

VLIV BRASSINOSTEROIDŮ NA VÝŠKOVÝ PŘÍRŮST, FLUORESCENCI CHLOROFYLU A MORTALITU SAZENIC SMRKU ZTEPILÉHO A BOROVICE LESNÍ V PODMÍNKÁCH LESNÍ ŠKOLKY

INFLUENCE OF BRASSINOSTEROIDS ON HEIGHT INCREMENT, CHLOROPHYLL FLUORESCENCE AND MORTALITY OF SEEDLINGS OF NORWAY SPRUCE AND SCOTS PINE IN FOREST NURSERY CONDITIONS

OLGA NOVÁKOVÁ¹⁾ - JOSEF GALLO¹⁾ - MARTIN BALÁŠ¹⁾ - ONDŘEJ ŠPULÁK²⁾ - IVAN KUNEŠ¹⁾

¹⁾Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta lesnická a dřevařská, Kamýcká 129, CZ - 165 21 Praha 6

²⁾Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., Výzkumná stanice Opočno

✉ e-mail: balas@fld.czu.cz

ABSTRACT

The study was aimed to investigate the effects of a brassinosteroid compound (BR) on coniferous planting stock. The solution of 2 α ,3 α ,17 β -trihydroxy-5 α -androstan-6-one was applied onto 2-year-old seedlings of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in three doses: low (N) (0.4 mg·ha⁻¹), medium (S) (4 mg·ha⁻¹) and high (V) (40 mg·ha⁻¹). The control (K) was without any application of BR. One growth season after application, we assessed mortality rate, height increment, and for spruce also chlorophyll fluorescence. For Scots pine, there was a trend of decreasing mortality rate with increasing concentration of BR (significant differences). For Norway spruce, however, the effects of BR application on mortality rate were rather inconsistent. In case of Scots pine, the control treatment showed the best performance in terms of height increment, which was significantly higher in comparison with low and medium BR concentrations. As for Norway spruce, there were no convincing results indicating positive effect of BR on height growth, however, there was a pattern of S treatment performing best, and N treatment performing the least. Similarly in the analysis of chlorophyll *a* fluorescence in spruce foliage, there was no significance. Parameter S_m/t_{Fmax} was lowest in control treatment. In general, some significant differences in growth and mortality rate of Norway spruce and Scots pine seedlings after the BR application were indicated in this study. Our results, however, cannot verify a real profit of the tested BR application for commercial production of planting stock of Norway spruce and Scots pine in forest nurseries.

Klíčová slova: brassinosteroidy, rostlinné hormony, prosperita, *Picea abies*, *Pinus sylvestris*

Key words: brassinosteroids, plant hormones, performance, *Picea abies*, *Pinus sylvestris*

ÚVOD

Brassinosteroidy (v obecném významu ve zkratce BRs) jsou druhem fytohormonů, patří do třídy polyhydroxysteroidů. Hrají zásadní roli ve vývoji rostlin. BRs byly nalezeny v nízkých koncentracích v celé rostlinné říši ve všech rostlinných orgánech (pyl, semena, listy, kořeny, květy atd.) a také v hmyzích hálkách, jak ve svém literárním přehledu uvádí např. BAJGUZ (2011). Poprvé byly izolovány z pylu brukve řepky (*Brassica napus* L.) (GROVE et al. 1979; CORTES et al. 2003; HRADECKÁ et al. 2009). Mladá rostlinná pletiva mají vyšší obsah BRs než dospělá (RAO et al. 2002). Nejvyšší obsah BRs lze nalézt v pylu a v pletivech nedozrálých semen, a to v rozmezí 1–100 μ g na 1 kg čerstvého rostlinného pletiva. Strukturně jsou podobné steroidním hormonům zvířat a hmyzu (BAJGUZ 2011). Výzkumné studie účinků BRs na rostliny ukázaly, že vyvolávají široké spektrum fyziologických a morfolo- gických reakcí v rostlinách, např. prodloužení stonku či listů, epinastii, která způsobuje ohyb rostlinného orgánu (BAJGUZ, HAYAT 2009; BAJGUZ 2011), zahájení kvetení, vývoj plodů a květů (HAYAT, AHMAD 2003), indukci biosyntézy etylenu, aktivaci protonové pumpy, regula-

ci sacharidů nebo aktivaci fotosyntézy (BAJGUZ, HAYAT 2009; BAJGUZ 2011). BRs také dokáží chránit rostliny proti řadě stresů, jako je sucho, extrémní teploty, extrémní zasolení či útoky patogenů (CLOUSE, SASSE 1998; DIVI et al. 2010).

Mechanismus, jakým tyto fytohormony upravují toleranci rostlin ke stresu, není dosud zcela objasněn (MAZZORRA 2011). BAJGUZ, HAYAT (2009) zmiňují ve své literární rešerši existenci interakce mezi BRs a ostatními fytohormony a popisují působení BRs při jednotlivých typech stresů, zejména při stresu suchem. Na význam exogenní aplikace BRs na stresované rostliny oproti rostlinám pěstovaným v optimálních podmínkách poukazují např. ALI et al. (2006), BEHNAMNIA et al. (2009) a FARIDUDDIN et al. (2009).

Sazenice lesních dřevin mohou být i v lesních školkách stresovány mj. nízkými teplotami a mrazy. Teplota vzduchu v jarním období v zóně mírného pásu (kam patří také Česká republika) často klesá i pod bod mrazu, což poškozuje mladé vyvíjející se listy, které mají malou odolnost proti těmto stresovým událostem (LARCHER, HÄCKEL 1985). Aplikace BRs by mohla rostlinám pomoci tento teplotní stres překonat.

BROSA (1999) zmiňuje, že BRs jsou přírodní, netoxické látky, které se aplikují ve velmi malých dávkách, a jsou tedy ohleduplné k životnímu prostředí. Problematika využití BRs je v současné době řešena zejména v zemědělství (např. VARDHINI, RAO 1998, 2003; ANNURADHA, RAO 2001; HRADECKÁ et al. 2009; DIVI et al. 2010). Z výzkumů vyplynulo, že BRs měly pozitivní (dynamický) vliv na prodloužení stonku, včetně podpory epikotylu, hypokotylu, koleoptile a mezokotylu u dvouděložných rostlin (MANDAVA 1988). Dále bylo prokázáno, že BRs mají pozitivní vliv na klíčení semen u zemědělských plodin (ARTECY 1996). HONG et al. (2005) uvádějí možnost uplatňování BRs v produkčním lesnictví. Naskytá se zde ovšem problém s nedostatkem zkušeností s účinky BRs na lesní dřeviny. V Evropě v podstatě doposud neproběhl žádný intenzivní výzkum se zaměřením na problematiku exogenní aplikace BRs a jejich vlivů na lesní dřeviny.

