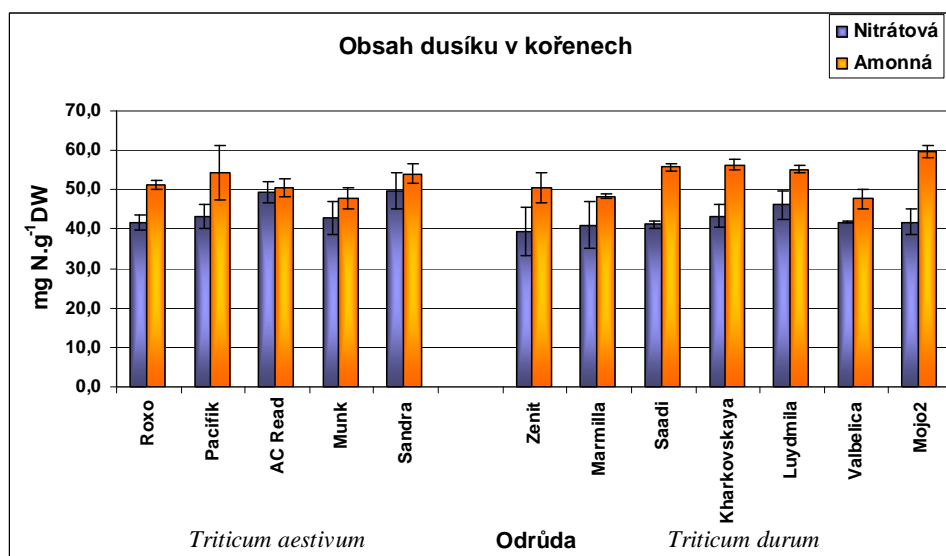
U všech sledovaných odrůd obou druhů pšenice byly zjištěny rozdíly v produkci biomasy kořenů a nadzemní části mezi nitrátovou a amonnou variantou výživy. Rostliny z nitrátové varianty měly výrazně vyšší R/S poměr v porovnání s rostlinami

z varianty amonné. Mezi jednotlivými odrůdami byly pozorovány velké odlišnosti (Graf 5.10).



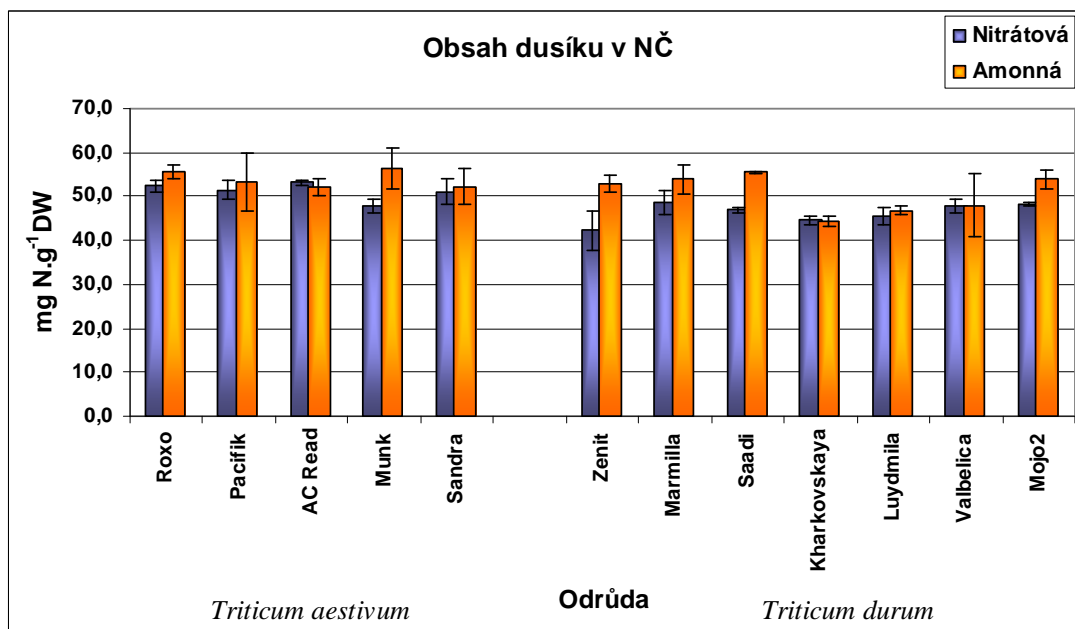
Graf. 5.10 R/S poměr u dvanácti odrůd pšenice pěstovaných ve dvou variantách dusíkaté výživy. Průměr ± SD.

Obsah celkového dusíku v kořenech byl u většiny odrůd nižší u rostlin z nitrátové varianty výživy (Graf. 5.11). Statisticky významné rozdíly byly zjištěny u pšenice tvrdé, kde průměrný obsah dusíku v kořenech činil 42,1 u nitrátové varianty a 53,3 mg N.g⁻¹ DW u amonné varianty. U pšenice seté byly odpovídající hodnoty 45,4 a 51,5 mg N.g⁻¹ DW a rozdíl nebyl statisticky průkazný.



Graf. 5.11 Celkový obsah dusíku v kořenech dvanácti odrůd pšenice po 4-týdenní kultivaci v nitrátové nebo amonné variantě výživy. Průměr ± SD.

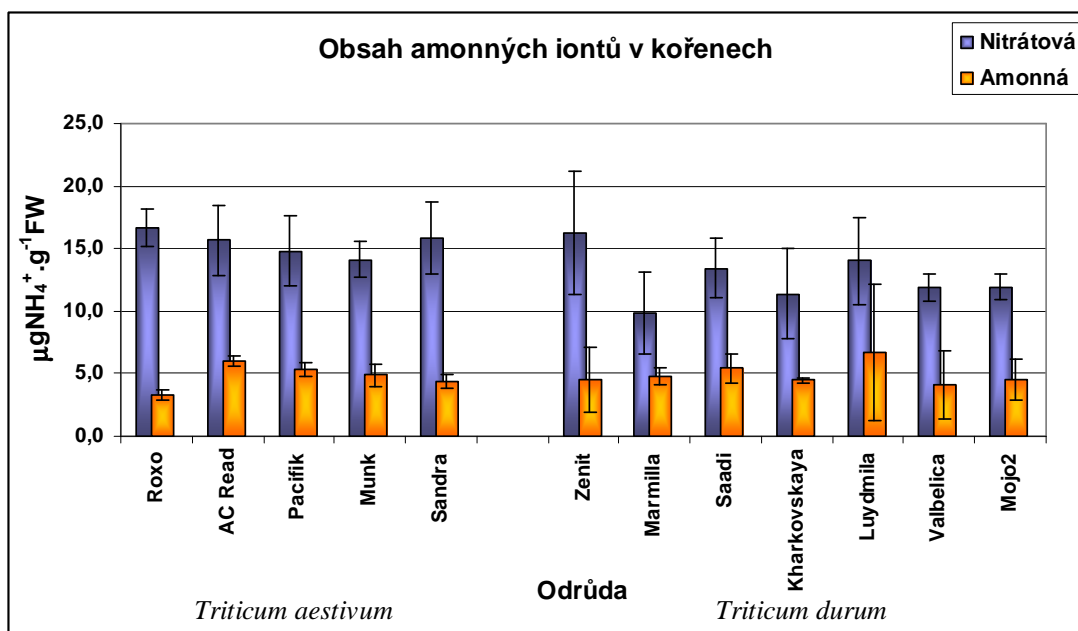
Obsah dusíku v nadzemní části se u většiny odrůd obou druhů výrazně nelišil, výjimku tvořila odrůda Munk u pšenice seté a odrůdy Zenit, Saadi a Mojo2 u pšenice tvrdé, kde byl obsah dusíku významně vyšší u amonné varianty výživy (Graf. 5.12).



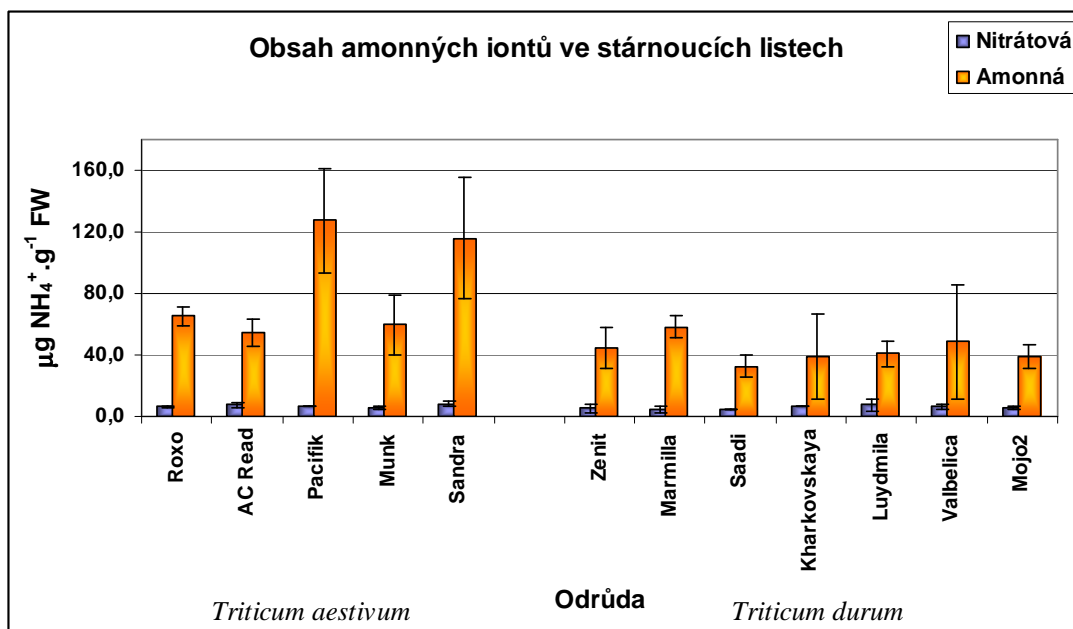
Graf. 5.12 Celkový obsah dusíku v nadzemní části dvanácti odrůd pšenice po 4-týdenní kultivaci v nitrátové nebo amonné variantě výživy. Průměr ± SD.

Současně s odlišným obsahem celkového dusíku byly u všech sledovaných odrůd pozorovány výrazné rozdíly v obsahu amonných iontů mezi rostlinami pěstovanými s nitrátovým či amonným iontem jako jediným zdrojem dusíku. Zatímco u rostlin z nitrátové výživy byl nalezen výrazně vyšší obsah amonných iontů v kořenech (2x - 5x) (Graf. 5.13), rostliny z amonné výživy měly několikanásobně zvýšený obsah amonných iontů ve stárnoucích listech (Graf. 5.14). Zjištěné rozdíly byly statisticky průkazné. Obsah amonných iontů v ostatních částech rostliny byl u obou variant výživy podobný.

Významné rozdíly v obsahu amonných iontů v kořenech nebyly pozorovány ani v rámci druhů ani mezi oběma druhy. Naproti tomu množství amonných iontů ve stárnoucích listech rostlin z amonné výživy vykazovalo významné odchylky mezi jednotlivými odrůdami a to zvláště u pšenice seté. Obsah amonných iontů u odrůdy AC Read činil 54,6 $\mu\text{g NH}_4\text{-N.g}^{-1}$ FW v porovnání s odrůdou Pacifik, kde byl zjištěný obsah dvojnásobný (127,7 $\mu\text{g NH}_4\text{-N.g}^{-1}$ FW). Zároveň byl ve stárnoucích listech zjištěn nižší obsah amonných iontů u odrůd pšenice tvrdé v porovnání s odrůdami pšenice seté (v průměru 43,1 a 84,6 $\mu\text{g NH}_4\text{-N.g}^{-1}$ FW).



Graf. 5.13 Obsah amonných iontů v kořenech dvanácti odrůd pšenice po 4-týdenní kultivaci v nitrátové nebo amonné variantě výživy. Průměr ± SD; *- Statistické charakteristiky pro hodnocení průměrných hodnot druhu *T. aestivum* (nitrátová varianta 15,47±0,87 **b**; amonná varianta 4,71±0,91 **a**; P=0,0001; F=288,46; Df=9). Statistické charakteristiky pro hodnocení průměrných hodnot druhu *T. durum* (nitrátová varianta 12,68±1,94 **b**; amonná varianta 4,93±0,81 **a**; P=0,0001; F=81,56; Df=13).



Graf. 5.14 Obsah amonných iontů ve stárnoucích listech dvanácti odrůd pšenice po 4-týdenní kultivaci v nitrátové či amonné variantě výživy. Průměr ± SD; *- Statistické charakteristiky pro hodnocení průměrných hodnot druhu *T. aestivum* (nitrátová varianta 6,86±0,85 **a**; amonná varianta 84,59±30,84 **b**; P=0,0010; F=25,39; Df=9). Statistické charakteristiky pro hodnocení průměrných hodnot druhu *T. durum* (nitrátová varianta 5,73±0,99 **a**; amonná varianta 43,08±7,73 **b**; P=0,0001; F=137,74; Df=13).

U nitrátové varianty výživy byly navíc sledovány rozdíly v aktivitě NR a obsahu nitrátů v mladých metabolicky aktivních listech. Aktivita NR se dosti lišila u obou druhů mezi jednotlivými odrůdami, byla však pozorována výrazná variabilita v rámci opakování a nelze tak učinit jednoznačné závěry.

Rozdíly v obsahu nitrátů byly významné mezi odrůdami pšenice seté. U pšenice tvrdé se výrazně lišila jen odrůda Lyudmila, která měla relativně nízký obsah nitrátů v mladých listech (Tab. 5.11).

Tab. 5.11 Aktivita NR a obsah nitrátů v mladých listech dvanácti odrůd pšenice po 4-týdenní kultivaci v nitrátové variantě výživy. Průměr ± SD.

Odrůda	Aktivita NR (nmol NO ₂ ⁻ .g ⁻¹ FW.min ⁻¹)	Obsah nitrátů (mg NO ₃ ⁻ .g ⁻¹ FW)
<i>Triticum aestivum</i>		
Roxo	98,3±12,8	1,21±0,04
AC Read	77,1±2,0	1,99±0,18
Pacifik	114,7±29,3	1,71±0,08
Munk	113,9±15,4	1,22±0,03
Sandra	97,6±12,5	1,82±0,15
<i>Triticum durum</i>		
Zenit	71,8±30,7	1,43±0,20
Marmilla	70,6±49,4	1,61±0,04
Saadi	139,0±44,8	1,45±0,05
Kharkovskaya 21	109,2±31,0	1,47±0,23
Lyudmila	75,1±27,6	1,11±0,17
Valbelice	75,8±37,3	1,49±0,12
Mojo 2	81,4±16,8	1,43±0,13

5.4 Určení rychlosti příjmu a následné translokace dusíku přijatého z jeho jednotlivých forem

Rychlost příjmu a translokace jednotlivých forem dusíku v tomto pokusu byla stanovena z obsahu ¹⁵N v jednotlivých částech rostliny po 1 a 2 hodinové expozici. Z naměřených hodnot bylo zjištěno, že průměrná rychlost příjmu nitrátů či amonných iontů se výrazně nelišila (66,0 a 62,1 μmol.g⁻¹ DW.h⁻¹) pokud byly oba ionty jedinou dostupnou formou dusíku. Avšak zatímco příjem nitrátů byl během druhé hodiny jen o třetinu pomalejší v porovnání s příjmem během první hodiny, u amonných iontů klesala rychlost příjmu během druhé hodiny až na ¼ počáteční rychlosti (Tab. 5.12).