Předkládaná studie patří do skupiny příspěvků, kterými se autorský tým uvedenou problematiku snaží v kontextu evropského lesnictví otevřít a potenciál BRs ověřit. Cílem tohoto příspěvku bylo porovnat vliv synteticky připravené BR sloučeniny, aplikované v roztocích o různých koncentracích na sazenice smrku ztepilého (*Picea abies* L.) Karst., dále jen SM) a borovice lesní (*Pinus sylvestris* L., dále jen BO) při přesazování v lesních školkách. Posuzována byla následná mortalita, výškový přírůst a fluorescence chlorofylu.

MATERIÁL A METODIKA

Variety pokusu a biometrická měření

Na jaře 2011 byly založeny pokusy v lesních školkách Čikov, Klášterec nad Ohří a Tišice (tab. 1). Roztok brassinosteroidu (ve zkratce BR, chemický vzorec: $2\alpha,3\alpha,17\beta$ -trihydroxy-5 α -androstan-6-one), syntetického analogu epibrassinolidu (KOHOUT et al. 2003, 2004), byl aplikován na dvouleté sazenice SM a BO ve třech dávkách, respektive koncentracích:

- nízká koncentrace (dále označeno jako N): 0,4 mg·ha⁻¹ aplikované jako vodný roztok o koncentraci 0,002 mg·l⁻¹
- střední (S): 4 mg·ha⁻¹ aplikované jako roztok 0,02 mg·l⁻¹
- vysoká (V): 40 mg·ha⁻¹ aplikované jako roztok 0,2 mg·l⁻¹

Dále byla vylíšena varianta kontrolní (K), bez aplikovaného roztoku brassinosteroidu. Roztok byl aplikován dva týdny před školkováním prostřednictvím postřiku záhonu se sazenicemi. Po přeškolení

byly jednotlivé varianty na záhonech uspořádány do sekcí, tzn. že na záhonech o šířce cca 1,5 m se střídaly cca 2m úseky záhonu s jednotlivými variantami, přičemž každá varianta byla na ploše záhonu třikrát opakována. Uvedené uspořádání se na záhonech s minerální půdou opakovalo ve školkách Čikov a Tišice. Pouze ve škole Klášterec nad Ohří byly sazenice vysazeny do rašelinocelulósových kelímků (RCK) a v pěstebním prostoru opět uspořádány do sekcí po třech opakováních. V září 2011 byla u jednotlivých variant zjištěna mortalita a dále proběhlo měření výškového přírůstu sazenic s přesností na mm. Na sazenicích smrku ztepilého pěstovaných v lesní školce Klášterec nad Ohří byly měřeny také vybrané parametry fluorescence chlorofylu.

Měření fluorescence chlorofylu

Měření bylo provedeno u sazenic smrku ztepilého pocházejících z lesní školky Klášterec nad Ohří. Před měřením byly obalované vzorníky sazenic přeneseny do laboratoře a adaptovány na tamní teplotní podmínky. Fluorescence chlorofylu *a* byla měřena na svrchní straně jehličí letorostů z horní části korunky (mimo terminál) přístrojem Plant Efficiency Analyser (PEA, firma Hansatech Instruments Ltd., Kings Lynn, UK). Z měření byly vyloučeny chřadnoucí sazenice. Z dalších bylo náhodně vybráno 15 jedinců SM na variantu, každý vzorník byl měřen dvakrát.

Před měřením byly vzorky minimálně 30 minut stíněny originálními klipsami v zatemnělé místnosti. Pro testování byla intenzita záření nastavena na 50 % (2 100 mmol·m⁻²·s⁻¹). Hodnocen byl parametr *maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II* pletiva adaptovaného na tmu (F_v/F_m). Tento parametr byl vypočítán z hodnot maximální fluorescence (F_m) a minimální fluorescence (intenzita fluorescence v 50 μ s; F_0), jejichž rozdíl je označován jako variabilní fluorescence ($F_v = F_m - F_0$). Hodnota F_v/F_m byla dopočítána obslužným softwarem (WinPEA32 v1.0) podle vztahu:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m \quad (1)$$

Dále byly hodnoceny parametry popisující tvar křivky nástupu fluorescence (fluorescence transient – STRASSER et al. 2000). Následně byl vypočten parametr *normalizovaná plocha (normalized area growth above the fast fluorescence rise)*, (S_m), podle vztahu:

$$S_m = \frac{\text{Area}}{(F_m - F_0)} \quad (2)$$

Tab. 1.

Podrobné informace o lesních školkách a vysazených sazenicích
Characteristics of forest nurseries and seedlings

	Lesní školka ¹		
	Čikov	Klášteřec nad Ohří	Tišice
GPS souřadnice ²	N 49°16,19' E 16°08,47'	N 50°23,34' E 13°10,97'	N 50°16,30' E 14°33,22'
Nadmořská výška [m] ³	471	320	167
Druh ⁴	SM	SM	BO, SM
Počet sazenic [ks] ⁵	5 000	2 000	1 000 (BO) 1 000 (SM)
Sledované biometrické parametry ⁶	výškový přírůst ⁷ mortalita ⁸	výškový přírůst mortalita fluorescence chlorofylu ⁹	výškový přírůst mortalita

¹Forest nursery; ²GPS coordinates (WGS84); ³Altitude [m ASL]; ⁴Tree species; ⁵Number of seedlings [pcs]; ⁶Assessed biometrical parameters; ⁷Height increment; ⁸Mortality; ⁹Chlorophyll fluorescence; SM – Norway spruce; BO – Scots pine

kde:

$$\text{Area} = \int_0^{t_{F_{\max}}} (F_M - F_0) * dt \quad (3)$$

Dále byl zjišťován čas dosažení maximální fluorescence ($t_{F_{\max}}$) a poměr $S_m/t_{F_{\max}}$, vyjadřující průměrnou část otevřených reakčních center během času potřebného k jejich úplnému uzavření, umožňující kvantifikovat aktivitu transportu elektronů (nomenklatura podle VAN KOOTEN, SNEL 1990).

Vitalita rostlin byla charakterizována parametrem *index výkonnosti* (*performance index on absorption basis*, PI_{abs} , STRASSER et al. 2004), vypočteným podle vztahu:

$$PI_{\text{abs}} = \frac{1 - (F_0/F_M)}{M_0/V_j} \times \frac{F_M - F_0}{F_0} \times \frac{1 - V_j}{V_j} \quad (4)$$

kde:

V_j je relativní variabilní fluorescence v čase 2 ms, vypočtená jako:

$$V_j = (F_j - F_0)/(F_M - F_0) \quad (5)$$

kde:

F_j je intenzita fluorescence v čase 2 ms (tzv. krok J). M_0 reprezentuje počáteční sklon křivky průběhu fluorescence (*fluorescence kinetics*) a je vypočten podle vztahu:

$$M_0 = 4 * (F_{300\mu s} - F_0)/(F_M - F_0) \quad (6)$$

kde $F_{300\mu s}$ je intenzita fluorescence v čase 300 μs .

Zpracování dat

Morfologická data byla zpracována ve statistickém programu STATISTICA 12 (StatSoft) pomocí Kruskalova-Wallisova testu a následného mnohonásobného porovnávání. Mortalita byla testována ve statistickém programu R (*R Foundation for Statistical Computing*) pomocí testu homogenity binomických rozdělení. Možnosti použití tohoto testu uvádí např. AGRESTI et al. (2008).

Zpracování dat z měření fluorescence chlorofylu bylo provedeno v programech WinPEA32, MS Excel a R. Po vyloučení chybných měření na základě ověření reálnosti hodnot s ohledem na charakter dat byly vypočteny průměry za jednotlivé sazenice (chybné měření může nastat, např. pokud je měření provedeno na lokálním poškození listu, resp. jehlice). Dále byly ověřeny výběrové předpoklady a jednotlivé varianty byly vzájemně statisticky porovnávány pomocí jednofaktorové analýzy variance (ANOVA) a Tukeyova post-hoc testu nebo Kruska-

lova-Wallisova testu a příslušného mnohonásobného porovnávání. Rozdíly mezi variantami byly u všech testů považovány za průkazné, jestliže $p \leq 0,05$.

VÝSLEDKY

Mortalita

Mortalita sazenic je uvedena v tab. 2. V lesní školce Čikov byla mortalita SM nejnižší u varianty K (kontrola) – (2,0 %), nejvyšší u varianty S (střední) – (5,7 %). V Klášterci nad Ohří byla průkazně nejnižší mortalita zjištěna u varianty N (nizká, 1,3 %) oproti K (kontrola, 4,4 %) a S (střední, 3,7 %). Mezi mortalitou SM u jednotlivých testovaných variant v lesní školce Tišice nebyl zjištěn žádný statisticky průkazný rozdíl; mortalita byla celkově nízká (max. 1,02 %).

U BO v lesní školce Tišice byla mortalita průkazně odlišná u všech testovaných variant. Nejnižší byla u varianty V (vysoká) a dále byla zaznamenána zvyšující se mortalita v závislosti na poklesu dávky BR.

Výškový přírůst

Výškový přírůst sazenic zjištěný v jednotlivých lesních školkách je uveden na obr. 1 a 2.

V případě průměrného přírůstu BO (obr. 1) byl zjištěn průkazně vyšší přírůst u varianty K oproti variantám N ($p = 0,004$) a S ($p = 0,010$). Rozdíl ve velikosti průměrného přírůstu mezi variantami K – N činil 11,6 % (tj. varianta N byla o 11,6 % menší než var. K), resp. 9,7 % mezi variantami K – S. Rozdíl mezi variantami K – V byl neprůkazný (4,0 %).

Průměrný výškový přírůst SM ve školce Čikov (obr. 2) byl průkazně odlišný mezi variantami K – S ($p = 0,002$), dále mezi N – S ($p < 0,001$) a N – V ($p = 0,032$). Varianta S vykazovala nejvyšší průměrný výškový přírůst (4,7 cm), N nejnižší (4,3 cm). Rozdíl v průměrném přírůstu mezi variantami K – S činil 7,6 %, resp. 4,8 % mezi variantami K – V. Rozdíly výškového přírůstu SM ve školce Kláštrec nad Ohří (obr. 2) nebyly průkazné. Průměrný přírůst v rámci jednotlivých variant byl velmi vyrovnaný a pohyboval se mezi 6,0 a 6,2 cm.

Průměrný výškový přírůst SM ve školce Tišice (obr. 2) byl průkazně vyšší u variant S a V oproti variantám N a K. Rozdíly byly zjištěny mezi těmito variantami: K – S ($p = 0,001$) a K – V ($p < 0,001$), N – S ($p < 0,001$), N – V ($p < 0,001$). Varianty ošetřené BRs střední (S) a vysoká (V) měly tedy průkazně vyšší přírůst než varianty N a K. Rozdíl ve velikosti průměrného přírůstu mezi variantami K – S byl 21,1 %, mezi K – V 14,7 %. Rozdíl mezi variantami K – N nebyl průkazný (varianta K byla o 8,1 % vyšší než N).

Tab. 2.