Pokud byly v živném roztoku přítomny oba ionty ve stejné koncentraci, byl příjem nitrátů výrazně zpomalen. Průměrná rychlost příjmu amonných iontů byla srovnatelná s rychlostí příjmu samotných amonných iontů ($63,5 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{DW.h}^{-1}$), zatímco průměrná rychlost příjmu nitrátů klesla na $17,7 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{DW.h}^{-1}$. Celkový příjem dusíku ze smíšené varianty výživy tak byl zhruba o 20 % větší v porovnání s oběma variantami, kde byl dusík přítomen jen v jedné formě. Ve smíšené variantě výživy byly pozorovány ještě výraznější rozdíly ve změně rychlosti příjmu amonných iontů během 1. a 2. hodiny, rychlost příjmu nitrátů zde byla konstantní (Tab. 5.12).

Tab. 5.12 Rychlost příjmu jednotlivých forem dusíku. Průměr \pm SD.

Varianta	Nitrátová		Amonná	
Forma dusíku	Nitráty		Amonné ionty	
	1.hodina	2.hodina	1.hodina	2.hodina
Rychlost příjmu ($\mu\text{mol.g}^{-1}\text{DW.h}^{-1}$)	77,8 \pm 6,3	54,2 \pm 1,1	100,2 \pm 7,7	24,1 \pm 10,1
Varianta	Smíšená			
Forma dusíku	Nitráty		Amonné ionty	
	1.hodina	2.hodina	1.hodina	2.hodina
Rychlost příjmu ($\mu\text{mol.g}^{-1}\text{DW.h}^{-1}$)	17,5 \pm 1,1	17,8 \pm 2,6	125,1 \pm 4,5	1,9 \pm 0,8

Současně byly pozorovány značné rozdíly v translokaci přijatého dusíku mezi přijímanými formami (Tab 5.13). U rostlin, které dostaly jako zdroj dusíku pouze nitráty zůstalo v kořenech po dvou hodinách zhruba $\frac{2}{3}$ z přijatého dusíku. Největší podíl translokovaného dusíku byl nalezen v plně vyvinutých listech, méně pak v rostoucích a jen malá část ve stárnoucích listech. U rostlin, jejichž jediným zdrojem dusíku byly amonné ionty byla translokace z kořenů výrazně pomalejší. Po dvou hodinách bylo v kořenech nalezeno ještě téměř 85 % z přijatého dusíku. Největší podíl pak byl transportován směrem k nejmladším vyvíjejícím se listům. Transport do stárnoucích listů zde byl pouze minimální.

U rostlin, které měly v živném roztoku oba ionty, bylo po 2 hodinách v kořenech přítomno zhruba 80 % N a to jak z přijatých nitrátů tak amonných iontů. Největší podíl dusíku přijatého ve formě nitrátů byl obdobně jako u samotných nitrátů translokován

do plně vyvinutých listů a stejně tak dusík z přijaté amonné formy směřoval do nejmladších rostoucích listů (Tab. 5.14).

Tab. 5.13 Translokace přijatého dusíku v rostlině v závislosti na dodávané formě u 3 týdnů starých rostlin pšenice. Průměr ± SD; P=0,05; statistické hodnocení červeně.

Forma dusíku	Nitráty (% z přijatého ¹⁵ N)	Amonné ionty (% z přijatého ¹⁵ N)
Část rostliny		
Kořeny (P=0,0004; F=48,26; Df=7)	63,7±2,5 a	83,2±4,2 b
Stárnoucí listy (P=0,0012; F=32,93; Df=7)	3,2±0,8 b	0,5±0,2 a
Plně vyvinuté listy (P=0,0001; F=325,25; Df=7)	18,0±1,5 b	1,5±0,7 a
Rostoucí listy (P=0,0071; F=16,03; Df=7)	7,0±1,0 b	3,3±1,3 a
Pochvy (P=0,2164; F=1,91; Df=7)	8,1±0,8	9,3±1,2

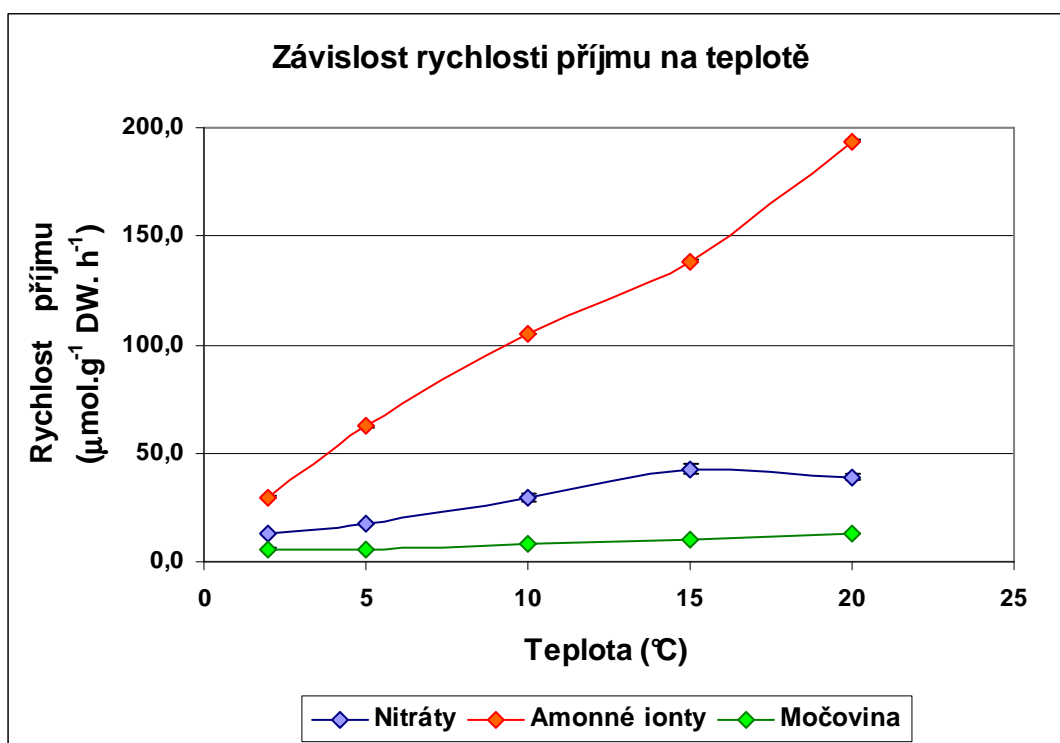
Tab. 5.14 Translokace přijatého dusíku u rostlin pšenice ze smíšené varianty výživy. Průměr ± SD.

Forma dusíku	Nitráty (% z přijatého ¹⁵ N)	Amonné ionty (% z přijatého ¹⁵ N)
Část rostliny		
Kořeny	81,4±0,1	80,0±3,5
Stárnoucí listy	2,2±0,1	0,6±0,3
Plně vyvinuté listy	7,2±0,2	1,9±0,5
Rostoucí listy	3,9±0,2	4,8±0,5
Pochvy	5,3±0,5	12,7±2,3

5.5 Určení teplotní závislosti příjmu jednotlivých forem dusíku

S využitím ¹⁵N značených substrátů byla určena závislost rychlosti příjmu jednotlivých forem dusíku (NO₃⁻, NH₄⁺ a CO(NH₂)₂) na teplotě.

Ze získaných výsledků je patrné, že příjem všech tří forem stoupá se zvyšující se teplotou v kořenové zóně a je měřitelný již při teplotě 2 °C. Rychlost příjmu amonných iontů byla výrazně vyšší už při teplotě 5 °C a plynule stoupala v závislosti na teplotě. Rychlost příjmu nitrátů rostla do teploty 15 °C, kde dosáhla svého maxima a dál už se nezvyšovala. Příjem močoviny se zvyšoval pomaleji a výrazný nárůst rychlosti jejího příjmu byl zaznamenán až mezi 15 a 20 °C (Graf 5.15).



Graf. 5.15 Rychlost příjmu u jednotlivých forem dusíku v závislosti na teplotě v kořenové zóně u rostlin pšenice po 4-týdenní kultivaci. Průměr ± SD.

Ze srovnání rychlosti příjmu všech tří forem vyplývá, že příjem amonných iontů je výrazně rychlejší jak v porovnání s nitráty (~ 2,5x), tak zejména v porovnání s močovinou (~ 10x) při nižších teplotách. Při 20 °C už byly rozdíly v rychlosti příjmu menší, nitráty byly přijímány 1,8x a močovina 5x pomaleji.

Tab. 5.15 Rychlost příjmu jednotlivých forem dusíku v závislosti na teplotě v kořenové zóně u rostlin pšenice po 4-týdenní kultivaci. Průměr±SD.

Teplota	Rychlost příjmu (μmol.g ⁻¹ DW.h ⁻¹)					
	Nitráty		Amonné ionty		Močovina	
	1.hodina	2.hodina	1.hodina	2.hodina	1.hodina	2.hodina
2 °C	13,2±0,1	21,3±0,1	29,9±0,3	51,6±1,0	5,9±0,1	2,3±0,1
5 °C	17,5±0,2	23,7±0,5	62,3±0,1	88,9±0,2	5,4±0,1	7,1±0,1
10 °C	29,6±1,5	35,1±0,7	105,0±0,1	62,6±0,4	8,3±0,3	8,1±0,1
15 °C	42,6±2,4	32,1±0,2	138,4±0,6	43,4±0,9	10,2±0,1	10,9±0,1
20 °C	39,1±1,0	67,3±0,4	193,6±0,4	0,3±0,1	12,6±0,1	25,8±0,1

Obdobně jako v předchozím pokusu byly pozorovány velké rozdíly v rychlosti příjmu během 1. a 2. hodiny zvláště u amonných iontů. Zatímco při nízkých teplotách (2 - 5 °C) se rychlost jejich příjmu během druhé hodiny zvýšila, při vyšších teplotách

prudce klesala a při 20 °C byla rychlost příjmu během druhé hodiny již téměř nulová. Rychlost příjmu nitrátů i močoviny se neměnila tak výrazně a významný nárůst rychlosti byl zaznamenán jen při teplotě 20 °C (Tab. 5.15).

Tab. 5.16 Podíl translokovaného dusíku do nadzemní části u rostlin pšenice po dvou hodinách. Průměr ± SD.

Forma dusíku	Nitráty (% podíl translokovaného ¹⁵ N do NČ)	Amonné ionty (% podíl translokovaného ¹⁵ N do NČ)	Močovina (% podíl translokovaného ¹⁵ N do NČ)
Teplota			
2 °C	45,8±0,2	18,3±1,7	12,4±0,1
5 °C	50,4±1,0	6,6±0,2	23,0±1,2
10 °C	61,0±0,8	9,6±0,4	27,0±0,7
15 °C	53,3±0,3	6,7±0,8	15,8±0,8
20 °C	44,5±0,4	26,5±0,5	41,8±0,5

Změny v rychlosti translokace přijatého dusíku do nadzemní části byly pozorovány u všech jeho forem v závislosti na teplotě. U nitrátů byl relativně velký podíl přijatého dusíku nalezen v nadzemní části (45 – 60 %). Tento podíl se významně zvyšoval do 10 °C a poté s růstem rychlosti příjmu opět klesal. U amonných iontů bylo i po 2 hodinách nalezeno jen malé procento dusíku přetranslokovaného do nadzemní části, podíl se významně zvýšil až při teplotě 20 °C, přesto však dosáhl jen poloviční výše v porovnání s nitráty. U močoviny se podíl přijatého N v nadzemní části zvyšoval, stejně jako v případě nitrátů do 10 °C. Avšak nejrychleji byl dusík přijatý ve formě močoviny transportován do nadzemní části při teplotě 20 °C, kdy zde bylo nalezeno přes 40 % z přijatého množství (Tab. 5.16).

5.6 Určení příjmu a následné translokace jednotlivých forem dusíku při listové aplikaci

Příjem jednotlivých forem dusíku při foliární aplikaci a jeho následná translokace byly stanoveny z obsahu ¹⁵N v různých částech rostlin.

Bylo zjištěno, že nejlépe byl přijímán dusík z amonné formy, kdy po 7 dnech bylo v rostlinách nalezeno již více než 85 % z aplikovaného množství, zatímco v případě nitrátů byla ve stejné době v rostlinách nalezena jen polovina z aplikovaného množství. Močovina byla přijímána snáze než nitráty, ale úroveň příjmu amonných iontů nedosáhla (Tab. 5.17).

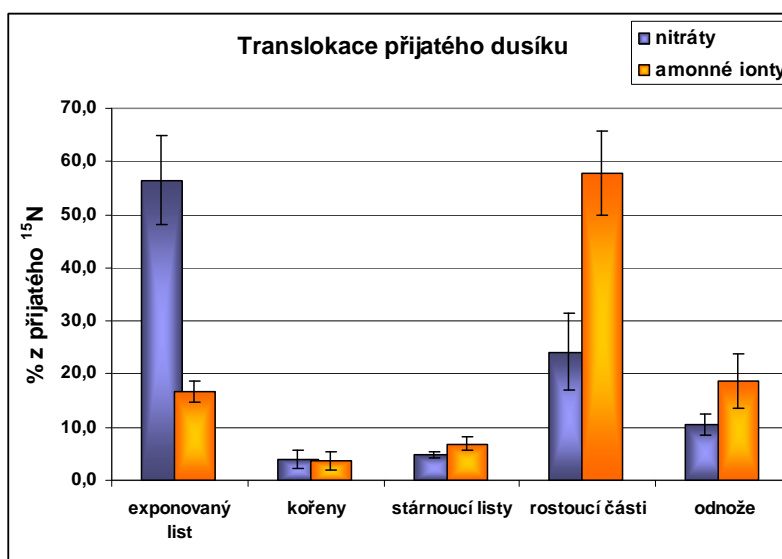
Tab. 5.17 Příjem jednotlivých forem dusíku při listové aplikaci u rostlin pšenice. Průměr ± SD.

Forma dusíku	Nitráty (Přijaté % ¹⁵ N z aplikovaného množství Ca(¹⁵ NO ₃) ₂)	Amonné ionty (Přijaté % ¹⁵ N z aplikovaného množství ¹⁵ NH ₄ Cl ₂)	Močovina (Přijaté % ¹⁵ N z aplikovaného množství CO(¹⁵ NH ₂) ₂)
Doba od aplikace			
4 hodiny	22,5±2,0	27,5±1,1	24,4±2,3
7 dní	52,0±2,3	87,7±3,7	61,4±9,2

Velké rozdíly byly pozorovány také v translokaci dusíku přijímaného z jeho různých forem (Tab 5.18). V případě nitrátů zůstal po 7 dnech od aplikace velký podíl z přijatého dusíku (56,5 %) v exponovaném listu a transport probíhal hlavně do rostoucích částí hlavního stébla a odnoží. Naproti tomu, dusík přijatý z amonné formy byl z velké části přetranslokován do vyvíjejících se částí a v exponovaném listu ho po 7 dnech zbylo jen necelých 17 %. Transport do kořenů a stárnoucích listů byl v obou případech jen minimální (Graf. 5.16). Podíl tranlokovaného dusíku z amidové formy dosáhl po 7 dnech 2/3 z přijatého množství. Detailnější analýza nebyla provedena.

Tab. 5.18 Podíl translokovaného N po 7 dnech od aplikace různých forem dusíku na list rostlin pšenice. Průměr ± SD.

Forma dusíku	Nitráty (% z přijatého ¹⁵ N)	Amonné ionty (% z přijatého ¹⁵ N)	Močovina (% z přijatého ¹⁵ N)
Translokace	43,5±8,4	83,3±2,0	66,6±2,1



Graf. 5.16 Translokace přijatého N po 7 dnech od aplikace mezi jednotlivé části rostlin pšenice. Průměr ± SD.