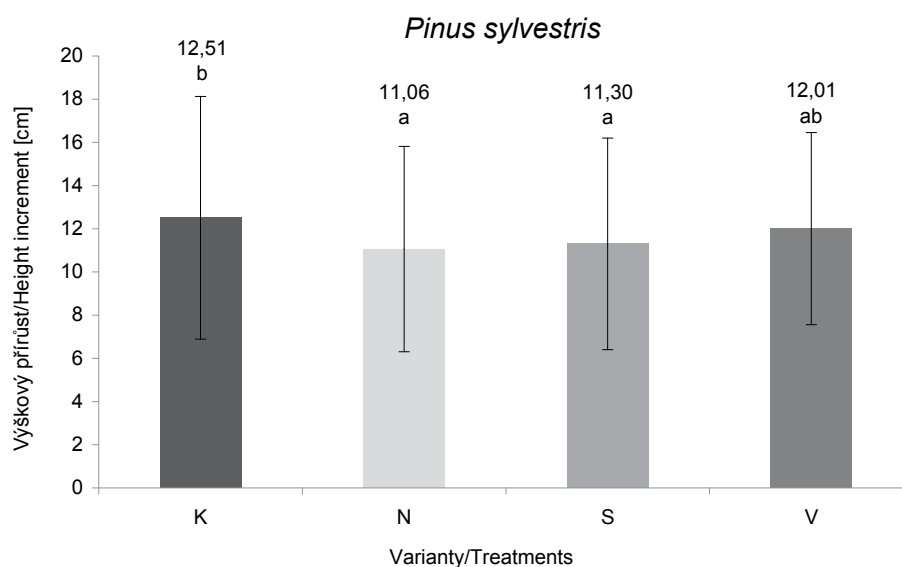
Mortalita sazenic v jednotlivých lesních školkách (%). Písmena (po řádcích) značí příslušnost ke statisticky homogenním skupinám. Statisticky jsou porovnávány varianty různých koncentrací v rámci jednotlivých lesních školek

Mortality rate of seedlings in the monitored forest nurseries (%). Letters denote the statistically homogeneous groups (in rows). The treatments of different concentrations within the particular forest nurseries are tested

Lesní školka ¹	Varianta ²			
	kontrola ³	nizká ⁴	střední ⁵	vysoká ⁶
Čikov <i>Picea abies</i>	1,95 a	4,31 bc	5,72 c	3,29 ab
Kláštrec nad Ohří <i>Picea abies</i>	4,38 b	1,33 a	3,71 b	2,77 ab
Tišice <i>Picea abies</i>	0,35 a	0,72 a	1,02 a	0,35 a
Tišice <i>Pinus sylvestris</i>	28,34 d	23,15 c	14,29 b	3,16 a

¹Forest nursery; ²Treatment; ³Control (K); ⁴Low concentration (N); ⁵Medium concentration (S);

⁶High concentration (V)

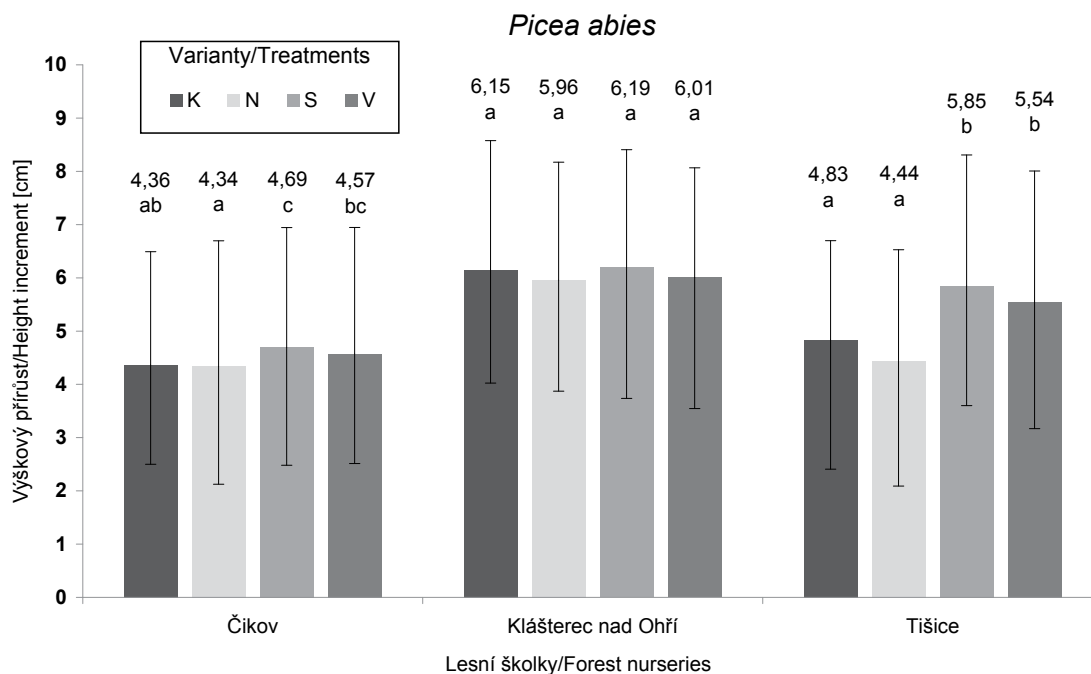


Obr. 1.

Průměrné hodnoty výškového přírůstu borovice lesní u tří variant koncentrací BR a kontroly v lesní školce Tišice. Chybové úsečky zobrazují směrodatné odchylky. Písmena značí příslušnost ke skupinám statistické homogenity

Fig. 1.

Mean height increment of Scots pine in three BR treatments and control treatment in experimental forest nursery plantations. Error bars denote standard deviation. Letters denote the statistically homogeneous groups



Obr. 2.

Průměrný výškový přírůst smrku ztepilého na pokusných školkách u tří variant koncentrací BR a kontroly. Chybové úsečky zobrazují směrodatné odchylky. Písmena značí příslušnost ke skupinám statistické homogenity. Testovány jsou varianty různých koncentrací v rámci jednotlivých lesních školek

Fig. 2.

Mean height increment of Norway spruce in three BR treatments and control treatment in experimental forest nursery plantations. Error bars denote standard deviation. Letters denote the statistically homogeneous groups. The treatments of different concentrations within the particular forest nurseries are tested

Fluorescence chlorofylu

Rozdíly času dosažení maximální fluorescence ($t_{F_{max}}$) nebyly průkazné (tab. 3). Dále lze pozorovat trend snižování průměrných hodnot parametru normalizovaná plocha (S_m) s klesající koncentrací BR (ve většině případů průkazně odlišné hodnoty). Poměr výše uvedených veličin ($S_m/t_{F_{max}}$) byl průkazně nejnižší u kontrolní varianty. V indexu výkonnosti (PI_{abs}) se průkazně lišila varianta K s nejnižšími hodnotami a varianta V s hodnotami nejvyššími.