5.7 Určení efektivity využití listově aplikované močoviny v pozdních fázích vývoje pro tvorbu zrna a stanovení možného vlivu přípravků na ochranu rostlin při společné aplikaci na její příjem a využití

V polním pokusu byl sledován příjem listově aplikované močoviny a její další využití pro tvorbu zrna. Zároveň byla porovnána aplikace samotné močoviny se společnou aplikací močoviny a fungicidního přípravku Tango Super.

Bylo zjištěno, že příjem močoviny do listu v době přechodu rostlin pšenice do generativní fáze vývoje byl poměrně rychlý (4 dny po aplikaci bylo v rostlině nalezeno více než 50 % z aplikovaného množství) a zároveň byla zjištěna vysoká účinnost příjmu, ve sklizni bylo v rostlině nalezeno 90 % z aplikovaného množství (Tab 5.17).

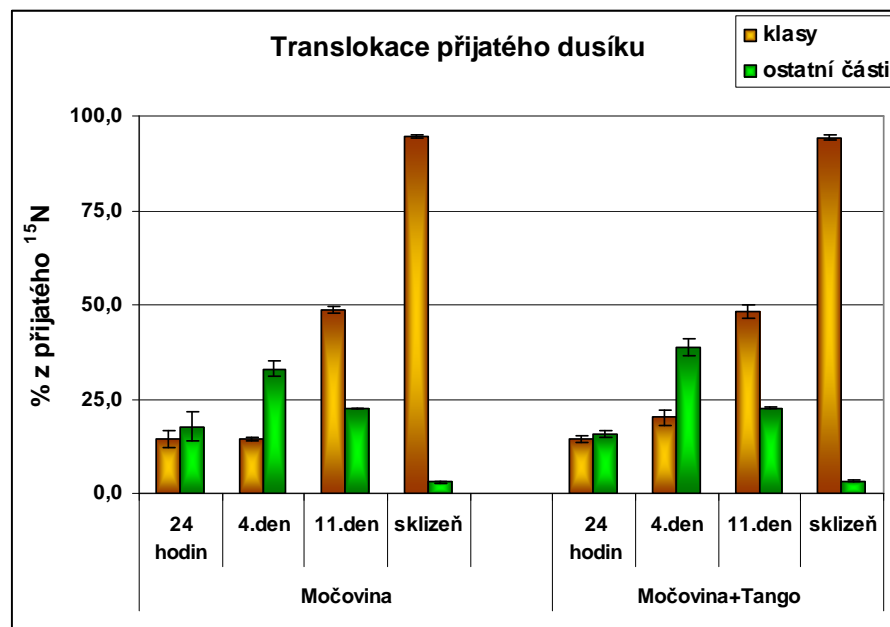
Při společné aplikaci s fungicidním přípravkem byl pozorován rychlejší příjem v prvních dnech po aplikaci, kdy již po 24 hodinách bylo v rostlinách nalezeno téměř 50 % z aplikovaného množství. Tento efekt s časem slábl a v době sklizně nebyl mezi oběma variantami nalezen žádný rozdíl (Tab. 5.17).

Tab. 5.19 Vliv fungicidního přípravku (Tango Super) na příjem močoviny při společné aplikaci na list u rostlin pšenice. Průměr ± SD; P=0,05; statistické hodnocení červeně.

Varianta	Močovina (Přijaté % ¹⁵ N z aplikovaného množství CO(¹⁵ NH ₂) ₂)	Močovina + Tango (Přijaté % ¹⁵ N z aplikovaného množství CO(¹⁵ NH ₂) ₂)
Doba od aplikace		
24 hodin (P=0,0037; F=36,98; Df=5)	19,2±3,8 a	48,4±5,6 b
4 dny (P=0,0036; F=37,64; Df=5)	53,1±3,0 a	74,1±3,8 b
11 dní (P=0,1804; F=2,63; Df=5)	84,5±2,1	78,5±4,8
Sklizeň (P=0,2179; F=2,36; Df=5)	90,6±4,4	87,1±1,3

První den po aplikaci byla většina z přijatého dusíku nalezena v praporcovém listu, na který byla močovina aplikována a jen malá část byla translokována do rostoucích částí (tj. do posledního internodia a vyvíjejícího se klasu). V následujících

dnech podíl translokovaného N rychle rostl a stoupal i podíl, který byl transportován do klasu. V době sklizně bylo v klasu nalezeno 95 % z přijatého dusíku. Míra translokace se mezi oběma variantami výrazně nelišila (Graf. 5.15).



Graf. 5.17 Podíl translokovaného dusíku do rostoucích částí pšenice z listově aplikované močoviny. Močovina byla aplikována buď samotná nebo společně s fungicidním přípravkem Tango Super. Průměr \pm SD.

Ze stanovení rozpustných bílkovin v praporcových listech 4. a 11. den po aplikaci bylo zjištěno, že rostliny ošetřené fungicidním přípravkem měli vyšší obsah rozpustných bílkovin (16,9 a 17,2 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) než rostliny neošetřené (14,7 a 15,8 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FW).

Aktivita nitrát reduktázy v praporcových listech nebyla po ošetření fungicidním přípravkem ovlivněna.

6. Diskuze

V posledních několika letech se zemědělství muselo přizpůsobit novým omezením a reagovat na problémy, které se objevily zvláště v souvislosti s hospodařením s dusíkem. Na pěstitele jsou kladeny požadavky z hlediska ochrany životního prostředí, na druhou stranu existuje trvalý tlak na snížení nákladů na hnojiva, cestou zvýšení efektivity využití dusíku plodinami. V minulých několika dekádách došlo v souvislosti s používáním dusíkatých hnojiv k výraznému zvýšení ztrát dusíku zvláště z orných půd a to jak do vodního prostředí (vyplavování nitrátů), tak do atmosféry. Současně pěstitelé musí zajistit odpovídající kvalitu rostlinné produkce. U obilnin jsou to zvláště požadavky na obsah bílkovin (dusíku) v zrna. Zemědělci tedy dnes musí zkombinovat několik cílů: dosažení optimálního výnosu, omezení nákladů pro maximální zisk, omezení negativního vlivu rostlinné výroby na životní prostředí a docílení požadované tržní kvality produkce. K tomu je třeba získat nové poznatky o fyziologických, biochemických a molekulárních mechanismech kontrolujících příjem dusíku, jeho asimilaci a využití. Tyto znalosti jsou nezbytné i pro šlechtění nových odrůd s lepší efektivností využití dusíku.

6.1 Vliv nitrátové a amonné formy N a jejich kombinace na růst rostlin pšenice včetně odlišení vlivu nízkého pH

Obsah minerálního dusíku v půdě a jeho dostupnost pro rostliny se rychle mění v průběhu vegetace v závislosti na fyzikálně - chemických vlastnostech půdy (pH, obsah O_2 , dostupnost vody) a aktivitě půdních mikroorganismů, zároveň se mění i zastoupení jednotlivých forem dusíku (tedy poměr $NH_4^+ : NO_3^-$). Rostliny mohou využívat jako zdroj dusíku obě formy, přesto však byla u mnoha rostlinných druhů pozorována preference jedné formy. U obilnin jsou zpravidla přednostně využívány nitráty, výjimku tvoří rýže.

U citlivých druhů byly navíc pozorovány symptomy toxicity amoného iontu. Příčiny a mechanismy toxického působení amoných iontů na rostliny stále nejsou plně vysvětleny. Jako hlavní příznaky toxicity jsou zpravidla uváděny snížená rychlost růstu zvláště kořenů, pokles R/S poměru či nižší obsah esenciálních kationů jako jsou draslík, vápník či hořčík (Marschner, 1995; Britto a Kronzucker, 2002).

Pšenice podobně jako některé dalších druhy kulturních plodin patří mezi druhy citlivé k toxickému působení amonného iontu (Lewis *et al.*, 1990; Cramer a Lewis, 1993; Britto *et al.*, 2001b), což se potvrdilo i v našich pokusech. Rostliny pšenice reagovaly výrazně negativně na přítomnost amonného iontu jako jediného zdroje dusíku. Byla u nich snížena produkce biomasy kořenů a omezen jejich rozvoj a tomu odpovídalo i výrazné snížení R/S poměru v porovnání s rostlinami z nitrátové či smíšené výživy.

Jednou z možných příčin těchto projevů je nedostatek uhlíku. Amonné ionty jsou na rozdíl od nitrátů z velké většiny asimilovány v kořenech. Asimilace amonných iontů a rozvoj kořenového systému tak vzájemně soupeří o uhlíkaté skelety a energii, a proto mají rostliny pěstované pouze v amonné výživě výrazně nižší R/S poměr.

Tento předpoklad byl potvrzen porovnáním pšenice a kukuřice jakožto zástupců C3 a C4 rostlin. Zatímco u pšenice byl rozvoj kořenového systému u rostlin z čistě amonné výživy v porovnání s rostlinami z výživy nitrátové omezen, u kukuřice toto omezení pozorováno nebylo a R/S poměr u ní zůstal nezměněn (Lewis *et al.*, 1990; Cramer a Lewis, 1993). Rozdíly mezi pšenicí a kukuřicí jsou vysvětlovány rozdílnou fotosyntetickou kapacitou C3 a C4 rostlin. U C3 rostlin zvýšená potřeba uhlíkatých skeletů při asimilaci amonných iontů v kořenech vede k nedostatku sacharidů pro rozvoj kořenového systému. C4 rostliny mají vyšší fotosyntetickou kapacitu a díky tomu jsou zřejmě schopny pokrýt jak potřebu sacharidů pro rozvoj kořenového systému, tak pro asimilaci amonných iontů (Lewis *et al.*, 1990).

Snížený obsah esenciálních kationů (K^+ , Ca^{2+} ; Mg^{2+}) je dalším pozorovaným symptomem působení NH_4^+ . V našich pokusech byl obsah těchto prvků výrazně snížen u rostlin pšenice kultivovaných v přítomnosti amonného iontu ve srovnání s nitráty. Zároveň byl jejich nižší obsah zjištěn i u rostlin ze smíšené výživy. Příjem a následná translokace esenciálních kationů jsou tak výrazně ovlivněny přijímanou formou dusíku. Vzhledem k předpokládanému nízko-afinitnímu příjmu amonných iontů pomocí draselných kanálů lze usuzovat, že alespoň v případě draslíku dochází ke kompetici mezi oběma ionty na úrovni jejich příjmu. U některých rostlinných druhů bylo zjištěno, že toxické působení amonných iontů lze zmírnit zvýšením dodávky kationů zvláště draslíku (Golamgoldhirsch *et al.*, 1990; Britto a Kronzucker, 2002). U rýže bylo pozorováno, že příjem amonných iontů může být inhibován nedostatkem draslíku (Wang *et al.*, 1996).

Současně s nižším obsahem esenciálních kationů jsme zjistili, že rostliny z amonné varianty výživy mají vyšší obsah celkového dusíku v porovnání s variantou nitrátovou i smíšenou. Obdobná zjištění byla učiněna nejen u pšenice, ale i u kukuřice či čajovníku (Cramer a Lewis, 1993; Ruan *et al.*, 2000). Zároveň byl jak u pšenice tak u kukuřice nalezen výrazně vyšší obsah asparaginu či glutaminu a také vyšší obsah organického dusíku v xylémové šťávě u rostlin z amonné výživy v porovnání s variantou nitrátovou (Cramer a Lewis, 1993).

Dalším projevem toxicity pozorovaným u mnoha rostlin je příjem nadměrného množství amonných iontů a jejich akumulace v pletivech rostlin. Jak bylo v nedávné době zjištěno, hlavním rozdílem mezi druhy sensitivními a tolerantními k působení amonných iontů je schopnost regulovat příjem amonných iontů přes plasmatickou membránu. U sensitivních druhů je tato regulace narušena a dochází k akumulaci nadměrného množství amonných iontů v cytosolu. Ty jsou následně vylučovány z buňky zpět do okolního prostředí proti vysokému koncentračnímu gradientu, na což spotřebovávají rostliny velké množství energie. Např. u ječmene pěstovaného při vysoké koncentraci amonných iontů byl zjištěn nárůst respirace kořenů o 41 % a výdej přijatých iontů zde dosahoval až 80 % z přijatého množství (Britto *et al.*, 2001b). Naproti tomu tolerantní druhy (např. rýže) přijímají amonné ionty pomaleji, koncentrace v cytosolu u nich vzrůstá v závislosti na rostoucí koncentraci v okolním prostředí (Wang *et al.*, 1993b; Kronzucker *et al.*, 1995b) a zpětný výdej amonných iontů u nich probíhá jen pasivně na základě rozdílů koncentrací (Britto *et al.*, 2001b).

U rostlin pšenice v našich pokusech nebyl stanoven vyšší obsah amonných iontů u rostlin z amonné varianty výživy v porovnání s výživou nitrátovou či smíšenou. Koncentrace dodávaného dusíku však pravděpodobně nebyla v našem případě tak vysoká (770 μM), aby vedla k akumulaci nadměrného množství amonných iontů v pletivech pšenice.

Při detailnější analýze bylo zjištěno, že rostliny v amonné výživě mají významně vyšší obsah amonných iontů v nejstarším listu a to jak v porovnání s rostlinami z nitrátové výživy, tak i s rostlinami pěstovanými v amonné výživě se stabilizovaným vyšším pH živného roztoku. Tento zvýšený obsah amonných iontů v nejstarších částech rostliny nás vedl k hypotéze, že dalším efektem toxického působení amonných iontů by mohla být rychlejší indukce senescence nejstarších listů. Akumulace amonných iontů v pletivech stárnoucích listů pšenice byla již dříve popsána (Thomas, 1978; Peeters a van Laere, 1992). Zároveň byl pozorován nárůst aktivity glutamát

dehydrogenázy - enzymu účastnícího se katabolismu aminokyselin. Senescence listů je provázána rozpadem chlorofylu. Starší listy obsahují méně chlorofylu než listy mladší. I v našich pokusech se obsah chlorofylu měnil v závislosti na stáří listu. U rostlin z amonné výživy byl pozorován nižší obsah chlorofylu v nejstarším listu i v listech plně vyvinutých, avšak zjištěné rozdíly nebyly statisticky průkazné.

Příjem amonných iontů stejně jako jejich následná asimilace jsou spojeny s uvolňováním protonů, čímž dochází k výrazné acidifikaci rhizosféry (Goodchild a Givan, 1990; Marschner, 1995; Smart a Bloom, 1998). Nízké pH je považováno za jednu z hlavních příčin projevů toxicity amonných iontů. Rostlinné druhy, které jsou dobře adaptovány na amonné ionty jako jediný zdroj dusíku, jsou zpravidla zároveň odolné ke kyselému prostředí (Yan *et al.*, 1992).

U mnoha rostlinných druhů bylo pozorováno, že symptomy toxicity byly výrazně menší, když bylo v živném médiu udržováno vyšší pH (Goodchild a Givan, 1990; Bloom *et. al.*, 1993; Schortemeyer *et al.*, 1993). Je tedy pravděpodobné, že rostlinné druhy u kterých došlo k zmírnění projevů při vyšším pH, trpí nejen toxicitou amonných iontů, ale zároveň i stresem vyvolaným aciditou živného média.