DISKUSE

Cílem této studie bylo ověřit vliv exogenní aplikace tří různých koncentrací synteticky připraveného brassinosteroidu (BR) na přírůstek, mortalitu a charakteristiky fluorescence chlorofylu sazenic smrku ztepilého (SM) a borovice lesní (BO) v podmínkách lesní školky.

MANDAVA (1988), RAO et al. (2002), PEREIRA-NETTO et al. (2006) a BAJGUZ (2007) ve svých výzkumech zmiňují pozitivní vliv brassinosteroidů (BRs) na stimulaci prodloužení stonku u mnoha převážně zemědělských rostlin. Dle práce Khripacha a kol. (KHRIPACH et al. 2000) se typická aplikační dávka používaná v zemědělství pohybuje v rozmezí 5 až 50 mg BRs na hektar produkční plochy. Námi použité aplikační dávky byly v rozmezí 0,4–40 mg·ha⁻¹.

Používané aplikační dávky a koncentrace BRs se značně odlišují mezi různými studii a také mezi jednotlivými variantami v rámci jedné studie. Navíc množství BRs je definováno pomocí různých jednotek. Konkrétně např. JANEZKO et al. (2007) uvádějí rozpětí koncentrací BRs cca 24–480 µg·l⁻¹ (uvedeno jako 0,05–1 µM), KORABLEVA et al. (2002) používají koncentrace 1–10 µg·l⁻¹. Přestože se uvedené koncentrace řádově liší, všechny měly v citovaných studiích pozitivní vliv na stresovou toleranci rostlin.

Např. PRUŠÁKOVÁ et al. (1995) informovala rovněž o zvětšení průměru stonku ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.) a s ním souvisejícím zvýšením jeho odolnosti proti poléhání po aplikaci BRs. Aplikace 24-epibrassinolidu na ječmen setý (*Hordeum vulgare*) v dávkách 5–15 mg·ha⁻¹ významně snížila rozsah listových chorob vyvolaných smíšenou mykotickou infekcí (PSHENICHNAYA et al. 1997).

Účinkům aplikace BRs na dřeviny se věnovali LI et al. (2008), kteří testovali vliv BRs na sazenicích trnovníku akátu (*Robinia pseudoacacia* L.), jež byly před výsadbou namáčeny v roztoku s BRs v koncentraci 0–0,4 mg·l⁻¹. Tato studie udává, že u sazenic došlo jak k výraz-

nému zvýšení růstu, tak k jejich vyšší odolnosti proti stresům. Nejlepší výsledky byly dosaženy při použití roztoku s BRs o koncentraci 0,2 mg·l⁻¹.

U rostlin však byly zaznamenány i nežádoucí účinky po aplikaci BRs, mezi něž patří zakřivení, otok nebo prasknutí rostliny. MANDAVA, THOMPSON (1984) uvádějí, že aplikace brassinosteroidů u stonkových řízků druhu *Phaseolus vulgaris* způsobila prodloužení, zakřivení a otok při dávce nižší než 0,01 µg a prasknutí stonku v množství vyšším než 0,1 µg. Dále KIM et al. (1994) uvádějí, že aplikace BRs měla inhibiční účinek na růst hypokotylu salátu setého. Deformace růstu ošetřených variant v našem případě zaznamenány nebyly, o inhibičním účinku BR na výškový růst by bylo možné uvažovat u testované borovice (obr. 1), ale reálné rozdíly mezi kontrolou a ošetřenými variantami byly přes statistickou průkaznost jen malé.

V námi provedené studii vlivu aplikace BR byla průkazně nejvyšší mortalita sazenic BO zjištěna u kontrolní (K) varianty (24,4 %), přičemž aplikace BR tuto mortalitu výrazně snížila (tab. 2). U sazenic SM procentuální hodnoty mortality kolísaly mezi jednotlivými použitými koncentracemi a lesními školkami (tab. 2), přičemž mortalita až na výjimky vykazovala jen velmi nízké hodnoty.

V případě BO výsledky naznačují mírně negativní růstovou odezvu na aplikaci BR, což v praktickém pohledu může být více než kompenzováno výrazně sníženou mortalitou BO po aplikaci BR. Tuto skutečnost bude však nutné dále ověřovat, neboť z porovnání s jinou, podobnou studií autorského kolektivu, zaměřenou na výsadbu borovice na bývalé zemědělské půdě (NOVÁKOVÁ et al. 2014), vyplývají podobné výsledky v případě výškového přírůstu, a naopak v případě mortality jsou výsledky odlišné.

U SM vykazovaly nejvyšší dosažený výškový přírůstek ve všech lesních školkách sazenice ošetřené roztokem o koncentraci střední (S), i když rozdíly nebyly vždy průkazné (obr. 2). Rozdíly oproti variantě K se na konci první vegetační doby po aplikaci pohybovaly v řádu milimetrů a neměly reálný produkční význam.

BEČKA et al. (2007) uvádí, že BRs měnily fluorescenční parametry listů řepky ozimé (*Brassica napus*) a v relaci s nimi i energetickou bilanci fotosyntézy. Tyto závěry korespondují s námi dosaženými výsledky při měření fluorescence chlorofylu u smrkových sazenic (tab. 3). JONÁŠ et al. (2012) pozorovali mírné zvýšení maximálního kvantového výtěžku fotochemie PSII (F_v/F_m) při postřiku rostlin (hybridů z rodu *Philadelphus*) 24-epibrasinolidem v koncentracích 0,01 mg·l⁻¹, 0,1 mg·l⁻¹

Tab. 3.