Tato pozorování byla plně v souladu s našimi výsledky. Rostliny pšenice jsou velmi senzitivním druhem k působení nízkého pH. U rostlin z amonné varianty výživy stimulovalo vyšší pH produkci biomasy kořenů a tím zároveň došlo téměř k dvojnásobnému zvýšení R/S poměru. Obdobná zjištění učinil Schortemeyer *et. al.* (1993) u rostlin kukuřice, kde při pH 4 byla produkce sušiny kořenů v amonné výživě sotva poloviční v porovnání s nitrátovou výživou, avšak při pH 7 byla produkce biomasy kořenů vyšší v amonné než nitrátové výživě. Kořeny rostlin kukuřice v amonné výživě byly při nízkém pH krátké a málo větvené, zatímco při vyšším pH byly výrazně delší a bohatě větvené. Naopak u rostlin z nitrátové výživy měly rostliny kratší laterální kořeny při vyšším pH, délka osy hlavního kořene a počet laterálních kořenů však zůstal nezměněn. Naproti tomu u rostlinných druhů, které jsou adaptovány na růst v kyselých půdách a které preferují amonné ionty jako zdroj dusíku, byl pozorován lepší růst kořenů v amonné než nitrátové výživě i při nízkém pH (Kronzucker *et al.*, 1997; Garnett a Smethurst, 1999).

Kromě stimulace růstu kořenů mělo vyšší pH živného roztoku pozitivní vliv také na příjem a tím i obsah esenciálních kationů. U rostlin, které dostávaly jako jediný zdroj dusíku amonný iont vedlo zvýšení pH k značnému nárůstu v obsahu všech

tří sledovaných kationů (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) v pletivech listů i kořenů. U nitrátové varianty výživy byly rozdíly v obsahu iontů méně výrazné, přesto však rostliny kultivované při nižším pH obsahovaly významně méně těchto kationů. Je tedy patrné, že příjem kationů je inhibován nejen při příjmu amonných iontů, ale zároveň je výrazně regulován v závislosti na pH živného roztoku. Hodnota pH v rhizosféře ovlivňuje aktivitu kanálů pro příjem iontů a to zvláště v případě draslíku.

U rostlin, které měly jako zdroj dusíku nitráty byl zjištěn výrazný pokles obsahu fosforu v reakci na snížení pH. To může souviset se vyšší nabídkou protonů pro transport nitrátů přes plasmatickou membránu a tím zvýšení jejich příjmu při nízkém pH (Schortemeyer *et al.*, 1993). Příjem nitrátové (anionové) formy dusíku pak může potlačovat příjem ostatních anionů.

U většiny rostlin bylo toxické působení amonných iontů z části nebo zcela potlačeno pokud byly rostliny pěstovány v médiu, kde byly dostupné obě formy dusíku (Smiciklas a Below, 1992; Wang a Below, 1995; Schortemeyer *et al.*, 1997). V našich pokusech měly rostliny pšenice ze smíšené varianty průkazně vyšší produkci nadzemní biomasy a růst kořenů byl u nich srovnatelný s rostlinami z nitrátové varianty. V souladu s našimi výsledky také Stamp *et al.*, (1997) zjistili zvýšení produkce sušiny nadzemní části o 10% u rostlin, které dostávaly obě formy N v porovnání s rostlinami, které měly jako zdroj dusíku jen jednu z forem. U pšenice však bylo zjištěno, že tento benefiční efekt byl pozorován pouze pokud byly oba ionty přijímány stejnou částí kořenového systému (Feil, 1994).

Navzdory pozorovaným negativním vlivům amonných iontů na pěstované rostliny, představuje použití amonné formy dusíkatých hnojiv jednu z možností vedoucích ke snížení finančních nákladů a k omezení znečištění spodních i povrchových vod nitráty. Pokusem o praktické řešení tohoto problému je i u nás populární systém Cultan (Controlled Uptake Long-Term Ammonium Nutrition), který byl vyvinut v 90. letech v Německu (Sommer, 2000).

Hnojení dusíkem je zde posunuto do období intenzivního vegetativního růstu, kdy se aplikuje vodný roztok NH_3 nebo jiná NH_4^+ - hnojiva těsně pod povrch půdy mezi řádky pěstované plodiny. Princip systému je založen na předpokladu, že pěstované rostliny mohou částí kořenového systému přijímat N ve formě NH_4^+ z lokálních deposit. Zbývající část kořenů zajišťuje příjem ostatních živin a nitrátů z okolního půdního profilu. Provedené polní pokusy ukázaly, že důsledkem uvedeného systému N výživy je

malá nebo žádná deprese tvorby biomasy, žádné nebo pouze slabé snížení výnosu a významně snížené náklady na potřebná hnojiva a jejich aplikaci (Sommer, 2000).

6.2 Vnitrodruhové a mezidruhové rozdíly v rychlosti příjmu nitrátové a amonné formy dusíku

Pšenice, společně s rýží a kukuřicí patří mezi nejdůležitější celosvětově pěstované druhy, které zajišťují podstatnou část produkce potravin. Většina současných u nás pěstovaných odrůd pšenice byla šlechtěna s ohledem na vyšší výnosu, technologickou kvalitu zrna (to je obsah a strukturu zásobních bílkovin), odolnost k houbovým chorobám a v menší míře i na mrazuvzdornost a odolnost k suchu. Vzhledem ke stoupajícím cenám hnojiv a k nutnosti zajistit produkci potravin pro stále rostoucí lidskou populaci bude nezbytné vybírat genotypy, u kterých bude zajištěn požadovaný výnos i při nižší zásobenosti dusíkem (Le Gouis *et al.*, 2000; Delmer, 2005), tedy genotypy, které mají lepší efektivnost využití dusíku (Hirel *et al.*, 2007). Efektivnost využití dusíku (NUE) lze rozdělit do dvou dílčích procesů: efektivnosti příjmu, tedy schopnosti rostlin získávat dusík (v nitrátové či amonné formě) z půdy a efektivnosti následného využití N pro tvorbu zrna. Z mnoha pokusů vyplývá, že efektivnost využití dusíku u obilnin je menší než 50 % (Raun a Johnson, 1999).

Příjem obou forem dusíku z půdy je zprostředkován 2 typy transportních systémů v závislosti na jejich koncentraci. Vysoko-afinitní transportní systémy (HATS) zajišťují aktivní příjem při nízkých vnějších koncentracích iontů ($< 0,5$ mM) a vykazují vyšší afinitu k substrátu. Při vysoké vnější koncentraci ($>0,5$ mM) se začínají uplatňovat nízko-afinitní transportní systémy (LATS). Rychlost příjmu se u nich lineárně zvyšuje s rostoucí koncentrací v okolním prostředí. V polních podmínkách se koncentrace obou iontů výrazně mění v průběhu vegetace, podmínky pro fungování LATS se však většinou vyskytují jen po omezené období (např. po aplikaci hnojiv). Hlavní význam pro příjem obou forem tak mají spíše HATS.

Jako vhodný ukazatel schopnosti přijímat N z vnějšího prostředí se nabízí použití příjmových parametrů V_{\max} a K_m , které charakterizují vysoko-afinitní příjmový systém. Kinetické parametry byly sledovány u mnoha rostlinných druhů (Siddiqi *et al.*, 1990; Lainé *et al.*, 1993; Mäck a Tischner, 1994; Crawford a Glass, 1998; Malagoli *et al.*, 2004), přesto jejich vzájemné porovnání zpravidla není možné

kvůli odlišným experimentálním podmínkám. Cílem této práce bylo srovnat kinetické parametry pro příjem nitrátů a amonných iontů u dvanácti odrůd dvou druhů pšenice (*Triticum aestivum* a *Triticum durum*). U obou sledovaných druhů byla zjištěna výrazně vyšší V_{\max} pro příjem amonných iontů ($16,9$ a $16,4 \mu\text{mol NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{h}^{-1}$) než pro příjem nitrátů ($6,5$ a $5,1 \mu\text{mol NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{h}^{-1}$), zároveň však vyšší afinita (tedy nižší K_m) pro nitráty. To ukazuje na lepší osvojovací schopnost pro nitráty u obou druhů.

Z hlediska příjmu nitrátů, se v souboru 5 odrůd pšenice seté průkazně odlišovala portugalská odrůda Roxo ($V_{\max} = 5,1$; $K_m = 22,4$) od kanadské odrůdy AC Reed ($V_{\max} = 7,8$; $K_m = 30,1$) patřící do stejné botanické skupiny (*graecum*). U tvrdých pšenic se pak výrazně lišila mexická odrůda Mojo 2 ($V_{\max} = 7,9$; $K_m = 19,1$; *melanopus*) od zbývajících 6 převážně jihoevropských odrůd z několika skupin (*leucomelan*, *hordeiforme*, *leucurum*) s průměrnou hodnotou $V_{\max} = 4,53 \mu\text{mol NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{h}^{-1}$ a $K_m = 21,02 \mu\text{M}$. U ječmene byla zjištěna obdobná rychlost příjmu nitrátů pohybující se kolem $5 \mu\text{mol NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{h}^{-1}$ (Siddiqi *et al.*, 1990). Naproti tomu u brukvových rostlin byla naměřená rychlost příjmu mnohem vyšší (až $35 \mu\text{mol NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{h}^{-1}$) (Lainé *et al.*, 1993).

Mnohem menší, statisticky neprůkazné rozdíly mezi druhy a odrůdami byly pozorovány v příjmu amonných iontů, což bylo ovlivněno obecně horším rozvojem kořenového systému v amonné výživě a tím větší variabilitou v rámci jedné odrůdy.

Zjištěné druhové a mezidruhové rozdíly v rychlosti příjmu jsou dále modifikovány rozvojem kořenového systému. Obecně lze říci, že při stejné rychlosti příjmu mají větší příjmovou kapacitu ($= \mu\text{mol N} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{rostlina}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) odrůdy s vyšším poměrem R/S. Jako příklad lze uvést zde nehodnocenou jarní odrůdu pšenice seté Strela, která v obdobném pokusu (Trčková *et al.*, 2006) vykazovala relativně nízkou rychlost příjmu nitrátů ($5,4 \mu\text{mol N} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{h}^{-1}$), ale velmi vysokou příjmovou kapacitu ($11,7 \mu\text{mol N} \cdot \text{rostlina}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Při šlechtění odrůd na růst při nízké zásobenosti dusíkem by byly vhodným genetickým zdrojem odrůdy s nižší K_m , vyšší V_{\max} a vyšším R/S poměrem. Genetická variabilita schopnosti přijímat dusík není u dnes pěstovaných odrůd příliš vysoká. Moderní odrůdy jsou navíc citlivější na nedostatek dusíku ve srovnání s odrůdami staršími (Ortiz-Monasterio *et al.*, 1997), ale často vykazují vyšší efektivnost jeho využití pro tvorbu výnosu (Brancourt-Hulmel *et al.*, 2003).

Jako další zdroje genetické variability v rychlosti příjmu dusíku lze využít hospodářsky méně významné, a tedy i méně prošlechtěné, druhy pšenice. Tento předpoklad potvrdilo vzájemné porovnání desetičlenných souborů pšenice špaldy (*T. spelta* L.), dvouzrnky (*T. dicoccum* L.) a jednozrnky (*T. monococcum* L.) s odrůdou *T. aestivum* L. cv. Munk. Nejvyšší naměřené hodnoty V_{\max} pro nitráty (v průměru $13,3 \mu\text{mol N}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}\cdot\text{h}^{-1}$) u odrůd diploidní pšenice jednozrnky 2,8x převyšovaly V_{\max} stanovenou pro tetraploidní dvouzrnky (v průměru $4,7 \mu\text{mol N}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}\cdot\text{h}^{-1}$). Odrůdy pšenice špaldy se vyznačovaly vyšší vnitrodruhovou variabilitou a hodnotami V_{\max} srovnatelnými s pšenicí setou (Trčková *et al.*, 2005).

Získané výsledky naznačují, že stanovení příjmových schopností může být využito jako užitečný nástroj při výběru a hodnocení šlechtitelského materiálu. To platí za předpokladu, že jsou vzájemně porovnávány rostliny pěstované v přesně definovaných podmínkách. K případnému překonání rozdílů v odlišném počtu chromozomů u vybraných genotypů (donorů požadovaných vlastností) by mohlo přispět využití metod moderní molekulární genetiky.

6.3 Rychlost příjmu a následná translokace jednotlivých forem dusíku a teplotní závislost jejich příjmu

Rychlost příjmu obou forem dusíku kořeny není konstantní a liší se nejen mezi jednotlivými druhy či odrůdami, ale je výrazně ovlivněna i faktory vnějšího prostředí (jako je teplota, fotosynteticky aktivní záření, diurnální rytmus či dostupnost dané formy N) (Malagoli *et al.*, 2004). Zároveň je příjem regulován také na úrovni rostliny s ohledem na její aktuální stav, rychlost růstu, stádium ontogenetického vývoje a zvláště pak její N-status. Příjem nitrátů a amonných iontů tak podléhá negativní zpětné vazbě dané dostupností produktů jejich asimilace v rostlině. (Cerezo *et al.*, 2001b; Glass *et al.*, 2002; Nazoa *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Loqué a von Wirén, 2004) Současné s tím může příjem jedné formy ovlivňovat příjem formy druhé.

V našem pokusu byla porovnána aktuální rychlost příjmu nitrátů a amonných iontů u rostlin pěstovaných za stejných podmínek v nitrátové, amonné či smíšené výživě a srovnána rychlost translokace přijatého dusíku do nadzemní části. Během první hodiny byla rychlost příjmu nitrátů zhruba o $\frac{1}{4}$ pomalejší než rychlost příjmu amonných

iontů pokud byly oba ionty jedinou dostupnou formou dusíku. Během druhé hodiny rychlost příjmu zvláště amonných iontů výrazně poklesla. Pokles rychlosti by mohl být způsoben nižší rychlostí asimilace amonných iontů vedoucí k jejich akumulaci v kořenech a následné inhibici jejich příjmu. Tomuto předpokladu odpovídalo i velké množství přijatého dusíku nalezené v kořenech (po 1. hodině činil tento podíl téměř 95 %). Přijaté nitráty není třeba před transportem do nadzemní části asimilovat do organických sloučenin. Hlavní transportovanou formou N jsou v případě příjmu NO_3^- - formy N samotné nitráty. Tomu odpovídala i výrazně vyšší rychlost translokace N přijatého ve formě nitrátů v našem pokuse – více jak 30 % z přijatého dusíku bylo během hodiny transportováno do nadzemní části.

Zároveň s rychlostí translokace se lišilo i cílové místo určení. Největší podíl dusíku přijatého ve formě nitrátů byl translokován do plně vyvinutých listů, kde dochází k jejich asimilaci. Tomu zpravidla odpovídala i nejvyšší nalezená aktivita nitrát reduktázy v těchto listech. Menší podíl byl nalezen v nejmladších rostoucích listech. V případě amonných iontů byl přijatý dusík asimilován již v kořenech a následně přednostně transportován do vyvíjejících se listů.

V mnoha předchozích studiích u několika rostlinných druhů bylo pozorováno, že jsou-li v médiu dostupné obě formy N je negativně ovlivněna rychlost příjmu nitrátů (Siddiqi *et al.*, 1990; Macduff a Jackson, 1991; Touraine a Glass, 1997; Colmer a Bloom, 1998; Taylor a Bloom, 1998; Kronzucker *et al.*, 1999 a,b; Camanes *et al.*, 2009). Naše výsledky tato zjištění plně potvrdily. U rostlin pšenice pěstovaných ve smíšené variantě výživy byla rychlost příjmu nitrátů výrazně nižší než u rostlin, kde byly nitráty jedinou dostupnou formou N a v porovnání s rychlostí příjmu amonných iontů dosáhla rychlost příjmu nitrátů jen necelých 20 %. Rychlost příjmu amonných iontů nebyla přítomností nitrátů nijak ovlivněna. Inhibice příjmu nitrátů v přítomnosti amonných iontů je vysvětlována negativní zpětnovazebnou regulací produkty asimilace přijatých amonných iontů (Forde and Clarkson, 1999).