Vybrané parametry charakterizující fluorescenci chlorofylu smrkových sazenic (průměr a směrodatná odchylka). Písmena značí příslušnost ke skupinám statistické homogenity (po sloupcích); ANOVA a Tukey post-hoc test, v případě parametru PI_{abs} Kruskalův-Wallisův test a příslušné mnohonásobné porovnávání

Selected parameters characterizing chlorophyll fluorescence of spruce seedlings (mean and standard deviation). Letters denote the statistically homogeneous groups (in columns)

Varianta ¹		F_v/F_m	$t_{F_{max}}$ [ms]	S_m	$S_m/t_{F_{max}}$	PI_{abs}
kontrola ²	průměr ⁶	0,824 a	332,6 a	31,84 a	0,0959 a	4,93 a
	sm. odch. ⁷	0,014	27,1	3,07	0,0072	1,53
nízká ³	průměr	0,832 a	328,9 a	33,99 ab	0,1036 b	6,32 ab
	sm. odch.	0,010	20,0	2,08	0,0078	2,04
střední ⁴	průměr	0,826 a	335,2 a	34,26 b	0,1024 b	5,54 ab
	sm. odch.	0,006	20,8	2,03	0,0042	0,68
vysoká ⁵	průměr	0,829 a	347,2 a	37,01 c	0,1067 b	6,71 b
	sm. odch.	0,009	20,9	2,42	0,0056	1,54

¹Treatment; ²Control (K); ³Low concentration (N); ⁴Medium concentration (S); ⁵High concentration (V);

⁶Mean; ⁷Standard deviation

a 1 mg.l^{-1} . Naproti tomu v naší studii nebyl mezi středními hodnotami F/F_m jednotlivých variant zjištěn rozdíl, parametry popisující tvar křivky rychlé fluorescence byly však odlišné. Zvyšující se parametr S_m se vzrůstající koncentrací BRs, stejně tak jako nárůst poměru $S_m/t_{F_{max}}$, poukazuje na zvýšení aktivity transportu elektronů mimo plastochinon QA' (STRASSER et al. 2000) (tab. 3). U ošetřených sazenic smrku v našem experimentu vzrostl také parametr PI_{abs} , hodnotící celkový fotosyntetický výkon rostliny (průkazně pouze u varianty V). Díky své komplexnosti je PI_{abs} citlivým parametrem na stresové zatížení dřevin (např. VOLGUSHEVA et al. 2011). Zvýšení fotosyntetického výkonu, který přirozeně klesá se senescencí asimilačního aparátu (LEPEDUŠ et al. 2010), by mohlo mít vliv na účinnost fotosyntézy v následující vegetační sezóně.

Výsledky naší studie naznačují, že každý druh dřevin může na aplikace BRs reagovat jinak, důležitá je také aplikační dávka. Tyto poznatky jsou v souladu s poznatky Gomese (GOMES 2011), který uvádí, že míra účinků BRs pravděpodobně závisí na druhu rostliny, na kterou jsou aplikovány, přičemž dalšími důležitými faktory, jež mají rozhodující vliv na účinnost BRs, jsou koncentrace roztoku, dávka a načasování. Vzhledem k tomu, že BRs by měly rostlinám pomáhat při překonávání různých forem stresu (BAJGUZ, HAYAT 2009), lze očekávat, že v podmínkách lesní školky, kde se nepředpokládá existence výrazných stresových faktorů, se účinky BRs mohou projevit méně výrazně.

Cílem této studie bylo obdržet prvotní informaci o účinku aplikace syntetického brassinosteroidu v podmínkách lesní školky. Statistickou analýzou byly zjištěny určité průkazné rozdíly. S výjimkou redukce mortality u BO, kterou je ale třeba ověřit i v podmínkách jiných školek, nebudou z pohledu praktického lesního školkařství zjištěné rozdíly (pro SM a BO) zřejmě provozně zajímavé. Není však vyloučeno, že při jiných okolnostech (koncentrace, způsob aplikace, druh dřeviny, růstové podmínky apod.) bude mít aplikace BRs účinek odlišný.

ZÁVĚR

Naše výsledky dokumentují, že efekt aplikace roztoku brassinosteroidu (BR) na sazenice lesních dřevin může být rozdílný v závislosti na druhu dřeviny, sledovaném parametru i na podmínkách školky. Z pohledu statistického vyhodnocení byl v případě borovice lesní potvrzen výrazný pozitivní vliv zvyšující se koncentrace BR na snížení mortality. Efekt BR na přírůst borovice byl ale inhibující, i když absolutní rozdíly mezi variantami byly minimální. U smrku ztepilého nebyl zjištěn konzistentní vliv aplikace roztoku BR na mortalitu, účinek se lišil podle školky. Určitá pozitivní přírůstová odezva smrku na aplikaci BR (varianta S) byla indikována na lokalitách Tišice a Čikov. Zjištěné rozdíly jsou ale i zde přes dílčí statistickou průkaznost z praktického pohledu pouze malé.

Z praktického pohledu představovalo nejvýraznější pozitivní efekt námi testované aplikace BR výrazné snížení mortality borovice. Výsledky týkající se borovice jsou ale k dispozici pouze z jedné lesní školky a nejsou konzistentní s diskutovanou podobnou studií autorského kolektivu. Obecnější doporučení ohledně postřiku sazenic SM a BO testovaným brassinosteroidem před školkováním za účelem zlepšení jejich přežívání a růstu tedy předkládaná studie nemůže dostatečně podložit.

Výsledky z měření fluorescence chlorofylu naznačují vyšší fotosyntetický potenciál ošetřených variant smrku, přičemž varianta V měla tento potenciál nejvyšší.

Při dalším výzkumu vlivu BRs na sazenice lesních dřevin bude potřebné se podrobněji zaměřit na velikost a načasování aplikačních dávek a jejich opakování a rozšířit spektrum testovaných druhů lesních dřevin i období sledování.

Poděkování:

Příspěvek vznikl za finanční podpory Celouniverzitní interní grantové agentury České zemědělské univerzity v Praze, projekt CIGA č. 20124304.