Negativní ovlivnění rychlosti příjmu amonnou formou dusíku bylo v podobném pokuse pozorováno i v případě močoviny (nepublikované výsledky). Rychlost příjmu močoviny z média obsahujícího současně i amonné ionty se zde snížila o $\frac{1}{4}$ v porovnání s rychlostí jejího příjmu z roztoku samotné močoviny. Naproti tomu přítomnost nitrátů rychlost příjmu močoviny stimulovala.

Teplota jako důležitý faktor prostředí přímo ovlivňuje vývoj kořenů i nadzemních částí rostlin a patří tak mezi hlavní faktory, které omezují výnos plodin.

V našich zeměpisných šířkách průměrná denní teplota rozhoduje o nástupu jarní vegetace a o jejím ukončení na podzim, určuje tedy délku vegetační doby. Faktory, které mají vliv na využití živin rostlinou, jako je jejich dostupnost v půdě, morfologické charakteristiky kořenového systému a fyziologické a biochemické vlastnosti odpovídající za vlastní příjem a asimilaci jsou všechny ovlivněny teplotou. Zároveň nízká teplota půdy zpomaluje procesy mineralizace organicky vázaných živin a může tak nepřímo výrazně omezit růst a vývoj rostlin v časném jaře.

Ve snaze o přiblížení se k reálným teplotním podmínkám na počátku jarní vegetace byla snížena denní a noční teplota na 15 °C a 10 °C při zachování světelného režimu. Lze předpokládat, že za použitých experimentálních podmínek odpovídají skutečnému vlivu teploty na příjem jednotlivých forem N lépe výsledky získané po první hodině měření, kdy se ještě v plné míře neprojevuje negativní zpětnovazební regulace příjmu. Zjištěné hodnoty ukazují vysoce průkaznou lineární závislost rychlosti příjmu všech forem N na teplotě. Zatímco u amonných iontů tato závislost ($y = 8,68x + 15,26$; $R^2 = 99,3 \%$) platí v celém teplotním intervalu, příjem nitrátů ($y = 2,31x + 7,28$; $R^2 = 97,6 \%$) je lineární v rozmezí od 2 °C do 15 °C. Lineárně závislý je i velmi pomalý příjem močoviny ($y = 0,40x + 4,32$; $R^2 = 94,9 \%$).

Velmi podobné výsledky získali Malagoli *et al.* (2004), kteří zjistili, že rychlost příjmu nitrátů u řepky olejky výrazně rostla do 16 °C, poté už nárůst nebyl tak výrazný. Tito autoři dále prokázali, že teplota ovlivňuje mnohem více aktivitu vysoko-afinitních než nízko-afinitních transportních systémů. Vysoká rychlost příjmu amonných iontů při vyšších teplotách (15 °C a 20 °C) provázená hromaděním přijatého N v pletivech (kořenech a nadzemních částech) pokusných rostlin již po 2 hodinách vedla ke poklesu jejich příjmu.

Vedle příjmu živin nízká teplota zpravidla u rostlin snižuje rychlost růstu a často bývá pozorován vyšší R/S poměr (Clarkson *et al.*, 1992; Garnett a Smethurst, 1999). Podle některých názorů omezený příjem N při nízkých teplotách, který se projevuje poklesem obsahu N v nadzemní části, může ukazovat na vyšší účinnost jeho využití pro tvorbu biomasy (Macduff a Jackson, 1991).

6.4 Příjem a využití různých forem dusíku při listové aplikaci

Informace o příjmu jednotlivých forem dusíku do nitra listu jsou v literatuře značně omezené. Vzhledem k tomu, že se jedná o chemicky rozdílné sloučeniny, liší se jak rychlost s jakou vstupují do listu, tedy jejich průnik kutikulou tak následný příjem do buněk epidermis a listového mezofylu. Nitráty stejně jako amonné ionty jsou přijímány v iontové formě, ale nitráty jako aniony a amonné ionty jako kationy. Močovina je pravděpodobně přijímána jako celá molekula, tedy jako nepolární sloučenina.

U nepolárních látek je průnik kutikulou řízen gradientem daným rozdílem koncentrací. Rychlost difúze tak závisí jak na koncentraci látky na povrchu listu tak na její koncentraci uvnitř listu (v apoplastu), která je ovlivněna pohyblivostí dané látky a rychlostí jejího příjmu do epidermálních a mezofylových buněk (Ewert *et al.*, 2000). U polárních látek se ke gradientu chemických potenciálů přidává ještě gradient elektrických potenciálů daný nábojem. Ionty se pohybují v polárních pórech, které jsou tvořeny polárními složkami kutikuly a nesou záporný fixní náboj. To vede k „odpuštění anionů“, a proto kationy procházejí kutikulou snadněji než aniony (Tyree *et al.*, 1990). Tloušťka vrstvy ve které nemohou být transportovány aniony se mění dle iontové síly aplikovaného roztoku a hustoty polárních složek kutikuly přítomných v póru (Tyree *et al.*, 1990). Pokud je aplikovaný roztok dostatečně koncentrovaný je pohyblivost iontu dána hlavně jeho velikostí (McFarlane a Berry, 1974).

V této práci byl porovnán příjem různých forem dusíku při foliární aplikaci. Ukázalo se, že amonné ionty jsou do listu přijímány výrazně snadněji než nitráty. Množství přijatého dusíku z amonné formy bylo výrazně vyšší jak po 4 hodinách, tak 7 dnech od aplikace (28 a 88 % v porovnání s 23 a 52 %). To potvrdilo předpoklad, že kationy snadněji prochází kutikulou a jsou tak rychleji přijímány do buněk listu. Lepší příjem amonných iontů v porovnání s nitráty byl na základě nepřímých důkazů popisován také u rostlin skočce (Peuke *et al.*, 1998). Přestože močovina jako malá nepolární sloučenina prochází přes kutikulu pravděpodobně rychleji než polární látky, její množství přijaté do listu pšenice bylo nižší v porovnání s amonnými ionty a jen o málo vyšší v porovnání s nitráty. Rychlost příjmu je tak zřejmě omezena spíše na úrovni transportu přes plasmatickou membránu než při průchodu kutikulou.

Pozorované rozdíly v podílu translokovaného dusíku přijatého ve formě nitrátů či amonných iontů jsou dány nutností rychlé asimilace přijatých amonných iontů, které jsou ve větším množství pro buňku toxické (Marschner, 1995; Tobin a Yamaya, 2001). Vzniklé organické sloučeniny jsou poté transportovány do nových vyvíjejících se listů či rostoucího klasu. To bylo potvrzeno i v našem experimentu, kde byl největší podíl z přijatého dusíku v amonné formě nalezen v rostoucích částech rostliny. Asimilace amonných iontů v listech není zřejmě limitována dostupností uhlíkatých skeletů jako je tomu při jejich asimilaci v kořenech, a proto byl podíl translokovaného N výrazně vyšší v porovnání s nitráty než když byly amonné ionty přijímány a asimilovány v kořenech. Přijaté nitráty mohou být ve velké míře ukládány jako rezerva do vakuol a jejich asimilace je řízena aktuální potřebou rostliny. V našem případě tak zůstalo více než 55 % z přijatého množství v exponovaném listu a jen menší část byla translokována do rostoucích pletiv.

6.5 Efektivnost využití listově aplikované močoviny v pozdní fázi vývoje pro tvorbu zrna a vliv společné aplikace s prostředky na ochranu rostlin na její příjem a využití

Během vegetativní fáze růstu je dusík přijímán kořeny a po asimilaci je využit pro stavbu buněčných struktur v mladých rostoucích orgánech (listech, stéblech a kořenech). Po přechodu rostliny do reprodukční fáze růstu (po začátku kvetení) je dusík nacházející se v těchto orgánech remobilizován a translokován do tvořícího se zrna. Část dusíku využitá pro tvorbu zrna pochází z jeho příjmu po začátku kvetení. Podíl N remobilizovaného a přijatého až po začátku kvetení se liší mezi jednotlivými rostlinnými druhy a je ovlivněn mnoha faktory: dostupností N v různých fázích vývoje, správným načasováním aplikace hnojiv a podmínkami prostředí (např. množstvím fotosynteticky aktivního záření či srážek a vlhkostí půdy). U pšenice pochází 60 - 95 % dusíku využitého pro tvorbu zrna z remobilizace dusíku uloženého v kořenech a listech (Barneix, 2007; Habash *et al.*, 2006). Menší podíl pochází z příjmu dusíku v období tvorby zrna.

Příjem živin kořeny pšenice rychle stoupá v období intenzivního růstu (během sloupkování), vrcholí na začátku kvetení a poté klesá, rychleji u rostlin dobře zásobených dusíkem (Trčková a Kamínek, 2000). Příjem dusíku z půdy je poté již

značně omezen. Schopnost listů přijímat a metabolizovat přijaté živiny je zachována déle a klesá až během procesu stárnutí. U pšenice bylo pozorováno, že listy byly metabolicky aktivní a tedy schopné zpracovávat přijatý dusík nejméně ještě 10 – 15 dní po začátku kvetení (Raimanová a Trčková, 2007).

Senescence listů jako programovaný proces představující konečnou fázi vývoje listu je charakterizována desintegrací chloroplastů, poklesem fotosyntetické aktivity, snižováním obsahu proteinů a nukleových kyselin. Zároveň dochází k mobilizaci živin a organických látek, které jsou transportovány ze stárnoucích listů do vyvíjejícího se zrna (Himelblau a Amasino, 2001). Dobře pozorovatelnou změnou ve stárnoucích listech je ztráta chlorofylu, jako marker lze také použít změny obsahu rozpustných bílkovin. Proces senescence může být urychlen nepříznivými podmínkami prostředí jako je nedostatek srážek; vysoká teplota (Tahir a Nakata, 2005; Yang a Zhang, 2006; Hafsi *et al.*, 2007; Raimanová a Trčková, 2007) či nedostatek dusíku (Raimanová *et al.*, 2008). U mnoha druhů bylo hodnoceno, zda oddálení senescence a tím prodloužení fotosyntetické aktivity listů bude mít pozitivní efekt na příjem a využití dusíku rostlinou a následný výnos (Borrel *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2005; Rampino *et al.*, 2006; Sýkorová *et al.*, 2008).

Při nedostatečné výživě dusíkem dochází ke snižování výnosu a zpravidla klesá i kvalita zrna ozimé pšenice (Dupot *et al.*, 2006; Haberle *et al.*, 2008). Pro zvýšení obsahu dusíku v zrně se proto používá listových aplikací hnojiv, obvykle v době mezi koncem sloupkování a začátkem kvetení. V našich pokusech jsme sledovali schopnost listů přijímat foliárně aplikovanou močovinu v pozdních fázích vývoje a využívat získaný dusík pro tvorbu zrna. Bylo zjištěno, že v době přechodu rostlin do generativní fáze byla foliárně aplikovaná močovina rychle a efektivně přijímána. Za příznivého počasí bylo v rostlinách nalezeno téměř 90 % z aplikovaného množství. Dusík přijatý na počátku metání byl translokován nejprve do posledního internodia jakožto dočasného úložiště a poté do klasu. V době sklizně bylo 95 % přijatého dusíku uloženo v zrně. To ukazuje na vysokou účinnost využití dusíku přijatého v době tvorby zrna. Také Gooding *et al.*, (2007) zjistili, že dusík přijatý z foliárně aplikované močoviny na začátku kvetení nebo brzy po odkvětu byl velmi rychle transportován do zrna. Za 35 dnů po aplikaci našli až 67 % z přijatého N nalezeno v zrně. Ve zralosti bylo v zrně a v ostatních nadzemních částech nalezeno v průměru 41 a 46 % z aplikovaného množství N ve porovnání s jen 25 a 35 % při aplikaci hnojiva (dusičnanu amonného)

do půdy. Uvedení autoři zjistili, že využití N z močoviny záviselo také na ročníku, pěstované odrůdě a aplikaci fungicidů.

Společná aplikace hnojiv a prostředků na ochranu rostlin je využívána hlavně kvůli snížení nákladů a očekávaným synergickým efektům (Blandino a Reyneri, 2009). V našem experimentu bylo zjištěno, že při společné aplikaci je ovlivněna především počáteční rychlost vstupu aplikované močoviny do listu, což může zvýšit účinnost příjmu i při méně příznivých povětrnostních podmínkách v době bezprostředně po aplikaci. Zároveň nebyl pozorován žádný vliv na následnou translokaci a tím využití pro tvorbu zrna.

7. Závěry

Cílem disertační práce bylo hodnocení fyziologických a agronomických aspektů příjmu a následného využití hlavních forem N u pšenice. Shrnutí hlavních výsledků je dále uvedeno.

Pšenice patří mezi druhy rostlin, které jsou citlivé k toxickému působení amonného iontu a zároveň negativně reagující na nízké pH. U rostlin, které měly jako jediný zdroj dusíku NH_4^+ byly pozorovány symptomy toxicity – omezený růst kořenů, nižší R/S poměr, deficit esenciálních kationtů (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) a akumulace amonných iontů v nejstarších listech. Tyto projevy byly z velké části potlačeny zvýšením pH živného roztoku. Nízké pH působilo negativně i na rostliny z nitrátové varianty. Dostupnost obou forem dusíku toxické působení amonných iontů zmírňuje. Zdá se, že výrazná acidifikace rhizosféry vyvolaná příjmem amonných iontů je hlavní příčinou negativní růstové reakce rostlin pšenice.

Kinetické parametry příjmu (V_{\max} a K_m), charakterizující vysoko-afinitní příjmový systém, mohou sloužit pro hodnocení vnitrodruhových a mezidruhových rozdílů v efektivitě příjmu nitrátů a amonných iontů. Oba sledované druhy pšenice (*T. aestivum* a *T. durum*) se vyznačují vyšší maximální rychlostí (V_{\max}) pro příjem amonných iontů v porovnání s nitráty a současně lepší osvojovací schopností pro nitráty (nižší K_m). Rozvoj kořenového systému všech odrůd byl více nebo méně ovlivněn v reakci na přijímanou formu dusíku. Rostliny přijímající NO_3^- měly vyšší R/S poměr než rostliny přijímající NH_4^+ . Velikost kořenového systému výrazně modifikuje kapacitu příjmu obou iontů. Mezidruhové i vnitrodruhové srovnání ukázalo průkazné rozdíly v schopnosti přijímat nitráty, v případě amonných iontů byly rozdíly méně výrazné. Hodnocení druhových a mezidruhových rozdílů z hlediska schopnosti přijímat živiny z vnějšího prostředí na základě stanovení kinetických parametrů příjmových systémů by bylo možné využít jako jedno z kritérií při výběru šlechtitelského materiálu.

Rychlost příjmu obou forem dusíku (NO_3^- a NH_4^+) je ovlivněna aktuálním stavem rostliny a je výrazně regulována rychlostí jejich asimilace a translokace do nadzemní části. Nutnost asimilace rychleji přijímaných amonných iontů v kořenech pšenice vedla následně k výrazné inhibici jejich příjmu. Asimilovaný dusík byl poté translokován do mladých rostoucích listů. Pomaleji přijímané nitráty byly rychle

translokovány na místo asimilace do plně vyvinutých, metabolicky aktivních listů a nedocházelo k výraznému omezení jejich příjmu.

Jsou-li obě formy dusíku dostupné v médiu v podobné koncentraci, je amonný iont přijímán přednostně. Přítomnost amonných iontů negativně ovlivňovala rychlost příjmu nitrátů kořeny pšenice, která se snížila až na čtvrtinu oproti jejich příjmu z čistě nitrátového média. Příjem amonných iontů nebyl ovlivněn. Rostliny přijímající dusík ze směsi obou iontů tedy přijaly zhruba o 20 % více dusíku než rostliny přijímající jen jednu z jeho forem.