LITERATURA

- AGRESTI A., BINI M., BERTACCINI B., RYU E. 2008. Simultaneous confidence intervals for comparing binomial parameters. *Biometrics*, 64: 1270–1275.
- ALI B., HAYAT S., HASAN S.A., AHMAD A. 2006. Effect of root applied 28-homobrassinolide on the performance of *Lycopersicon esculentum*. *Scientia Horticulturae*, 110: 267–273.
- ANURADHA S., RAO R.S. 2001. Effect of brassinosteroids on salinity stress induced inhibition of seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regulation*, 33: 151–153.
- ARTECY N.R. 1996. *Plant growth substances, principles and applications*. New York, Chapman & Hall: 332 s.
- BAJGUZ A. 2007. Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 95–107.
- BAJGUZ A., HAYAT S. 2009. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 1–8.
- BAJGUZ A. 2011. Brassinosteroids – occurrence and chemical structures in plants. In: Hayat S., Ahmad A. (eds): *Brassinosteroids: a class of plant hormone*. Dordrecht, Springer: 1–27.
- BEČKA D., VAŠÁK J., ZUKALOVÁ H., MIKŠÍK V. 2007. *Řepka ozimá: pěstitelský rádce*. České Budějovice, Kurent: 56 s.
- BEHNAMNIA M., KALANTARI K.M., REZANEJAD F. 2009. Exogenous application of brassinosteroid alleviates drought-induced oxidative stress in *Lycopersicon esculentum* L. *General and Applied Plant Physiology*, 35 (1–2): 22–34.
- BROSA D. 1999. Biological effects of brassinosteroids. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 34: 339–358.
- CLOUSE S.D., SASSE J.M. 1998. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 427–451. DOI: 10.1146/annurev.arplant.49.1.427
- CORTES P.A., TERRAZAS T., LEON T.C., LARQUE-SAAVEDRA A. 2003. Brassinosteroid effects on the precocity and yield of cladodes of cactus pear (*Opuntia ficusindica* (L.) Mill.). *Scientia Horticulturae*, 97: 65–73.
- DIVI K.U., RAHMAT T., KRISHNA P. 2010. Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BMC Plant Biology*, 10: 151. DOI: 10.1186/1471-2229-10-151
- FARIDUDDIN Q., KHANAM S., HASAN S.A., ALI B., HAYAT S., AHMAD A. 2009. Effect of 28-homobrassinolide on the drought stress-induced changes in photosynthesis and antioxidant system of *Brassica juncea* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31: 889–897.
- GOMES M.M.A. 2011. Physiological effects related to brassinosteroid application in plants. In: Hayat S. and Ahmad A. (eds): *Brassinosteroids: a class of plant hormone*. Dordrecht, Springer: 193–242.
- GROVE M.D., SPENCER G.F., ROHWEDDER W.K., MANDAVA N., WORLEY J.F., WARTHEN J.D., STECENS G.L., FLIPPEN-ANDERSON J.L., COOK J.C. 1979. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature*, 281: 216–217.
- HAYAT S., AHMAD A. 2003. 28-homobrassinolide induced changes favoured germinability of wheat grains. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 29: 55–62.

- HONG Z., UEGUCHI-TANAKA M., FUJIOKA S., TAKATSUTO S., YOSHIDA S., HASEGAWA Y., ASHIRAKI M., KITANO H., MATSUOKA M. 2005. The rice brassinosteroid-deficient dwarf 2 mutant, defective in the rice homolog of arabidopsis DIMINUTO/DWARF1, is rescued by the endogenously accumulated alternative bioactive brassinosteroid, dolichosterone. *The Plant Cell*, 17: 2243–2254. DOI: 10.1105/tpc.105.030973
- HRADECKÁ A., URBAN J., KOHOUT L., PULKRÁBEK J., HNILÍČKA R. 2009. Využití brassinosteroidů k regulaci stresu během růstu a tvorby výnosu řepy cukrové. *Listy cukrovarnické a řepářské*, 125 (9–10): 271–273.
- JANECZKO A., GULLNER G., SKOCZOWSKI A., DUBERT F., BARNA B. 2007. Effect of brassinosteroid in filtration prior to cold treatment on ion leakage and pigment contents in rapeleaves. *Biologia Plantarum*, 51: 355–358.
- JONÁŠ M., SALAŠ P., BALTAZÁR T. 2012. Effect of exogenously application selected phytohormonal substances on the physiological and morphological indicators of *Philadelphus* × hybrid in containers. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 60 (8): 109–118. DOI: 10.11118/actaun201260080109
- KHRIPACH V.A., ZHABINSKII V.N., DE GROOT A.E. 2000. Twenty years of brassinosteroids. *Annals of Botany*, 86: 441–447.
- KIM S., MIZUNO K., HATORI M., MARUMO, S. 1994. A brassinolide-inhibitor KM-01, its isolation and structure elucidation from a fungus *Drechslera avenae*. *Tetrahedron Letters*, 35: 1731–1734. DOI: 10.1016/0040-4039(94)88331-9
- KOHOUT L., KASAL A., CHODOUNSKÁ H., SLAVÍKOVÁ B., HNILÍČKOVÁ J. 2003. The use of 2 α ,3 α ,17 β trihydroxy-5 α -androstan-6-one for plant development by decreasing plant stress. *Pat. appl. č. PCT/CZ02/00041 (WO2003003834)* and EU patent 1 401 278.
- KOHOUT L., KASAL A., CHODOUNSKÁ H. 2004. Použití 2 α ,3 α ,17 β trihydroxy-5 α -androstan-6onu pro ovlivňování stresu rostlin; (Utilisation of 2 α ,3 α ,17 β trihydroxy-5 α -androstan-6one for influencing of plant stress), PV 20012436 (2. 7. 2001) – CZ pat. č. 294 343 udělen 4. 10. 2004.
- KORABLEVA N.P., PLATONOVA T.A., DOGONADZE M.Z., EVSUNINA A.S. 2002. Brassinolide effect on growth of apical meristems, ethylene production, and abscisic acid content in potato tubers. *Biological Plantarum*, 45: 39–43.
- LARCHER W., HÄCKEL H. 1985. *Handbuch der Pflanzenkrankheiten*. Bd. I. Die nichtparasitären Krankheiten. Berlin/Hamburg, Parey: 326 s.
- LEPEDUŠ H., JURKOVIĆ V., ŠTOFA I., ČURKOVIĆ-PERICA M., FULGOŠI H., CESAR V. 2010. Changes in photosystem II photochemistry in senescing maple leaves. *Croatica Chemica Acta*, 83 (4): 379–386.
- LI K.R., WANG H.H., HAN G., WANG Q.J., FAN J. 2008. Effects of brassinolide on the survival, growth and drought resistance of *Robinia pseudoacacia* seedlings under water-stress. *New Forests*, 35: 255–266.
- MANDAVA N.B., THOMPSON M.J. 1984. Chemistry and function of brassinolide. In: Nes W.D. et al. (eds.): *Isopentenoids in plants: biochemistry and function*. New York, Dekker: 401–431.
- MANDAVA N.B. 1988. Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39: 23–52.
- NOVÁKOVÁ O., KUNEŠ I., GALLO J., BALÁŠ M. 2014. Effects of brassinosteroids on prosperity of Scots pine seedlings. *Journal of Forest Science*, 60: 388–393.
- PEREIRA-NETTO A.B., CRUZ-SILVA C.T.A., SCHAEFER M.M.C., RAMÍREZ J.A., GALAGOVSKY L.R. 2006. Brassinosteroid-stimulated branch elongation in the marubakaido apple rootstock. *Trees - Structure and Function*, 20 (3): 286–291.
- PSHENICHNAYA L.A., KHRIPACH V.A., VOLYNETZ A.P., PROKHORCHIK R.A., MANZHELESOVA N.E., MOROZIK G.V. 1997. Brassinosteroids and resistance of barely plants to leaves diseases. In: Parfenov V.I. (ed.): *Problems of experimental botany*. Minsk, Byelorussian Science: 210–217.
- PRUŠÁKOVÁ L.D., CHIZHOVA S.I., KHRIPACH V.A. 1995. Lodging resistance and productivity of spring barley and perennial wheat under the effect of brassinosteroids. *Sel' skokhozyaistvennaya Biologiya*, 1: 93–97.
- RAO S.R., VARDHINI V.B., SUJATHA E., ANURADHA S. 2002. Brassinosteroids – a new class of phytohormones. *Current Science*, 82: 1239–1245.
- STRASSER R.J., SRIVASTAVA A., TSIMILLI-MICHAEL M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus M. et al. (eds): *Probing photosynthesis: mechanism, regulation and adaptation*. London, Taylor and Francis: 443–480.
- STRASSER R.J., SRIVASTAVA A., TSIMILLI-MICHAEL M. 2004. Analysis of fluorescence transient. In: Papageorgiou, G., Govindjee (eds.): *Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis*. Dordrecht, Springer: 321–362.
- VAN KOOTEN O., SNEL J.F.H. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*, 25: 147–150.
- VARDHINI V., RAO S. 1998. Effect of brassinosteroids on growth, metabolite content and yield of *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry*, 48: 927–930.
- VARDHINI V., RAO S. 2003. Amelioration of osmotic stress by brassinosteroids on seed germination and seedling growth of three varieties of sorghum. *Plant Growth Regulation*, 41: 25–33.
- VOLGUSHEVA A.A., YAKOVLEVA O.V., KUKARSKIKH G.P., RIZNICHENKO G.Y., KRENDELEVA T.E. 2011. Performance index in assessing the physiological state of trees in urban ecosystems. *Biophysics*, 56 (1): 90–95.