Počáteční rychlost příjmu sledovaných forem dusíku je lineárně závislá na teplotě. V teplotním intervalu 2 °C – 20 °C jsou nejrychleji přijímanou formou amonné ionty. Se stoupající teplotou dochází k regulaci rychlosti jejich příjmu způsobenou nedostatečnou asimilací a tím i jejich hromaděním v kořenech. Téměř 2x pomalejší rychlost příjmu nitrátů dosahuje maxima už při 15 °C. Příjem močoviny byl ze všech forem nejpomalejší. Vzhledem k rychlé degradaci v půdě je význam příjmu močoviny kořeny pšenice jen nepatrný.

Prostup různých forem dusíku přes kutikulu a jejich následný příjem buňkami epidermis a listového mezofylu závisí na jejich chemické podstatě. Listy pšenice nejlépe přijímaly amonné ionty tedy kationtovou formou N. Vlastní příjem amonných iontů do buněk nebyl v listech výrazně snižován rychlostí jejich asimilace, a proto byl amonný dusík nejlépe využívanou formou dusíku. Příjem nitrátů (aniontové formy) byl mnohem pomalejší a přijaté nitráty byly navíc ve velkém množství akumulovány v exponovaném listu pravděpodobně jako zásobní forma N ve vakuolách. Nepochopitelná molekula močoviny pravděpodobně procházela snadno kutikulou, ale její příjem do buněk byl stejně jako v kořenech pomalejší. Přijatá močovina byla stejně jako amonné ionty rychle metabolizována a využita jako zdroj dusíku v rostoucích pletivech.

Listy pšenice jsou schopny přijímat foliárně aplikovanou močovinu i během reprodukční fáze vývoje a přijatou močovinu následně plně využít v procesu tvorby zrna. Za příznivých povětrnostních podmínek rostliny přijaly téměř 90 % z aplikovaného množství na počátku metání a 95 % z přijatého množství bylo v době sklizně nalezeno v zrna. Společná aplikace s prostředky na ochranu rostlin (Tango Super) pozitivně ovlivnila počáteční rychlost příjmu, což by mohlo zlepšit efektivnost využití aplikovaného hnojiva za méně příznivých povětrnostních podmínek.

8. Seznam literatury

Amarasinghe, B.H.R.R., Debruxelles, G.L., Braddon, M., Onyeocha, I., Forde, B.G., Udvardi, M.K., (1998): Regulation of *GmNRT2* expression and nitrate transport activity in soybean (*Glycine max*). *Planta* 206, 44 - 52.

AOAC, (1990): Official methods of analysis: Chlorophyll in plants. Spectrophotometric method for total chlorophyll and a and b components. 62 - 63.

Araki, R., Hasegawa, H., (2006): Expression of rice (*Oryza sativa* L.) genes involved in high-affinity nitrate transport during the period of nitrate induction. *Breeding Science* 56, 295 - 302.

Aslam, M., Travis, R.L., Huffaker, R.C., (1992): Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley seedlings. *Plant Physiology* 99, 1124 - 1133.

Ayling, S.M., (1993): The effect of ammonium – ions on membrane potential and anion flux in roots of barley and tomato. *Plant, Cell and Environment* 16, 297 - 303.

Baozhen, L., Weijie, X., Shubin, S., Qirong, S., Guohua, X., (2006): Physiological and molecular responses of nitrogen – starved rice plants to re-supply of different nitrogen sources. *Plant and Soil* 287, 145 - 159.

Barneix, A.J., (2007): Physiology and biochemistry of source-regulated protein accumulation in the wheat grain. *Journal of Plant Physiology* 164, 581 - 590.

Bauer, P., Buchholz, A., Schönherr, J., (1997): Diffusion in plant cuticles as affected by temperature and size of organic solutes: Similarity and diversity among species. *Plant, Cell and Environment* 20, 982 - 994.

Bertl, A., Reid, J.D., Sentenac, H., Slayman, C.L., (1997): Functional comparison of plant inward-rectifier channels expressed in yeast. *Journal of Experimental Botany* 48, 405 - 413.

Bijlsma, R.J., Lambers, H., Kooijman, S.A.L.M., (2000): A dynamic whole-plant model of integrated metabolism of nitrogen and carbon. 1. Comparative ecological implications of ammonium-nitrate interactions. *Plant and Soil* 220, 49 - 69.

- Blandino, M., Reyneri, A., (2009):** Effect of fungicide and foliar fertilizer application to winter wheat at anthesis on flag leaf senescence, grain yield, flour bread-making quality and DON contamination. *European Journal of Agronomy* 30, 275 - 282.
- Bloom, A.J., Jackson, L.E., Smart, D.R., (1993):** Root growth as a function of ammonium and nitrate in the root zone. *Plant, Cell and Environment* 16, 199 - 206.
- Bloom, A.J., Sukrapanna, S.S., Warner, R.L., (1992):** Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physiology* 99, 1294 - 1301.
- Borrel, A., Hammer, G., van Oosterom, E., (2001):** Stay-green: A consequence of the balance between supply and demand for nitrogen during grain filling? *Annals of Applied Biology* 138, 91 - 95.
- Bradford, M.M., (1976):** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248 - 254.
- Bradley, D. P., Morgan, M.A., O’Toole, P., (1989):** Uptake and apparent utilization of urea and ammonium nitrate in wheat seedlings. *Fertilizer Research* 20, 41 - 49.
- Brancourt – Hulmel, M., Doussinault, G., Lecomte, C., Berard, P., Le Buanec, B., Trottet, M., (2003):** Genetic improvement of agronomic traits of winter wheat cultivars released in France from 1946 to 1992. *Crop Science* 43, 37 – 45.
- Brenner, W.G., Romanov, G.A., Kollmer, I., Burkle, L., Schmulling, T., (2005):** Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin - sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *The Plant Journal* 44, 314 - 333.
- Britto, D.T., Kronzucker, H.J., (2002):** NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology* 159, 567 - 584.
- Britto, D.T., Glass, A.D.M., Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., (2001a):** Cytosolic concentrations and transmembrane fluxes of $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$. An evaluation of recent proposals. *Plant Physiology* 125, 523 - 526.

- Britto, D.T., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., Kronzucker, H.J., (2001b):** Futile transmembrane NH_4^+ cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 4255 - 4258.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L., (2000):** Nitrate and other compounds serve as signals to regulate NR gene expression. *American Society of Plant Physiologist*, Rockville, MD, 820 - 822.
- Cai, Ch., Zhao, X.Q., Zhu, Y.Q., Li, B., Tong, Y.P., Li, Z.S., (2007):** Regulation of the high-affinity nitrate transport system in wheat roots by exogenous abscisic acid and glutamine. *Journal of Integrative Plant Biology* 49, 1719 - 1725.
- Camanes, G., Cerezo, M., Primo-Millo, E., Gojon, A., García-Augustín, P., (2007):** Ammonium transport and *CitAMT1* expression are regulated by light and sucrose in *Citrus* plants. *Journal of Experimental Botany* 58, 2811 - 2825.
- Camanes, G., Cerezo, M., Primo-Millo, E., Gojon, A., García-Augustín, P., (2009):** Ammonium transport and *CitAMT1* expression are regulated by N in *Citrus* plants. *Planta* 229, 331 - 342.
- Campbell, W.H., (1999):** Nitrate reductase structure, function, and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 278 - 299.
- Cao, W., Tibbits, T.W. (1998):** Response of potatoes to nitrogen concentrations differ with nitrogen forms. *Journal of Plant Nutrition* 21, 615 - 623.
- Cerezo, M., Flors, V., Legaz, F., García-Augustín, P., (2000):** Characterization of the low affinity transport system for NO_3^- uptake by *Citrus* roots. *Plant Science* 160, 95 - 104.
- Cerezo, M., Tillard, P., Filleur, S., Munos, S., Daniel-Vedele, F., Gojon, A., (2001a):** Major alterations of the regulation of root NO_3^- uptake are associated with the mutation of *Nrt2.1* and *Nrt2.2* genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 127, 262 - 271.
- Cerezo, M., Tillard, P., Gojon, A., Primo-Millo, E., García-Augustín, P., (2001b):** Characterization and regulation of ammonium transport systems in *Citrus* plants. *Planta* 214, 97 - 105.

- Clarkson, D.T., Jones, L.H.P., Purves, J.V., (1992):** Absorption of nitrate and ammonium ions by *Lolium perenne* from flowing solution cultures at low root temperatures. *Plant Cell and Environment* 15, 99 - 106.
- Colmer, T.D., Bloom, A.J., (1998):** A comparison of NH_4^+ and NO_3^- net fluxes along root of rice and maize. *Plant, Cell and Environment* 21, 240 - 246.
- Couturier, J., Montanini, B., Martin, F., Brun, A., Blaudez, D., Chalot, M., (2007):** The expanded family of ammonium transporters in the perennial poplar plant. *New Phytologist* 174, 137 - 150.
- Cramer, M.D., Lewis, O.A.M., (1993):** The influence of nitrate and ammonium nutrition on the growth of wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) plants. *Annals of Botany* 72: 359 - 365.
- Crawford, N.M., Glass, A.D.M., (1998):** Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science* 3, 389 - 395.
- Cruz, C., Lips, S.H., Martins- Loução, M.A. (1993):** Growth and nutrition of carob plants as affected by nitrogen sources. *Journal of Plant Nutrition* 16, 1 - 15.
- Cruz, C., Martins- Loução, M.A. (2000):** Determination of ammonium concentrations in soils and plant extracts. M.A. Martins- Loução and S.H. Lips (Eds.), *Nitrogen in sustainable ecosystem: from the cell to the plant*, Backhuys Publisher, Leiden, The Netherlands: 291 - 297.
- De Angeli, A., Monachello, D., Ephritikhine, G., Frachisse, J.M., Thomine, S., Gambale, F., Barbier-Brygoo, H., (2006):** The nitrate/proton antiporter *AtCLCa* mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* 442, 939 - 942.
- Delhon, P., Gojon, A., Tillard, P., Passama, L., (1995):** Diurnal regulation of NO_3^- in soybean plants: I. Changes in NO_3^- influx, efflux, and N utilization in plant during the day/night cycle. *Journal of Experimental Botany* 46, 1585 - 1594.
- Delhon, P., Gojon, A., Tillard, P., Passama, L., (1996):** Diurnal regulation of NO_3^- in soybean plants: IV. Dependence on current photosynthesis and sugar availability to the roots. *Journal of Experimental Botany* 47, 893 - 900.
- Delmer, D., (2005):** Agriculture in the developing world: connecting innovations in plant research to downstream applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15739 - 15746.

Dupont, F.M., Hurkman, W.J., Vensel, W.H., Tanaka, Ch., Kothari, K.M., Chung, O.K., Altenbach, S.B., (2006): Protein accumulation and composition in wheat grains: Effects of mineral nutrients and high temperature. *European Journal of Agronomy* 25, 96 - 107.

Eckert, M., Biela, A., Siefritz, F., Kaldenhoff, R., (1999): New aspects of plant aquaporin regulation and specificity. *Journal of Experimental Botany* 50, 1541 - 1545.

Eichert, T., Burkhardt, J., (2001): Quantification of stomatal uptake of ionic solutes using a new model system. *Journal of Experimental Botany* 52: 771 - 781.

Eichert, T., Goldbach, H.E., (2008): Equivalent pore radii of hydrophilic folia uptake routes in stomatous and astomatous leaf surfaces – further evidence for a stomatal pathway. *Physiologia Plantarum* 132, 491 - 502.

EFMA:http://www.efma.org/EPUB/easnet.dll/ExecReq/Page?eas:template_im=000BC2&eas:dat_im=000C1F.2008. (poslední přístup 21.5.2009)

Engineer, C.B., Kranz, R.G., (2007): Reciprocal leaf and root expression of *AtAMT1* and root architectural changes in response to nitrogen starvation. *Plant Physiology* 143, 236 - 250.

Ewert, M.S., Outlaw Jr., W.H., Zhang, S., Aghoram, K., Riddle, K.A., (2000): Accumulation of an apoplastic solute in the guard – cell wall is sufficient to exert a significant effect on transpiration in *Vicia faba* leaflets. *Plant, Cell and Environment* 23, 195 - 203.

Feil, B. (1994): Growth and ammonium:nitrate uptake ratio of spring wheat cultivars under a homogeneous and spatially separated supply of ammonium and nitrate. *Journal of Plant Nutrition* 17, 717 - 728.

Feng, J., Barker, A.V., (1992): Etylen evolution and ammonium accumulation by tomato plants with various nitrogen forms and regimes of acidity. I. *Journal of Plant Nutrition* 15, 2457 - 2464.

Filleur, S., Daniel-Vedele, F., (1999): Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta* 207, 461 - 469.

Forde, B.G., Clarkson, D.T., (1999): Nitrogen and ammonium nutrition of plants: physiological and molecular perspectives. *Advances in Botanical Research* 30, 1 - 90.

- Frasier, V., Gojon, A., Tillard, P., Daniel-Vedele, F., (2000):** Constitutive expression of a putative high-affinity nitrate transporter in *Nicotiana plumbaginifolia*: evidence for post-transcriptional regulation by a reduced nitrogen source. *The Plant Journal* 23, 489 - 496.
- Garnett, T.P., Smethurst, P.J., (1999):** Ammonium and nitrate uptake by *Eucalyptus nitens*: effect of pH and temperature. *Plant and Soil* 214, 133 - 140.
- Gaudinová, A., (1990):** The effect of cytokinins on nitrate reductase-activity. *Biologia Plantarum* 32, 89 - 96.
- Gazzarrini, S., Lejay, T., Gojon, A., Ninnemann, O., Frommer, W.B., von Wirén, N., (1999):** Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell* 11, 937 - 947.
- Gerendás, J., Polacco, J.C., Freyermuth, S.K., Sattelmacher, B., (1999):** Significance of nickel for plant growth and metabolism. *Journal of Plant Nutrition and Soil Sciences* 162, 241 - 256.
- Gerendás, J., Zhu, Z., Bendixen, R., Ratcliffe, R.G., Sattelmacher, B., (1997):** Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 160, 239 - 251.
- Gerendás, J., Zhu, Z., Sattelmacher, B., (1998):** Influence of N and Ni supply on urease activity in rice. *Journal of Experimental Botany* 49: 1545 - 1554.
- Gessler, A., Schultze, M., Schrempp, S., Rennenberg, H., (1998):** Interaction of the phloem – translocated amino compounds with nitrate net uptake by the roots of beech (*Fagus sylvatica*) seedlings. *Journal of Experimental Botany* 49, 1529 – 1537.
- Givan, C.V., (1979):** Metabolic detoxification of ammonia in tissue of higher plants. *Phytochemistry* 18, 375 - 382.
- Glass, A.D.M., (2003):** Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. *Critical Review in Plant Sciences* 22, 453 - 470.
- Glass, A.D.M., Britto, D.T., Kaiser, B.N., Kinghorn, J.R., Kronzucker, H.J., Kumar, A., Okamoto, M., Rawat, S., Siddiqi, M.Y., Unckles, S.E., Vidmar, J.J. (2002):** The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany* 53, 855 - 864.

Glass, A.D.M., Erner, Y., Kronzucker, H.J., Schjoerring, J.K., Siddiqi, M.Y., Wang, M.Y., (1997): Ammonium fluxes into plant roots: Energetics, kinetics and regulation. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 160, 261 – 268.

Glass, A.D.M., Shaff, J.E., Kochian, L.V., (1992): Studies of the uptake of nitrate in barley. IV. Electrophysiology. *Plant Physiology* 99, 456 -463.

Glibert, P.M., Harrison, J., Heil, C., Seitzinger, S. (2006): Escalating worldwide use of urea – a global change contributing to coastal eutrophication. *Biogeochemistry* 77, 441 - 463.

Golangoldhirsch, A., Heimer, Y.M., Lips, S.H., (1990): Effect of potassium on growth and the electrophoretic pattern of leaf proteins of sunflower supplied with ammonium or nitrate. *Journal of Plant Nutrition* 13, 957 - 970.

Goodchild, J.A., Givan, C.V., (1990): Influence of ammonium and extracellular pH on the amino and organic acid contents of suspension culture cells of *Acer Pseudoplatanus*. *Physiologia Plantarum* 78, 29 - 37.

Gooding, M.J., Gregory, P.J., Ford, K.E, Ruske, R.E., (2007): Recovery of nitrogen from different sources following applications to winter wheat at and after anthesis. *Field Crops Research* 100, 143 – 154.

Guo, F.Q., Okamoto, M., Crawford, N.M., (2003): Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 302, 100 - 103.

Guo, F.Q., Wang, R., Chen, M., Crawford, N.M., (2001): The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene *AtNRT1.1* (CHL1) is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth. *The Plant Cell* 13, 1761 - 1777.

Habash, D. Z., Bernard, S., Shondelmaier, J., Weyen, Y., Quarrie, S.A., (2006): The genetics of nitrogen use on hexaploid wheat: N utilization, development and yield. *Theoretical and Applied Genetics* 114, 403 - 419.

Haberle, J., Svoboda, P., Raimanová, I., (2008): The effect of post-anthesis water supply on grain nitrogen yield and concentration in winter wheat. *Plant Soil Environment* 54, 304 - 312.

Hafsi, M., Akhter, J., Monneveux, P., (2007): Leaf senescence and carbon isotope discrimination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) under severe drought conditions. Cereal Research Communications 35, 71 - 80.

Heredia-Guerrero, J.A., Benítez, J.J., Heredia, A., (2008): Self-assembled polyhydroxy fatty acids vesicles: a mechanism for plant cutin synthesis. Bioessays 30, 273 - 277.

Hirel, B., Le Gouis, J., Ney, B., Gallais, A., (2007): The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: toward a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches 58, 2369 – 2387.

Himmelblau, E., Amasino, R.M., (2001): Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. Journal of Plant Physiology 158, 1317 – 1323.

Howitt, S. M., Udvardi, M.K., (2000): Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. Biochimica et Biophysica Acta 1465, 152 – 170.

Huang, N. C., Chiang, C. S., Crawford, N. M., Tsay, Y. F., (1996): CHL1 encodes a component of the low-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis* and shows cell type-specific expression in roots. The Plant Cell 8, 2183 - 2191.

Huang, N. C., Liu, K. H., Lo, H. J., Tsay, Y. F., (1999): Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. The Plant Cell 11, 1381 - 1392.

Huber S. C., Bachmann, M., Huber, J.L., (1996): Post-translational regulation of nitrate reductase activity: a role for Ca^{2+} and 14-3-3 protein. Trends in Plant Science 1, 432 - 438.

Husted, S., Hebborn, C., Mattsson, M., Schjoerring, J.K., (2000): A critical experimental evaluation of methods for determination of NH_4^+ in plant tissue, xylem sap, and apoplastic fluid. Physiologia Plantarum 109, 167 - 179.

Ismande, J., Touraine, B., (1994): N demand and the regulation of nitrate uptake. Plant Physiology 105, 3 - 7.

Jenks, M.A., Ashworth, E.N., (2003): Plant epicuticular wax: function production, and genetics. Horticultural reviews 23: 1 - 68.

- Klír, J., Kunzová, E., Čermák P., (2008):** Rámcová metodika výživy rostlin a hnojení. Metodika pro praxi, VÚRV, v.v.i. Praha.
- Kojima, S., Bohner, A., Gassert, B., Yuan, L., von Wirén, N., (2007):** AtDUR3 represents the major transporter for high-affinity urea transporter across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. *Plant Journal* 52: 30 - 40.
- Krogmeier, M. J., McCarty, G. W., Bremner, J. M., (1989):** Phytotoxicity of foliar applied urea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 8189 - 8191.
- Kronzucker, H.J., Britto, D.T., Davenport, R., Tester, M., (2001):** Ammonium toxicity and the real cost of transport. *Trends in Plant Sciences* 6, 335 - 337.
- Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., (1995a):** Kinetics of NO_3^- influx in spruce. *Plant Physiology* 109, 319 - 326.
- Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., (1995b):** Analysis of $^{13}\text{NH}_4^+$ efflux in spruce roots: A test case for phase identification in compartmental analysis. *Plant Physiology* 109, 481 - 490.
- Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., (1996):** Kinetics of NH_4^+ influx in spruce. *Plant Physiology* 110, 773 - 779.
- Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., (1997):** Conifer root discrimination against soil nitrate and the ecology of forest succession. *Nature* 385, 59 - 61.
- Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., Kirk, G.D.J., (1999a):** Nitrate - ammonium synergism in rice: A subcellular analysis. *Plant Physiology* 119, 1041 - 1046.
- Kronzucker, H.J., Glass, A.D.M., Siddiqi, M.Y., (1999b):** Inhibition of nitrate uptake by ammonium in barley: Analysis of component fluxes. *Plant Physiology* 120, 283 - 291.
- Krouk, G., Tillard, P., Gojon, A., (2006):** Regulation of the high-affinity NO_3^- uptake system by NRT1.1 – mediated NO_3^- demand signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 142, 1075 – 1086.

- Lagarde, D., Basset, M., Lepetit, M., Conejero, G., Gaymard, F., Astruc, S., Grignon, C., (1996):** Tissue - specific expression of *Arabidopsis* AKT1 gene is consistent with a role in K⁺ nutrition. *The Plant Journal* 9, 195 – 203.
- Lainé, P., Ourry, A., Macduff, J., Boucaud, J., Salette, J., (1993):** Kinetic parameters of nitrate uptake by different catch crop species: effects of low temperatures or previous nitrate starvation. *Physiologia Plantarum* 88, 85 - 92.
- Lancashire, P. D., Bleiholder, H., Langelüddecke, P., Stauss, R., van den Boom, T., Weber, E., Witzten-Berger, A., (1991):** An uniform decima code for growth stages of crops and weeds. *Annals of Applied Biology* 119, 561 - 601.
- Lang, B., Kaiser, W.M., (1994):** Solute content and energy status of roots of barley plants cultivated at different pH on nitrate - or ammonium - nitrogen. *New Phytologist* 128, 451 - 459.
- Lauter F.R., Ninnemann, O., Bucher, M., Riesmeier, J.W., Frommer, W.B., (1996):** Preferential expression of an ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8139 - 8144.
- Le Gouis, J., Béghin, D., Heumez, E., Pluchard, P., (2000):** Genetic differences for nitrogen uptake and nitrogen utilisation efficiencies in winter wheat. *European Journal of Agronomy* 12, 163 - 173.
- Lea, P.J., Mifflin, B.J., (1974):** Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* 251, 614 - 616.
- Lejay, L., Gansel, X., Cerezo, M., Tillard, P., Muller, C., Krapp, A., von Wirén, N., Daniel-Vedele, F., Gojon, A., (2003):** Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. *Plant Cell* 15: 2218 - 2232.
- Lejay, L., Lepetit, M., Olive, F., Filleur, S., Daniel-Vedele, F., Gojon, A., (1999):** Molecular and functional regulation of two NO₃⁻ uptake systems by N- and C- status of *Arabidopsis* plants. *The Plant Journal* 18, 509 - 519.

- Lejay, L., Wirth, J., Pervent, M., Cross, J.M.F., Tillard, P., Gojon, A., (2008):** Oxidative pentose phosphate pathway - dependent sugar sensing as a mechanism for regulation of root ion transporters by photosynthesis. *Plant Physiology* 146: 2036 - 2053.
- Lewis, O.A.M., Cramer, M., Van Der Leij, T. (1990):** Influence of nitrogen source on carbon distribution in plants exhibiting the C3 and C4 photosynthetic pathways. W.R. Ullrich, C. Rigano, A. Fuggi, P.J. Aparicio (Eds). *Inorganic nitrogen metabolism in plants and microorganisms, uptake, and metabolism*. Springer-Verlag, Berlin, 240 - 246.
- Li, W., Wang, Y., Okamoto, M., Crawford, N.M., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D., (2007):** Dissection of the *AtNRT2.1* : *AtNRT2.2* inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. *Plant Physiology* 143, 425 - 433.
- Lin, C.M., Koh, S., Stacey, G., Yu, S.M., Lin, T.Y., Tsay, Y.F., (2000):** Cloning and functional characterization of a constitutively expressed nitrate transporter gene *OsNRT1* from rice. *Plant Physiology* 122, 379 - 388.
- Liu, K.H., Huang, C.Y., Tsay, Y.F., (1999):** CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. *The Plant Cell* 11, 865 - 874.
- Liu, L.H., Ludewig, U., Frommer, W.B., von Wirén, N., (2003a):** *AtDUR3* encodes a new type of high-affinity urea/H⁺ symporter in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 15, 790 - 800.
- Liu, L.H., Ludewig, U., Gassert, B., Frommer, W.B., von Wirén, N. (2003b):** Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133, 1220 - 1228.
- Liu, K.H., Tsay, Y.F., (2003):** Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *The EMBO Journal* 22, 1005 - 1013.
- London, J.G., (2000):** Nitrogen study fertilizers fears of pollution. *Nature* 433, 791.
- Loqué, D., Tillard, P., Gojon, A., Lepetit, M., (2003):** Gene expression of the NO₃⁻ transporter NRT1.1 and the nitrate reductase NIA1 is repressed in *Arabidopsis* roots by NO₂⁻, the product of NO₃⁻ reduction. *Plant Physiology* 132, 958 - 967.

- Loqué, D., von Wirén, N., (2004):** Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *Journal of Experimental Botany* 55, 1293 - 1305.
- Loqué, D., Yuan, L., Kojima S., Gojon, A., Wirth, J., Gazzarrini, S., Ishiyama, K., Takahashi, H., von Wirén, N., (2006):** Additive contribution of *AtAMT1.1* and *AtAMT1.3* to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal* 48, 522 - 534.
- Luque, P., Gavara, R., Heredia, A., (1995):** A study of the hydration process of isolated cuticular membranes. *New Phytologist* 129, 283 - 288.
- Macduff, J.H., Jackson S.B., (1991):** Growth and preference for ammonium or nitrate uptake by barley in relation to root temperature. *Journal of Experimental Botany* 38, 53 - 66.
- Mäck, G., Tischner, R.J., (1994):** Constitutive and inducible net NH_4^+ uptake of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiology* 144, 351 - 357.
- Malagoli, P., Lainé, P., Le Deunff, E., Rossato, L., Ney, B., Ourry, A., (2004):** Modelling nitrogen uptake in oilseed rape cv. Capitol during a growth cycle using influx kinetics of experimental data. *Plant Physiology* 134, 388 - 400.
- Malhi, S.S., Harapiak, J.T., Nyborg, M., Gill, K.S., Monreal, C.M., Gregorich, E.G., (2003):** Light fraction organic N, ammonium, nitrate and total N in a thin Black chernozemic soil under bromegrass after 27 annual applications of different N rates. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 65, 201 - 210.
- Marschner, H., (1995):** Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London.
- Martin, A., Belastegui – Macadam, X., Quilleré, I., Floriot, M., Valadier, M.H., Pommel, B., Andrieu, B., Donnison, I., Hirel, B., (2005):** Nitrogen management and senescence in two maize hybrids differing in the persistence of leaf greenness: agronomic, physiological and molecular aspects. *New Phytologist* 167, 483 - 492.
- Masclaux, C., Valadier, M.H., Brugiére, N., Morot-Gaundry, J.F., Hirel, B. (2000):** Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* 211, 510 - 518.

- Mattsson, M., Lundborg, T., Larsson, M., Larsson, C.M., (1992):** Nitrogen utilization in N-limited barley during vegetative and generative growth: Postanthesis kinetics of net nitrate uptake and the role of the relative root size in determining the capacity for nitrate acquisition. *Journal of Experimental Botany* 43: 25 - 30.
- Mattsson, M., Schjoerring, J.K., (2003):** Senescence-induced changes in apoplastic and bulk tissue ammonia concentrations of ryegrass leaves. *New Phytologist* 160, 489 - 499.
- McClure, P.R., Kochian, L.V., Spanswick, R.M., Shaff, J.E., (1990):** Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. I. Effects of nitrate on the membrane potential. *Plant Physiology* 93, 281 - 289.
- McFarlane, J.C., Berry, W.L., (1974):** Cation penetration through isolated leaf cuticles. *Plant Physiology* 53, 723 - 727.
- Meharg, A.A., Blatt, M.R., (1995):** NO₃⁻ transport across the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs: kinetic control by pH and membrane voltage. *Journal of Membrane Biology* 145, 49 - 66.
- Mérigout, P., Lelandais, M., Bitton, F., Renou, J.P., Briand, X., Meyer, Ch., Daniel-Vedele, F., (2008):** Physiological and transcriptomical aspects of urea uptake and assimilation in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* 147, 1225 - 1238.
- Mifflin, B.J., Lea, P.J., (1980):** Ammonia assimilation. B.J.Mifflin (Ed.), *The Biochemistry of Plants* 5, Academic Press, New York, 169 - 202.
- Miller, A.J., Cookson, S.J., Smith, S.J., Wells, D.M., (2001):** The use of microelectrodes to investigate compartmentation and the transport of metabolized inorganic ions in plants. *Journal of Experimental Botany* 52, 541 - 549.
- Miller, A.J., Fan, X., Orsel, M., Smith, S.J., Wells, D.M., (2007):** Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany* 58, 2297 - 2306.
- Miller, A.J., Smith, S.J., (1996):** Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. *Journal of Experimental Botany* 300, 843 - 854.
- Muldin, I., Ingemarsson, B., (1995):** A cDNA from *Brassica napus* L. encoding a putative nitrate transporter (GenBankU17987) (PGR95-004). *Plant Physiology* 108, 1341.

- Nazoa, P., Vidmar, J.J., Tranbarger, T.J., Mouline, K., Damiani, I., Tillard, P., Zhuo, D.G., Glass, A.D.M., Touraine, B., (2003):** Regulation of the nitrate transporter gene *AtNRT2.1* in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and development stage. *Plant Molecular Biology* 52, 689 - 703.
- Ninnemann, O., Jauniaux, J.C., Frommer, W.B., (1994):** Identification of a high - affinity NH_4^+ transporter from plants. *The EMBO Journal* 13: 3464 - 3471.
- Oliveira, I.C., Coruzzi, G.M., (1999):** Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 121, 301 - 309.
- Orsel, M., Chopin, F., Leleu, O., Smith, S.J., Krapp, A., Daniel-Vedele, F., Miller, A.J., (2006):** Characterization of a two - component high-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*. Physiology and protein-protein interaction. *Plant Physiology* 142, 1304 - 1317.
- Ortiz – Monasterio, J.I., Sayre, K.D., Rajaram, S., McMahon, M., (1997):** Genetic progress in wheat yield and nitrogen use efficiency under four nitrogen regimes. *Crop Science* 37, 898 – 904.
- Pearson, J., Stewart, G.R., (1993):** The deposition of atmospheric ammonia and its effects on plants. *New Phytologist* 125, 283 - 305.
- Peeters, K.M.U., van Laere, A.J., (1992):** Ammonium and amino acids metabolism in excised leaves of wheat (*Triticum aestivum*) senescing in the dark. *Physiologia Plantarum* 84, 243 - 249.
- Peuke, A.D., Jeschke, W.D., Dietz, K.J., Schreiber, L., Hartung, W., (1998):** Foliar application of nitrate or ammonium as sole nitrogen supply in *Ricinus communis*. *New Phytologist* 138, 675 – 687.
- Quaggiotti, S., Ruperti, B., Borsa, P., Destro, T., Malagoli, M., (2003):** Expression of a putative high - affinity NO_3^- transporter and of an H^+ - ATPase in relation to whole plant nitrate transport physiology in two maize genotypes differently responsive to low nitrogen availability. *Journal of Experimental Botany* 54, 1023 - 1031.
- Quesada, A., Krapp, A., Trueman, L.J., Daniel – Vedele, F., Fernández, E., Forde, B.G., Caboche, M., (1997):** PCR – identification of a *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA homologous to the high – affinity nitrate transporters of the *crnA* family. *Plant Molecular Biology* 34, 265 - 274.