INFLUENCE OF BRASSINOSTEROIDS ON HEIGHT INCREMENT, CHLOROPHYLL FLUORESCENCE AND MORTALITY OF SEEDLINGS OF NORWAY SPRUCE AND SCOTS PINE IN FOREST NURSERY CONDITIONS

SUMMARY

Brassinosteroids (BRs) are potentially considered to have positive effects on growth and survival of plants. Their influence on common forest trees, however, has not been properly investigated so far (HONG et al. 2005).

In this study, we assessed the effects of application of synthetic brassinosteroid (BR) on Scots pine (*Pinus sylvestris*) and Norway spruce (*Picea abies*) seedlings in forest nurseries. The aim was to verify whether various doses of BR solutions had any positive impacts on mortality, height increment and photosynthetic characteristics.

We established research trials in three forest nurseries in Čikov and Klášterec for Norway spruce, and Tišice for both Scots pine (BO) and Norway spruce (SM) seedlings, respectively (Tab. 1).

The solution with BR compound (2 α ,3 α , 17 β -trihydroxy-5 α -androstane-6-one) was applied by spraying onto beds of 2-year-old seedlings in three doses: low (N) – (0.4 mg.ha⁻¹), medium (S) – (4 mg.ha⁻¹) and high (V) – (40 mg.ha⁻¹). Control (K) was left without any application of BR. Next year we assessed mortality rate, height increment and for spruce also selected parameters of chlorophyll fluorescence.

Overall mortality rate was relatively low; it was higher in BO compared to SM (Tab. 2). For BO, a trend was noticed that with increasing concentration of BR mortality rate decreased (significant differences). No consistent results were achieved for Norway spruce: in Čikov, the control treatment performed with the lowest mortality rate; in Klášterec, however, K performed with the highest mortality rate (Tab. 2).

As for height growth, we found significant differences for *Pinus sylvestris* with the control treatment being the best, and BR treatments showing lower height increments (Fig. 1). The seedlings of *Picea abies* in Tišice nursery treated with the high and medium BR concentrations showed significantly higher increment than the seedlings treated with low concentration and the control treatment, respectively (Fig. 2). Otherwise we found no unambiguous positive effect of BR on the height growth of the species.

Analyses of chlorophyll fluorescence revealed no significant differences in mean values of maximum quantum yield of PSII photochemistry (F_v/F_m) and the time to reach maximum fluorescence $t_{F_{max}}$ between treatments. Other parameters mostly exhibited significant differences (Tab. 3): S_m was decreasing with decreasing BR concentration, $S_m/t_{F_{max}}$ ratio was significantly lowest in K treatment. In PI_{abs} parameter, there were significant differences in K treatment with lowest values and V treatment with highest values.

The most interesting outcome of our study was the significantly reduced mortality rate of *Pinus sylvestris* seedlings after BR application in Tišice; this result is not consistent with the study of *P. sylvestris* planting on the abandoned agriculture land however (NOVÁKOVÁ et al. 2014). On the other hand, the effects of BR on height increment of *Pinus sylvestris* were rather inhibiting, although the real differences were small. Also *Picea abies* showed only small differences in height growth in reaction to BR application, in spite of the fact that the statistical analysis evaluated some of them as significant and speaking in favour chiefly of the S treatment. The response of *Picea abies* to BR in terms of mortality rate was inconsistent and differed depending on the nursery. In general, our recent results cannot verify the importance of BR application for production of spruce and pine seedlings in commercial forest nurseries. To verify all the potential effects of BRs properly, it is necessary to assess the influence of different doses, forms of application and the timing on a broader spectrum of tree species.