Raimanová, I., Trčková, M., (2007): Remobilization of nitrogen for wheat grain formation as affected by temperature and drought. In: Proceeding of International Scientific Conference of Bioclimatology and Natural Hazards, 17-20.9.2007, Zvolen-Poľana nad Detvou, Slovakia, on CD-ROM.

Raimanová, I., Trčková, M., Haberle, J., (2008): Leaf senescence during period of grain formation in wheat plant: Effect of environmental conditions and nitrogen supply. Italian Journal of Agronomy 3 (Proceedings of the 10th Congress of the European Society for Agronomy", 15-19 September 2008, Bologna, Italy), 703 – 704.

Ramos, C. (1996): Effect of agricultural practices on the nitrogen losses in the environment. C. Rodriguez-Barrueco (Ed.), Fertilizers and Environment, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 355 - 361.

Rampino, P., Spano, G., Pataleo, S., Mita, G., Napier, J.A., Di Fonzo, N., Shewry, P.R., Perrota, C., (2006): Molecular analysis of a durum wheat “stay green” mutant: expression pattern of photosynthesis – related genes. Journal of Cereal Science 43, 160 - 168.

Raun, W.R., Johnson, G.V., (1999): Improving nitrogen use efficiency for cereal production. Agronomy Journal 91, 357 - 363.

Raven, J.A., Smith, F.A., (1976): Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. New Phytologist 76, 415 - 431.

Rawat, S.R., Silim, S.N., Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., (1999): *AtAmt1* gene expression and NH_4^+ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. The Plant Journal 19, 143 - 152.

Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Girin, T., Tillard, P., Lepetit, M., Gojon, A., (2006): A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrate limitation in *Arabidopsis*. Plant Physiology 140, 909 - 921.

Rhine, E.D., Sims, G.K., Mulvaney, R.L., Pratt, E.D. (1998): Improving the Berthelot reaction for determining ammonium in soil extracts and water. Soil Science Society of America Journal 62, 473 - 480.

- Richardson, A., Wojciechowski, T., Franke, R., Schreiber, L., Kerstiens, G., Jarvis, M., Fricke, W., (2007):** Cuticular permeance in relation to wax and cutin development along the growing barley (*Hordeum vulgare*) leaf. *Planta* 225, 1471 - 1481.
- Riederer, M., Schreiber, L., (2001):** Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of Experimental Botany* 52, 2023 - 2032.
- Rigano, C., DiMartino Rigano, V., Vona V., Carfagna, S., Carillo, P., Esposito, S., (1996):** Ammonium assimilation by young plants of *Hordeum vulgare* in light and darkness – effects on respiratory oxygen consumption by roots. *New Phytologist* 132, 375 - 382.
- Ruan, J., Zhang, F., Wong, M.H., (2000):** Effect of nitrogen form and phosphorus source on the growth, nutrient uptake and rhizosphere soil property of *Camellia sinensis* L. *Plant and Soil* 223, 63 - 71.
- Sakakibara, H., (2003):** Nitrate-specific and cytokinin-mediated nitrogen signaling pathways in plants. *Journal of Plant Resources* 116, 253 - 257.
- Schönherr, J., (1976):** Water permeability of isolated cuticular membranes: The effect of pH and cations on diffusion, hydrodynamic permeability and size of polar pores in the cutin matrix. *Planta* 128, 113 - 126.
- Schönherr, J., (2000):** Calcium chloride penetrates plant cuticles via aqueous pores. *Planta* 212, 112 - 118.
- Schönherr, J., (2002):** A mechanistic analysis of penetration of glyphosate salts across stomatous cuticular membranes. *Pest Management Science* 58, 343 - 351.
- Schönherr, J., Schreiber, L., (2004):** Size selectivity of aqueous pores in stomatous cuticular membranes isolated from *Populus canescens* (Aiton) Sm. leaves. *Planta* 219, 405 - 411.
- Schortemeyer, M., Feil, B., Stamp, P., (1993):** Root morphology and nitrogen uptake of maize simultaneously supplied with ammonium and nitrate in a split-root system. *Annals of Botany* 72, 107 - 115.
- Schortemeyer, M., Stamp, P., Feil, B., (1997):** Ammonium tolerance and carbohydrate status in maize cultivars. *Annals of Botany* 79, 25 - 30.

- Schreiber, L. (2005):** Polar paths of diffusion across plant cuticles: New evidence for an old hypothesis. *Annals of Botany* 95, 1069 - 1073.
- Serna, M.D., Borrás, R., Legaz, F., Primo – Millo, E., (1992):** The influence of nitrogen concentration and ammonium/nitrate ratio on N – uptake, mineral composition and yield of citrus. *Plant and Soil* 147, 13 - 23.
- Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., Ruth, T.J., Rufty Jr., T.W., (1990):** Studies of the uptake of nitrate in barley. *Plant Physiology* 93, 1426 - 1432.
- Smart, D.R., Bloom, A.D., (1998):** Investigations of ion absorption during NH_4^+ exposure I. Relationship between H^+ efflux and NO_3^- absorption. *Journal of Experimental Botany* 49: 95 - 100.
- Smiciklas, K.D., Below, F.E., (1992):** Role of cytokinin in enhanced productivity of maize supplied with NH_4^+ and NO_3^- . *Plant and Soil* 142, 307 – 313.
- Sommer, K., (2000):** „Cultan“ Cropping System: Fundamentals, state of development and perspectives. M. A. Martins – Loucão, S.H. Lips (Eds.), *Nitrogen in Sustainable Ecosystem: From the Cell to the Plant.*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 361 – 375.
- Sonoda, Y., Ikeda, A., Saiki, S., von Wirén, N., Yamaya, T., Yamaguchi, J., (2003):** Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1; 1 - 1;3*) in rice. *Plant and Cell Physiology* 44, 726 - 734.
- Stamp, P., Feil, B., Schortemeyer, M., Richner, W., (1997):** Responses of roots to low temperatures and nitrogen forms. H.M. Anderson *et al.* (Eds.), *Plant roots - from cells to systems*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 143 - 154.
- Steiner, H. Y., Naider, F., Becker, J.M., (1995):** The PTR family: a new group of peptide transporters. *Molecular Microbiology* 16, 825 - 834.
- Sýkorová, B., Kurešová, G., Daskalova, S., Trčková, M., Hoyerová, K., Raimanová, I., Motyka, V., Trávníčková, A., Elliott, M., Kamínek, M., (2008):** Senescence - induced ectopic expression of the *A. tumefaciens ipt* gene in wheat delays leaf senescence, increases cytokinin content, nitrate influx, and nitrate reductase activity, but does not affect grain yield. *Journal of Experimental Botany* 59, 377 - 387.

- Tahir, I.S.A., Nakata, N., (2005):** Remobilization of nitrogen and carbohydrate from stems of bread wheat in response to heat stress during grain filling. *Journal of Agronomy and Crop Science* 191, 106 – 115.
- Taiz, L., Zeiger, E., (2002):** *Plant Physiology*, Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Taylor, A.R., Bloom, A.J., (1998):** Ammonium, nitrate and proton fluxes along the maize root. *Plant, Cell and Environment* 21, 1255 - 1263.
- Thomas, H. (1978):** Enzymes of nitrogen mobilization in detached leaves of *Lolium temulentum* during senescence. *Planta* 142, 161 - 169.
- Tillard, P., Passama, L., Gojon, A., (1998):** Are phloem amino acids involved in the shoot to root control of NO_3^- uptake in *Ricinus communis* plants? *Journal of Experimental Botany* 49, 1371 - 1379.
- Tischner, R., (2000):** Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant, Cell and Environment* 21, 1005 - 1024.
- Tobin, A.K., Yamaya, T., (2001):** Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley. *Journal of Experimental Botany* 52, 591 - 604.
- Tong, Y., Zhou, J.J., Li, Z., Miller, A.J., (2000):** A two component high-affinity nitrate uptake system in barley. *Plant Journal* 41, 442 - 450.
- Touraine, B., Glass, A.D.M., (1997):** NO_3^- and ClO_3^- fluxes in the chl1-5 mutant of *Arabidopsis thaliana*: does the CHL1 gene encode a low-affinity NO_3^- transporter? *Plant Physiology* 114, 137 - 144.
- Trčková, M., Kamínek, M., (2000):** Nitrate uptake and nitrogen allocation in wheat as affected by exogenous cytokinins. M.A. Martins-Loução & S.H. Lips (Eds.) *Nitrogen in a sustainable ecosystem: From the cell to the plant*. Backhuys Publishers, Leiden, the Netherlands, 261 - 268.
- Trčková, M., Raimanová, I., Stehno, Z., (2005):** Differences among *Triticum dicoccum*, *T. monococcum* and *T. spelta* in rate of nitrate uptake. *Czech Journal of Genetic and Plant Breeding* 41 (Special Issue), (Book of Proceedings of the "5th International Triticeae Symposium", June 6-10, 2005, Prague, Czech Republic), 322 – 324.

- Trčková, M., Stehno, Z., Raimanová, I., (2006):** Nitrate uptake and N allocation in *Triticum aestivum* L. and *Triticum durum* Desf. seedlings. *Plant, Soil and Environment* 52, 88 - 96.
- Tsay, Y.F., Chiu, C.C., Tsai, C.B., Ho, C.H., Hsu, P.K., (2007):** Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters* 581, 2290 - 2300.
- Tsay, Y.F., Schroeder, J.I., Feldmann, K.A., Crawford, N.M., (1993):** The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* 72, 705 - 713.
- Tyree, M.T., Scherbatskoy, T.D., Tabor, C.A., (1990):** Leaf cuticles behave as asymmetric membranes. Evidence from the measurement of diffusion potential. *Plant Physiology* 92, 103 - 109.
- van der Leij, M., Smith, S.J., Miller, A.J., (1998):** Remobilization of vacuolar stored nitrate in barley roots. *Planta* 205, 64 - 72.
- von Wirén, N., Lauter, F.R., Ninnemann, O., Gillissen, B., Walch-Liu, P., Engels, C., Jost, W., Frommer, W.B., (2000):** Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. *The Plant Journal* 21, 167 - 175.
- Vidmar, J.J., Zhuo, D., Siddiqi, M.Y., Schjoerring, J.K., Touraine, B., Glass, A.D.M., (2000):** Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. *Plant Physiology* 123, 307 - 318.
- Wang, M.Y., Glass, A.D.M., Shaff, J.E., Kochian, L.V., (1994):** Ammonium uptake by rice roots. III. Electrophysiology. *Plant Physiology* 104, 899 - 906.
- Wang, M.Y., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., (1996):** Interactions between K^+ and NH_4^+ : Effects on ion uptake by rice roots. *Plant Cell and Environment* 19, 1037 - 1046.
- Wang, M.Y., Siddiqi, M.Y., Ruth, T.J., Glass, A.D.M., (1993a):** Ammonium uptake by rice roots. 1. Fluxes and subcellular distribution of $^{13}NH_4^+$. *Plant Physiology* 103, 1249 - 1258.
- Wang, M.Y., Siddiqi, M.Y., Ruth, T.J., Glass, A.D.M., (1993b):** Ammonium uptake by rice roots. 2. Kinetics of NH_4^+ - ^{13}N -Influx across the plasmalemma. *Plant Physiology* 103, 1259 - 1267.

- Wang, R., Liu, D., Crawford, N.M., (1998):** The *Arabidopsis* CHL1 protein plays a major role in high-affinity nitrate uptake. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 95, 15134 - 15139.
- Wang, R., Tischner, R., Gutierrez, R., Hoffman, M., Xing, X., Chen, M., Coruzzi, G., Crawford, N., (2004):** Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. Plant Physiology 136, 2512 - 2522.
- Wang, X.T., Below, F.E., (1995):** Tillering, nutrient accumulation, and yield of winter wheat is influenced by nitrogen form. Journal of Plant Nutrition 18, 1177 – 1189.
- Watson, C. J., Miller, H., Poland, P., Kilpatrick, D. J., Allen, M.D.B., Garret, M.K., Christianson, C.B., (1994):** Soil properties and the ability of the urease inhibitor N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (nBTPT) to reduce ammonia volatilization from surface-applied urea. Soil Biology and Biochemistry 26, 1165 - 1171.
- Wilson, M.R., O'Donoghue, S.I., Walker, N.A., (1988):** The transport and metabolism of urea in *Chara australis*: III. Two specific transport systems. Journal of Experimental Botany 39, 763 - 774.
- Wilson, M.R., Walker, N. A., (1988):** The transport and metabolism of urea in *Chara australis*. I. Passive diffusion, specific transport and metabolism of urea and methylurea. Journal of Experimental Botany 39, 739 - 751.
- Witte, C.P., Tiller, S.A., Tailor, M.A., Davies, H.V., (2002):** Leaf urea metabolism in potato: Urease activity profile and patterns of recovery and distribution of ¹⁵N after foliar urea application in wild type and urease-antisense transgenics. Plant Physiology 129, 1129 - 1136.
- Yan, F., Schubert, S., Mengel, K., (1992):** Effect of low root medium pH on net proton release, root respiration, and root growth of corn (*Zea mays* L.) and broad bean (*Vicia faba* L.). Plant Physiology 99, 415 - 421.
- Yang, J, Zhang, J., (2006):** Grain filling of cereals under soil drying. New Phytologist 169, 223 - 236.

Yin, L.P., Li, P., Wen, B., Taylor, D., Berry, J.O., (2007): Charakterization and expression of a high-affinity nitrate system transporter gene (*TaNRT2.1*) from wheat roots, and its evolutionary relationship to other NRT2 genes. *Plant Science* 172, 621 - 631.

Yuan, L., Loqué, D., Kojima, S., Rauch, S., Ishiyama, K., Inoue, E., Takahashi, H., von Wirén, N. (2007): The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. *The Plant Cell* 19, 2636 - 2652.

Zoldos, F., Vashegyi, A., Pecsvaradi, A., Haunold, E., Herger, P., (1999): Nitrate and nitrite transport into cereals affected by low pH and different temperatures. *Cereal Research Communication* 27 (4), 403 - 409.

Zhuo, D., Okamoto, M., Vidmar, J.J., Glass, A.D.M., (1999): Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (*Nrt2;1At*) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 17, 563 - 568.

Zhu, Z., Gerendás, J., Bendixen, R., Schinner, K., Tabrizi, H., Sattelmacher, B., Hansen, U.P., (2000): Different tolerance to light stress in NO_3^- - and NH_4^+ - grown *Phaseolus vulgaris* L.. *Plant Biology* 2, 558 - 570.

Zonia, L.E., Stebbins, N.E., Polacco, J.C., (1995): Essential role of urease in germination of nitrogen – limited *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Physiology* 107, 1097 – 1103.